



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA RENINA EN LA PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS  
PRO-FIBROSANTES EN FIBROBLASTOS DE PULMÓN HUMANO

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
EDUARDO MONTES MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. VÍCTOR MANUEL RUIZ LÓPEZ  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS "ISMAEL COSÍO  
VILLEGAS"

COMITÉ TUTOR:  
DR. MOISÉS SELMAN LAMA  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS "ISMAEL COSÍO  
VILLEGAS"

DR. ALFONSO DUEÑAS GONZÁLEZ  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

MÉXICO, D. F. JUNIO 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

<b>Contenido</b>	
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>INTRODUCCION</b> .....	5
<b>FIBROSIS PULMONAR</b> .....	5
<b>FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA (ruta epitelial)</b> .....	5
<b>EFFECTOS DEL TGF-β1 EN LA FPI</b> .....	9
<b>SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA</b> .....	11
<b>SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA Y SU RELACIÓN CON LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA</b> .....	12
<b>RENINA Y SU RECEPTOR</b> .....	13
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	19
<b>OBJETIVOS PARTICULARES:</b> .....	19
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	20
<b>RESULTADOS</b> .....	25
<b>DISCUSIÓN</b> .....	35
<b>CONCLUSIONES</b> .....	39
<b>REFERENCIAS</b> .....	41

## RESUMEN

---

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad crónica, de causa y mecanismos patogénicos desconocidos que hasta hoy en día no tiene ningún tratamiento efectivo. La FPI se caracteriza por un daño constante al epitelio alveolar junto con la activación posterior de éste epitelio. Esto, da lugar a una excesiva migración, proliferación de fibroblastos y diferenciación a miofibroblastos, estos últimos producen cantidades excesivas de proteínas de matriz extracelular principalmente de colágena tipo I y III dando como resultado final la destrucción de la arquitectura pulmonar.

En la FPI hay una intrincada red de factores de crecimiento que se producen en el microambiente fibrosante, de los cuales el factor transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1) se ha demostrado posee un papel importante en la patología de la FPI. Éste, aumenta la síntesis de la colágena  $\alpha$ 1 tipo I y además incrementa la proliferación de los fibroblastos.

Varios trabajos han demostrado que el sistema renina angiotensina a través de su efector principal la angiotensina II (Ang II) participa en la patogénesis de la FPI, la Ang II incrementa la síntesis del TGF- $\beta$ 1 y promueve la apoptosis del epitelio alveolar. En la pasada década se encontró que la renina tiene un receptor de membrana (receptor renina/prorenina), capaz de inducir una cascada de señalización y aumentar la producción del TGF- $\beta$ 1 en varios tejidos de manera independientemente de la generación de la Ang II.

En base a lo anterior es importante evaluar el papel de la renina en la FPI. El objetivo de éste trabajo fue conocer cuál es la función de la renina como un componente más de los mecanismos patogénicos de la enfermedad.

Se demostró que la renina esta sobre-expresada en fibroblastos procedentes de pacientes con FPI así como, en el tejido pulmonar. Además de que observamos la presencia del receptor de renina /prorenina (RRP) en fibroblastos y tejido pulmonar.

Mediante el uso de inhibidores farmacológicos para bloquear la generación de la Ang I y antagonizar al receptor AT<sub>1</sub> en fibroblastos pulmonares, se observó que la renina si ejerce un efecto pro-fibrosante independiente de la Ang II. El estímulo de la renina sobre los fibroblastos

pulmonares elevó los niveles del TGF- $\beta$  1, de la colágena  $\alpha$ 1 tipo I en fibroblastos y los niveles de ERK 1 / 2 fosforilado. Así mismo, el bloqueo de la renina mediante un RNA de interferencia causó el efecto contrario disminuyendo la expresión de moléculas pro-fibrosantes. Por último se observó que la renina modifica los niveles de expresión de la enzima MMP1 (metaloproteínasa de matriz 1). Los resultados presentados en este trabajo indican que la renina puede ser uno de los mediadores involucrados en la patogénesis de la FPI debido a su función dual, por un lado como un generador de Ang I y por otro como un ligando del RRP, acciones que parecen incrementar la expresión de moléculas pro-fibrosantes. Nuestros resultados y los previamente reportados en la literatura sugieren que la renina puede ser un blanco terapéutico a futuro o funcionar como un biomarcador diagnóstico y pronóstico de la fibrosis pulmonar idiopática.

## INTRODUCCION.

---

### **FIBROSIS PULMONAR.**

La fibrosis pulmonar es el resultado final de un grupo de desórdenes conocidos como: enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID), estas son diferentes en una variedad de características clínicas, radiológicas y fisiológicas, todas las EPID se agrupan de acuerdo a estas. Varias de estas EPID son de etiología conocida ya sea que surjan por la exposición a compuestos orgánicos (neumonitis por hipersensibilidad), partículas inorgánicas (asbestosis, silicosis) o bien pueden estar asociados a enfermedades colágeno vasculares (escleroderma y artritis reumatoide). Sin embargo, aproximadamente entre el 40 – 50% de estas EPID son de causa desconocida y se clasifican como neumopatías intersticiales idiopáticas, la más común y agresiva es la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) [1].

Con respecto a la secuencia de eventos patogénicos generalmente es aceptado que las EPID inician como resultado de la activación de una respuesta inflamatoria, que al no resolverse es seguida por la proliferación y la activación de fibroblastos que deriva en la producción y acumulación excesiva de proteínas de matriz extracelular principalmente de colágena tipo I y III, finalizando con la destrucción de la arquitectura pulmonar (fibrosis pulmonar).

Ésta ruta o secuencia de eventos opera para la mayoría de las EPID pero no para la FPI. En este contexto se han propuesto 2 rutas para el desarrollo de fibrosis pulmonar: 1) la ruta inflamatoria, representada por todas las EPID distintas de la FPI, donde hay una clara, temprana y distinguible fase de alveolitis y más tarde una fase fibrótica. 2) La ruta epitelial representada por la FPI [1-3].

### **FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA (ruta epitelial).**

La FPI se define como una forma específica de enfermedad intersticial difusa de causa desconocida, limitada a los pulmones, que se caracteriza por un proceso epitelial-dependiente y de la activación de fibroblastos [4-6]. De manera general el diagnóstico de la FPI requiere: 1) exclusión de otras EPID de causa conocida. 2) El patrón de una UIP (Usual Interstitial Pneumonia, por sus siglas en inglés), en una tomografía de alta resolución. 3) Biopsia pulmonar, caracterizada

por una marcada fibrosis, distorsión de la arquitectura pulmonar (tipo panal de abeja), presencia de focos de fibroblastos, etc. [6]

La fibrosis pulmonar idiopática es la forma más común y la más agresiva de las enfermedades fibrosantes del pulmón, es un padecimiento crónico, progresivo, de causa desconocida y letal, que posee una prevalencia de entre 7-10/ 100 000 personas y una incidencia de 16 por cada 100 000 personas (estos datos fueron obtenidos en poblaciones de Estados Unidos y del Reino Unido). Es una enfermedad, que afecta más a los hombres que a las mujeres, el rango promedio de edad de diagnóstico es de 66 años. [7, 8]. En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias se presentan 100 casos nuevos de FPI cada año.

El daño al epitelio y su activación puede ser inducido por varios factores tales como los ambientales, los genéticos, las agresiones comunes (fumar, la contaminación, el reflujo gastroesofágico, las infecciones virales y el envejecimiento) [7, 9]. En la FPI estos daños ocasionan una marcada disrupción de la integridad del epitelio alveolar con presencia de varios fenotipos alterados como son: células cuboidales (hiperplasia de neumocitos tipo II), células epiteliales reactivas es decir, que producen una variedad de citocinas y factores de crecimiento como el CTGF (factor de crecimiento del tejido conectivo), el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), el TGF- $\beta$ 1 (factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1) , el TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral), etc. [1, 10].

En esta patología se dan varios procesos que promueven la perpetuidad de la fibrosis, como son:

- a) Apoptosis del epitelio alveolar.
- b) Pérdida de la membrana basal.
- c) La activación de la cascada de coagulación.
- d) Falla en el proceso de re-epitelización
- e) Aumento en la producción del TGF- $\beta$ 1
- f) Incremento en la migración y proliferación de los fibroblastos y su posterior diferenciación a miofibroblastos, los cuales producen excesivas cantidades de proteínas de matriz extracelular (MEC) principalmente la colágena tipo I y III.

Como fuentes adicionales de fibroblastos:

- Existe migración de fibrocitos al sitio de la lesión.
- Se presenta la transición epitelio-mesénquima

g) Finalizando con la destrucción de la arquitectura pulmonar [7, 9 y 11].

La superficie alveolar del pulmón está compuesta por dos tipos celulares, el 95 % está cubierta por las células epiteliales tipo I que son planas y alargadas, su geometría es ideal para el intercambio gaseoso y el 5 % restante por las células epiteliales tipo II que son más vulnerables al daño. Cuando hay un daño en el epitelio alveolar (principalmente a las células epiteliales tipo I) las células epiteliales tipo II inician el proceso de reparación diferenciándose a células epiteliales tipo I [12]. En ese sentido un paso importante es la rápida y eficiente re-epitelización, reintegrando la superficie alveolar por neumocitos tipo I aunado a la recuperación de la membrana basal, porque una adecuada reparación alveolar puede inhibir el desarrollo de la fibrosis, controlando la proliferación de fibroblastos y el depósito exagerado de matriz extracelular (por ejemplo el humo de tabaco altera el correcto proceso de reparación alveolar) [13, 14].

El proceso anteriormente descrito, se ve interrumpido en la FPI debido a la activación de la cascada de coagulación. En condiciones normales, cuando hay un daño al epitelio alveolar se inicia el proceso de síntesis de una matriz extracelular provisional de fibrina y una eficiente y organizada fibrinólisis promueve la restauración de la arquitectura alveolar. Pero en la FPI la remoción de la fibrina es lenta, la enzima uroquinasa activadora del plasminógeno promueve la activación de la enzima plasmina que es un paso clave en la remodelación del tejido que acompaña al proceso de reparación, porque la plasmina induce la fibrinólisis, pero en la FPI hay un incremento del PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno 1) que se encarga de inhibir a la uroquinasa activadora del plasminogeno. Entonces el PAI 1 inhibe el proceso de fibrinólisis y además esta proteína es fuertemente inducida por el TGF- $\beta$ 1, se ha observado que la inhibición del PAI-1 por un RNA de interferencia atenúa el desarrollo de la fibrosis pulmonar experimental en un modelo murino de bleomicina [15-17].

## **DEGRADACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR.**

La matriz extracelular es una estructura dinámica que juega un papel clave en la homeostasis y arquitectura pulmonar. La matriz extracelular en el parénquima pulmonar comprende entre otras proteínas varias colágenas (tipo I, III, IV, V), la elastina, los proteoglicanos, los glucosaminoglicanos, la fibronectina, la fibrilina, la laminina, la vitronectina, etc. [18, 19].

El equilibrio entre la generación de proteínas de matriz extracelular y su degradación es un proceso fundamental en la FPI, esta última recae sobre las metaloproteinasas de matriz (MMPs). Las MMPs comprenden una gran familia de endopéptidasas dependientes de zinc, capaces de degradar todos los componentes de la matriz extracelular. Estas son sintetizadas como zimógenos con un péptido señal que conduce a la ruta de secreción. Se sabe que hay 24 tipos de MMPs en el humano de las cuales cabe resaltar a las colágenasas y las gelatinasas que incluyen a la MMP1 y la MMP2 respectivamente [20].

### **LA METALOPROTEINASA DE MATRIZ 1.**

La MMP1 (colágenasa intersticial o colágenasa de fibroblastos), degrada a la colágena fibrilar (tipo I y III, que es la más abundante), en los pulmones normales su expresión es muy baja. Se ha reportado que en la FPI, la expresión de la MMP1 está aumentada en el tejido pulmonar de pacientes y aunque su expresión sugiere estar asociada con un efecto anti-fibrosante debido al tipo de colágena que degrada, esta paradoja puede ser resuelta evaluando el lugar de la expresión de la MMP1 que ha sido localizada en el epitelio alveolar lejos del intersticio. De ahí que la distribución de la MMP1 en la FPI la sugiere como un potencial regulador de la interacción local entre el epitelio y las células del mesénquima [18, 21].

### **LA METALOPROTEINASA DE MATRIZ 2.**

La MMP2 procesa un extenso rango de sustratos de la matriz extracelular y otras proteínas como el LAP del TGF- $\beta$ , el IGFBP (proteína de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina), la interleucina 1 $\beta$  [22, 23]. Es efectiva principalmente con la colágena tipo IV y otros componentes de la membrana basal. La expresión de la MMP2 se ha encontrado elevada en tejidos pulmonares

procedentes de pacientes con FPI y está incrementada en lavados bronquiolo-alveolares y en modelos experimentales de fibrosis pulmonar. Esta enzima se ha encontrado en el epitelio alveolar y en focos de fibroblastos. La MMP2 puede provocar la degradación de la membrana basal contribuyendo a la capacidad invasiva de los fibroblastos a los espacios alveolares.

### **EFFECTOS DEL TGF- $\beta$ 1 EN LA FPI**

La familia del TGF-  $\beta$  es amplia, el TGF- $\beta$ 1 se secreta como un complejo latente, pero la estructura madura del factor de crecimiento es una proteína dimérica de 25 kDa la cual está asociada a una proteína de latencia (LAP, por sus siglas en inglés ; Latency-associated protein), y éste a su vez se une a otra proteína llamada proteína de unión a TGF- $\beta$  latente (LTBP) [24]. La activación del TGF- $\beta$  puede ser mediada entre otros por la trombospondina 1, las integrinas ( $\alpha\beta$ 6 y  $\alpha\beta$ 8), por proteólisis (plasmina), por acidificación y mediada por especies reactivas de oxígeno, etc. [25]

El TGF- $\beta$  actúa modificando el patrón de expresión de sus genes blancos de manera dependiente de Smads e independiente de estas.

Se han descrito múltiples efectos del TGF-  $\beta$  en la FPI como:

- 1) Inducir el aumento en la síntesis de proteínas de la matriz extracelular como la colágena tipo I y III por medio de la vía de señalización por Smads. Porque el promotor del gen de la colágena I posee un sitio de unión a Smads (CAGACA situado en la posición -263 a la -258 pares de bases). También se ha reportado que no solo las Smads pueden inducir la actividad del promotor del gen de la colágena I, sino que estas pueden unirse a otro factor de transcripción como el Sp1 y juntos cooperar en el aumento de la actividad transcripcional del gen de la colágena I. [26-28].
- 2) Incrementar la expresión de la fibronectina, ya que, es bien conocido que la vía canónica del TGF- $\beta$ 1 induce la síntesis de proteínas de matriz extracelular, tanto por la ruta de las Smads (Smad 3), como de manera independiente por la vía de la p38MAPK y por la activación de la proteína cinasa Rho A junto con la caveolina 1 [29-31].

- 3) Disminuir la expresión de los componentes que se encargan de la degradación de la matriz extracelular como la MMP1, el estímulo con el TGF- $\beta$  aminora la expresión de esta MMP en fibroblastos [32].
- 4) Promover la transición epitelio-mesénquima.

La transición epitelio-mesénquima inducida por el TGF- $\beta$  en células adultas se reportó por primera vez por Miettinen Päivi J. et al, en células de cáncer mamario. El estímulo con este factor de crecimiento provocó la disminución de una proteína de unión entre células epiteliales llamada E-caderina (actualmente usado como un indicador universal de esta transdiferenciación). Esta transdiferenciación ocurre en la FPI, siendo el TGF- $\beta$  uno de los mayores inductores ya sea de manera dependiente de la vía de señalización de las Smads o independiente de éstas. El TGF- $\beta$  incrementa factores de transcripción como el SNAI y el Slug que regulan negativamente la producción de E-caderina y estos inducen en las células epiteliales el aumento de marcadores de células del mesénquima, como son: la fibronectina, la  $\alpha$ -actina de músculo liso, la vimentina, etc. proporcionando una fuente más de fibroblastos en el sitio de la lesión [33-35].

- 5) Se ha demostrado que el TGF- $\beta$  aumenta la proliferación de los fibroblastos de manera directa, como lo reportó Fuentes Calvo Isabel et al en 2012, quienes encontraron que el TGF- $\beta$  promueve la proliferación por medio de las rutas de señalización Ras GTPasa MAPK/ERK y PI3K/Akt. También lo puede hacer de manera indirecta, mediante la inducción del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) [36-39].
- 6) Induce la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, estos últimos se pueden definir como “fibroblastos parecidos a músculo liso” porque bien pueden representar un estado intermedio entre fibroblastos y células de músculo liso. Los miofibroblastos expresan marcadores característicos como son: la  $\alpha$ -actina de músculo liso (microfilamentos de actina o fibras de estrés), la vimentina y la desmina. El TGF- $\beta$  induce la expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso, debido a que el promotor de este gen posee elementos de respuesta este factor de crecimiento como el CArG. [40-42].
- 7) Aumenta la expresión del CTGF, que es un agente de quimiotaxis de fibroblastos, de proliferación de estos y del depósito de colágena [43, 44].

Hay varios estímulos que inducen la producción de TGF- $\beta$ 1, en la última década se describió que la angiotensina II, que pertenece al sistema renina-angiotensina participa en la fibrosis pulmonar promoviendo la producción de TGF-  $\beta$ 1 [45-47].

## **SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA**

El sistema renina angiotensina se conoce principalmente por su participación en la regulación de la presión arterial y el balance de electrolitos. Pero su función se ha ido extendiendo más allá de esta visión clásica, prácticamente hay un sistema renina-angiotensina que actúa de manera local en cualquier órgano, participando en diferentes patologías como son: el glaucoma en el tejido ocular y la fibrosis en el corazón, el pulmón y el riñón [48, 49].

Este sistema consta de varias proteínas involucradas en una cascada de cortes enzimáticos para poder producir el efector principal que es la angiotensina II. El angiotensinógeno, un péptido que es producido en el hígado es cortado por la renina, produciendo la angiotensina I que será sustrato de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) dando como resultado la producción de la angiotensina II, que ejerce su efecto por medio de dos receptores el AT<sub>1</sub> y el AT<sub>2</sub> [50].

Adicionalmente se han descrito otras enzimas que participan en la generación de otros péptidos a partir del procesamiento de la angiotensina I o la angiotensina II y estos poseen diversas funciones biológicas. Estas enzimas son la calicreína, la quimasa, la aminopeptidasa A, la aminopeptidasa B/N y la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA 2), que se encargan de producir los metabolitos llamados angiotensina III (Ang III), angiotensina IV (Ang IV) y angiotensina 1-7 (Ang 1-7). Estos péptidos a su vez se acoplan a sus propios receptores; la angiotensina III ejerce su efecto a través del receptor AT<sub>3</sub>, la angiotensina IV por medio del AT<sub>4</sub> y la angiotensina 1-7 interactúa con el AT<sub>7</sub>. Pero la Ang III también tiene la capacidad de ejercer acciones por medio de los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> que utiliza la angiotensina II [51].

## **SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA Y SU RELACIÓN CON LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA.**

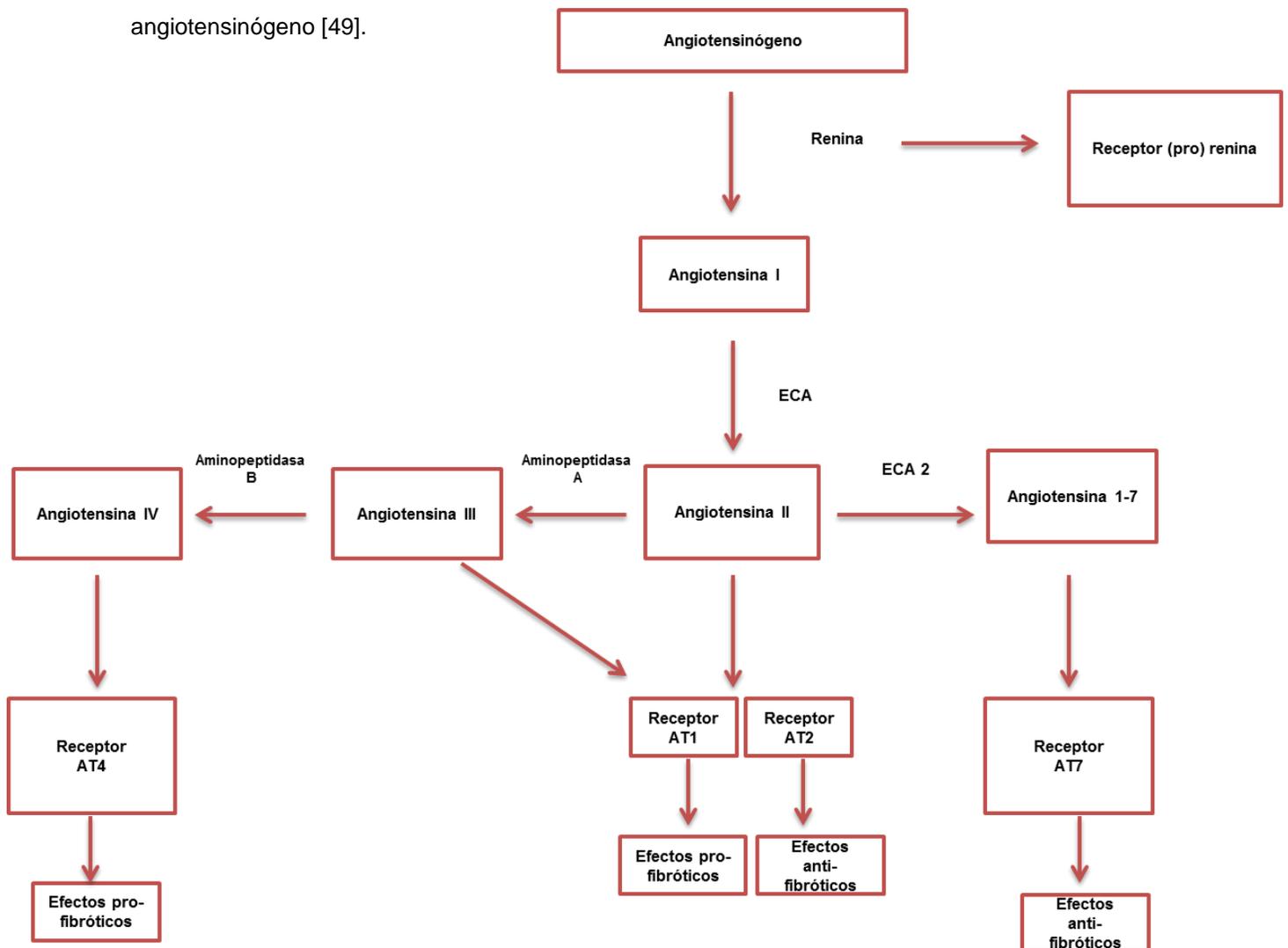
De los diversos metabolitos producidos en el sistema renina angiotensina, los efectos de la angiotensina II son los más descritos en la patogénesis de la FPI. La angiotensina II induce apoptosis del epitelio alveolar a través de su receptor  $AT_1$ , incrementando los niveles de proteínas importantes en la inducción de la apoptosis como son: el Fas, el FasL y Bax. Además se han reportado otras vías por las que la Ang II activa el proceso de muerte celular tales como: el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno junto con la posterior activación de la proteína p38MAPK, también se ha observado que la Ang II puede inducir apoptosis por medio de la fosfolipasa C/proteína cinasa C. De manera interesante recientemente se encontró que inclusive el receptor  $AT_2$  puede tener el mismo efecto que el  $AT_1$  en la apoptosis. La Ang II aumenta la producción del TGF- $\beta_1$ , el cual estimula la expresión de la colágena I [45, 52-60].

Se han reportado diversos efectos de los subproductos del sistema renina angiotensina en la inducción de moléculas pro-fibrosantes. La Ang III aumenta la producción de la colágena en cardiomiócitos y se ha visto que también es capaz de inducir la fosforilación de las cinasas ERK 1 / 2 y a su vez incrementar la proliferación celular a través del receptor  $AT_1$ . La Ang IV aumenta la producción del PAI -1 e induce una mayor actividad del PI3K (fosfatidil-inositol 3 cinasa) por medio del receptor  $AT_4$ , se conoce que el PI3K en la FPI aumenta la proliferación de los fibroblastos, así como el incremento de la colágena  $\alpha_1$  tipo I. Por el contrario se ha sugerido que la Ang 1-7 posee efectos anti-fibrosantes (eje ECA2/Ang1-7/receptor Mas), ya que disminuye la acumulación de colágena y la proliferación celular [61-72] .

Sin embargo en los últimos años se ha sugerido que no solo la angiotensina II y sus metabolitos son la parte efectora este sistema, sino que también la renina puede actuar de manera independiente de la generación de la angiotensina I por medio de su propio receptor, el receptor renina/prorenina.

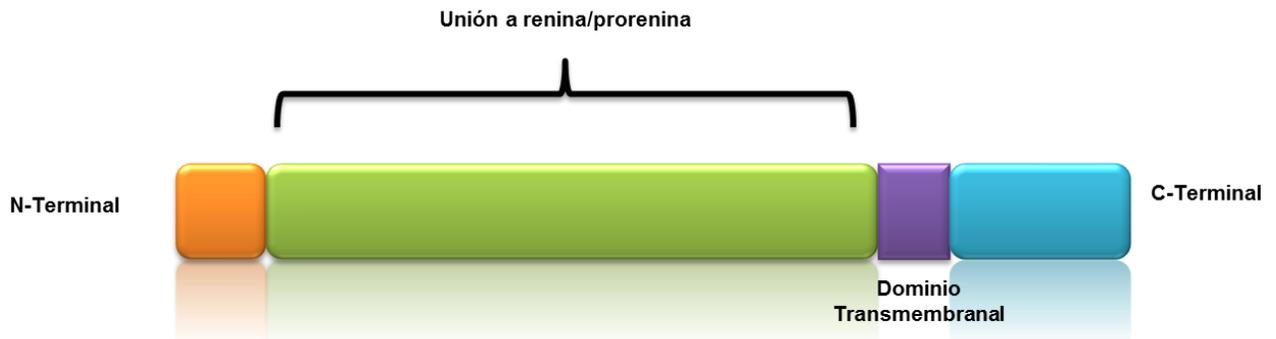
## RENINA Y SU RECEPTOR

La renina es una aspartil-proteasa de aproximadamente 45-50 kDa, se compone de 406 aminoácidos, su gen está localizado en el cromosoma 1 y es producida principalmente por el riñón. La renina es secretada en 2 formas, una activa (renina) y otra inactiva (prorenina). Esta última tiene bloqueado el sitio catalítico por un propéptido que le impide el procesamiento del angiotensinógeno [49].



**Esquema 1.** Se muestra la generación de los diferentes efectores del sistema renina-angiotensina, así como sus receptores. Dependiendo del metabolito generado el sistema puede ejercer efectos contrarios, como promotor de la fibrosis o como protector de la misma.

En 2002 Nguyen, et al. describieron una proteína de membrana que era capaz de unirse de manera específica a la renina y prorenina, la cual nombraron como el receptor renina/prorenina (RRP). Este receptor es una proteína de aproximadamente 35 kDa compuesta de 350 aminoácidos, con un solo dominio transmembranal (esquema 2) y está localizada en el cromosoma X, también se ha visto que el RRP está ampliamente conservado entre especies como: rata, ratón, pollo, rana, caballo de mar, entre otros [73-75].



**Esquema 2.** Se puede observar la estructura del receptor de renina/prorenina, el receptor es de un solo dominio transmembranal, con un sitio de unión a renina y prorenina.

La unión de prorenina a su receptor expone su sitio catalítico confiriéndole la capacidad de procesar al angiotensinógeno. Se describió por primera vez en células mesangiales que la interacción de ambas (renina y prorenina) con el RRP, induce una cascada de señalización vía MAP cinasas (ERK 1 / 2), que deriva en el incremento de moléculas pro-fibrosantes tales como: TGF- $\beta$ 1, PAI-1 y la colágena  $\alpha$ 1 tipo I de manera independiente de la generación de la angiotensina I (esquema 3). Después en 2009 Melnyk, et al. reportaron en un estudio de microarreglos que el RRP además de estimular la producción del TGF- $\beta$ 1, también estimula otras dos vías: la del SAPK/JNK y en menor medida la del receptor de la vitamina D, de manera independiente de la angiotensina II [76-79].

Posteriormente se empezó a describir que la expresión del RRP está presente en varios tejidos tales como: las células endoteliales, el tejido ocular pigmentado, la retina, las neuronas, los cardiomiocitos, el tejido graso, los eritroblastos, la glándula pituitaria etc; en los cuales se observó

que la renina tiene un efecto sobre la expresión de moléculas pro-fibrosantes y que la inhibición de éste receptor disminuye los efectos provocados por el estímulo de la renina [80-85].

Se sabe poco acerca de la vía de señalización de éste receptor, pero trabajos de los últimos años han ido mostrando diferentes proteínas que se activan con el RRP. En el 2006 Shefe, et al. reportaron que al estimular células Hela con la renina, se aumenta la activación del factor de transcripción PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger, por sus siglas en inglés), que resulta el aumento de la proliferación celular vía la activación del PI3K y en otro estudio se observó que la inhibición del RRP disminuye la tasa de proliferación de las células mesangiales. En los cardiomiocitos este receptor aumenta la expresión de la proteína de choque térmico 27 (HSP27), que se ha visto participa en el arresto del ciclo celular y confiere resistencia a la apoptosis. En la retinopatía diabética el RRP aumenta el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF por sus siglas en inglés), que también se ha descrito en modelos experimentales con bleomicina como una molécula profibrosante (esquema 3). El VEGF se expresa en las células del epitelio alveolar, es un inductor de la angiogénesis e induce la permeabilidad vascular, aunque su papel en la FPI aún no está bien descrito. En este sentido el RRP también aumenta mediadores de la inflamación como son el TNF- $\alpha$  y la interleucina 1 $\beta$  [71, 72, 86-95].

Recientemente se describió que el RRP también es capaz de funcionar como un agente quimiotáctico, puesto que en las células de aorta humana, el RRP aumentó la migración celular por medio de la reorganización del citoesqueleto a través de la activación de las proteínas Rac 1-GTP y Rho A-GTP. Además el RRP es capaz de aumentar el CTGF junto con el TGF  $\beta$ 1 en un modelo experimental de diabetes en ratas, en la FPI se ha visto que el CTGF es un potente agente quimioatractivo. De manera interesante el RRP en las células mesangiales ayuda a la transactivación del receptor EGF (factor de crecimiento epidérmico), induciendo la fosforilación de la tirosina 1992 del EGF, proceso importante debido a que se ha visto que el EGF aumenta la proliferación celular de los fibroblastos pulmonares [96-98].

Otro proceso importante en la FPI es el aumento de especies reactivas de oxígeno, el RRP aumenta el estrés oxidante de manera dependiente de la generación de Ang II e independientemente (en células neuronales) y también eleva los niveles de las subunidades Nox 2

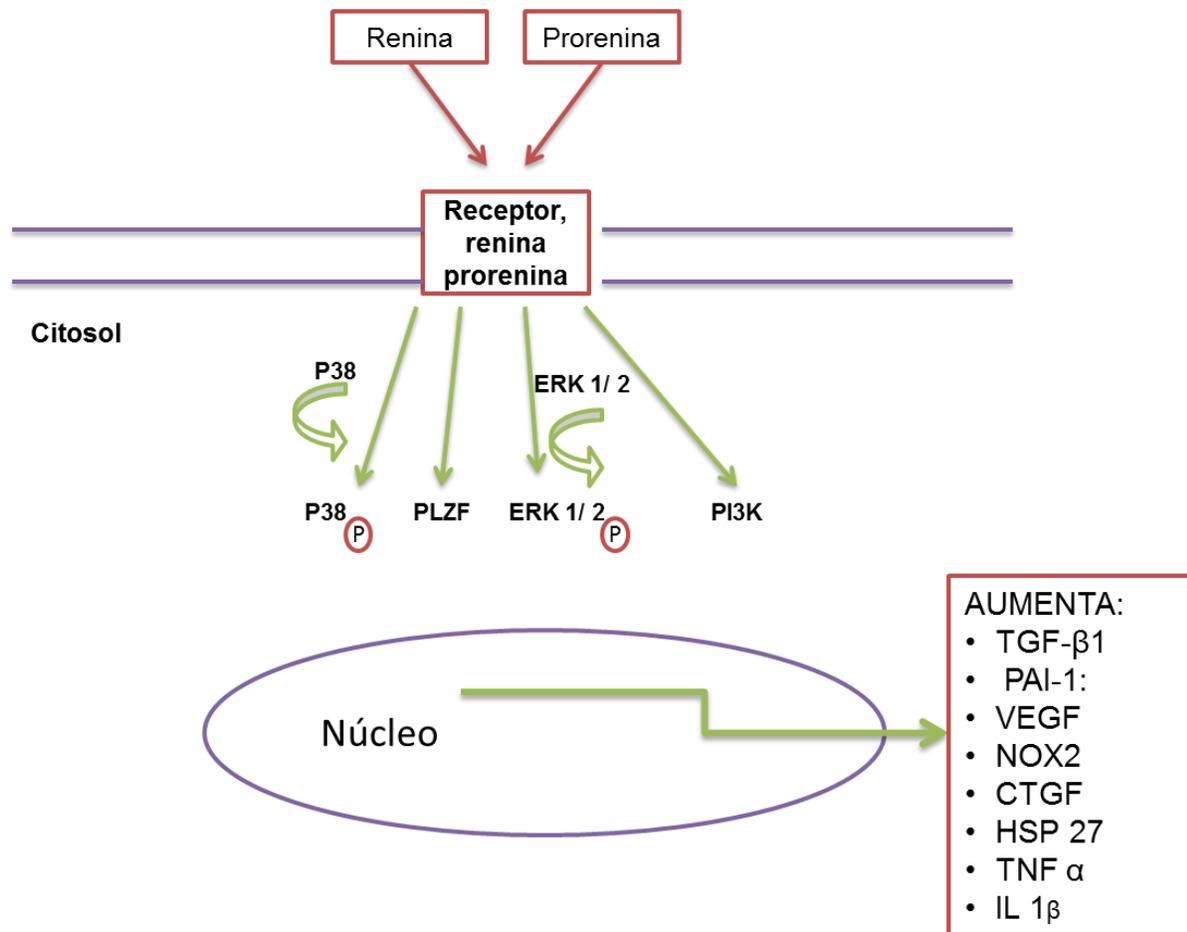
y 4 de la enzima NADPH sintasa. En el 2011 Clavreul, et al. reportó que el RRP en células embrionarias de riñón aumentó los niveles de moléculas pro-fibrosantes (el PAI-1, el TGF- $\beta$ 1 y la fibronectina) y que este efecto era debido al incremento de la subunidad Nox 2, pero no de la Nox 4 [86, 99, 100].

Recientemente en un estudio de microarreglos en tejidos provenientes de pacientes con FPI se observó que los genes asociados con el desarrollo pulmonar están significativamente sobre expresados. Dentro de estos genes está el de la vía del Wnt/ $\beta$ -catenina. Hay reportes que muestran que la vía del Wnt está activada en la FPI y que entre otros efectos induce la proliferación de fibroblastos, la activación de los mismos y la síntesis de colágena tipo I, a este respecto en el 2010 Cruciat, et, al. encontraron una relación entre el RRP y la vía del Wnt en la que se sugiere que se requiere el receptor de la renina como parte del complejo del receptor del Wnt, actuando como una especie de adaptador entre el LRP6 y la ATPasa- $H^+$  que al parecer favorece la fosforilación del LRP6 y por lo tanto la activación de ésta vía [101, 102].

Aunque hay evidencia reportada acerca de cómo el RRP favorece la vía del Wnt/ $\beta$ -catenina no es muy clara esta regulación, ya que se ha visto que el RRP puede ser necesario para la debida señalización de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (como una proteína accesoria), pero también se ha encontrado que este mismo puede tener una función como un represor de la vía [103, 104].

Se conoce muy poco acerca de la regulación del RRP, en células Hela el factor de transcripción PLZF causa la disminución de la expresión del RRP. Por el contrario la D- glucosa aumenta la expresión del receptor de renina por medio del NF $\kappa$  $\beta$  y el factor de transcripción AP-1, así como por ERK/JNK/c-Jun. También se determinó en un modelo experimental murino de infarto al miocardio, que el tratamiento antihipertensivo con lisinopril aumentó la expresión del RRP [89, 105].

Debido a toda la evidencia hallada en muchos tejidos es importante conocer ¿cuál es el papel de la renina en la fibrosis pulmonar idiopática?, padecimiento de causa y mecanismos patogénicos desconocidos. El estudio de la renina y su receptor puede contribuir a aumentar al conocimiento existente sobre la patogénesis de la FPI y proveer un nuevo blanco terapéutico a futuro.



**Esquema 3.** Se muestran las rutas que son activadas por el RRP y las proteínas que aumentan su expresión. Proteínas que tienen que ver con el depósito de matriz extracelular, la proliferación celular, el estrés oxidativo, la resistencia a la apoptosis y los procesos inflamatorios.

## JUSTIFICACIÓN

---

La fibrosis pulmonar Idiopática es un padecimiento de causa desconocida y sin un tratamiento efectivo. A la fecha no existen trabajos que determinen la influencia que puede tener la renina en el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática. Los hallazgos de este estudio contribuirán al conocimiento de la patogénesis de la FPI y eventualmente podrán abrir nuevas perspectivas terapéuticas.

## OBJETIVO GENERAL

---

Determinar el efecto del estímulo con renina en la expresión de moléculas pro-fibrosantes y el resultado de la inhibición de renina (ARN de interferencia), sobre la expresión de estas moléculas en fibroblastos de pulmón humano.

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar el efecto en la expresión de la colágena  $\alpha 1$  tipo I, del TGF- $\beta 1$ , la  $\alpha$ -actina de músculo liso y del receptor de renina/prorenina por el estímulo de renina recombinante en fibroblastos de pulmón humano.
- Determinar el efecto de la inhibición de la renina, en los niveles de expresión génica de la colágena  $\alpha 1$  tipo I, del TGF- $\beta 1$ , la  $\alpha$ -actina de músculo liso, en fibroblastos de pulmón humano.
- Determinar el efecto de renina sobre la expresión de la metaloproteínasas de matriz como son: la MMP1 y MMP2 así como el efecto en la actividad gelatinolítica de la MMP2.
- Evaluar si la renina activa la vía de señalización de ERK 1/ 2 en fibroblastos pulmonares.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

### **Reactivos.**

Renina recombinante (Cayman chemicals, Ann Arbor Michigan), anticuerpos secundarios ERK 1/ 2 (extracellular signal-regulated kinase),  $\beta$ -tubulina,  $\alpha$ - actina de músculo liso, el receptor de renina y el buffer RIPA fueron adquiridos de Santacruz Biotechnology (Santa Cruz, California). Anticuerpos secundarios acoplados a peróxidasa (HRP) fueron obtenidos de invitrogen life technologies (Grand Island, New York). Los fármacos captopril y losartan se adquirieron de SIGMA (St. Louis, Missouri). Medio de cultivo Ham F12 Nutrient Mixture (invitrogen life technologies) y Suero fetal Bovino. Trizol reagent (invitrogen life technologies), DNasa (Thermo scientific, Inc. Waltham, Massachusetts), Kit transcriptase reversa (Clontech, Palo Alto, California), Master Mix de PCR y sondas taq-man (Applied Biosystems, Foster City, California). La cuantificación de proteínas se hizo con el reactivo de Bradford (Biorad, Hércules, California)

### **Cultivo celular.**

Se utilizaron fibroblastos control y procedentes de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, se propagaron incubándolos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% de aire, en medio HAM F12, suplementado con 10% de suero fetal bovino hasta llegar a la confluencia requerida (80%-90%) en cajas T 25cm<sup>2</sup>.

### **Transcripción Reversa y PCR en tiempo real.**

Se extrajo el RNA total de fibroblastos pulmonares control y procedentes de FPI, así como de tejido pulmonar con el reactivo de TRIZOL de acuerdo a las instrucciones del fabricante, brevemente: se agregó el reactivo de trizol, se homogeneizó la muestra y posteriormente se le adicionó cloroformo para obtener las fases de separación por centrifugación (12 000 g). Se retiró la fase acuosa, después se le adiciono a ésta fase isopropanol para precipitar al RNA y se centrifugo nuevamente a 12 000 g. El pellet formado se lavó con etanol al 75%, se centrifugo a 7 500 g y se resuspendió el RNA en 12 $\mu$ L de agua libre de nucleasas y se almacenó a -70°C hasta su uso. Posteriormente 1 $\mu$ g de RNA total fue tratado con 1unidad de DNasa. Se obtuvo el DNA complementario mediante la técnica de transcripción reversa.

La PCR en tiempo real se realizó utilizando 3  $\mu$ L de DNA complementario, master mix 20X y las sondas taq-man para el TGF $\beta$ 1, la colágena  $\alpha$ 1 tipo I, la  $\alpha$  actina de músculo liso, la MMP1, MMP2 y la renina en un volumen final de 25 $\mu$ L. Para el receptor de renina se diseñaron iniciadores a partir de la secuencia GI: 15011917 usando el programa en línea Primer BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Las secuencias de los iniciadores fueron las siguientes: 5'-CATTGTCCATGGGCTTCTCT-3' (sentido) y 5'-GCATTCTCCAAAGGGTACGA-3' (anti-sentido). Para la PCR en tiempo real se usó SYBR1 Green y 10 pmoles de cada iniciador.

### **Estímulos con la renina e inhibición farmacológica con losartan y captopril.**

Los fibroblastos de pulmón normales se plaquearon en cajas T 25cm<sup>2</sup>, se crecieron en medio HAM F12 sin suero durante 24h. Posteriormente se retiró el medio y se colocó medio HAM F12 libre de suero. Antes de realizar las mediciones, se hicieron curvas de dosis en diferentes cultivos de fibroblastos probando varias concentraciones de renina, captopril y losartan, hasta encontrar la concentración ideal (10nM de renina, captopril, losartan). Así como, curvas de tiempo para la extracción del RNA total (3 horas de estímulo).

Una vez obtenidos la dosis y el tiempo se incubaron los fibroblastos con 10nM de la renina y en paralelo otros cultivos de fibroblastos pulmonares fueron pre-incubados con 10nM captopril y 10 nM de losartan por 1hora y después se le adicionó 10 nM renina. Además otro grupo de fibroblastos se pre-trataron durante 1 hora con un anticuerpo contra el receptor de renina para evaluar el papel de éste en los estímulos con la renina recombinante. Al término de los diferentes tratamientos se extrajo el RNA total con el reactivo de TRIZOL y se almaceno hasta su uso a -70°C.

### **Obtención de medio condicionado y lisados celulares.**

Para la obtención del medio condicionado los cultivos de los fibroblastos pulmonares se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron durante 24 horas en medio de cultivo Ham F12 libre de suero para obtener el medio condicionado. Se colecto el medio de cultivo y se le adicionó un coctel de inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail set V, libre de EDTA, Calbiochem, Darmstadt

Alemania) después se centrifugo a 3500 rpm para retirar los restos celulares. Se concentró 25 veces en columnas de diálisis (Millipore, Billerica, Massachusetts) de un tamaño de poro de 3000 kDa. Se determinó la concentración de proteínas con el reactivo de Bradford, se alicuotó y almacenó hasta su uso a -70°C.

Los lisados celulares se realizaron con el buffer de extracción de proteínas totales RIPA, se colecto el lisado celular y se centrifugo a 12 000 g para retirar los restos celulares. Se cuantifico la cantidad de proteínas, se alicuotó y almacenó hasta su uso a -70°C.

### **Western blot.**

Todos los westerns blots se presentaron en condiciones desnaturalizantes/reductoras (SDS-PAGE). Se utilizaron de 8-12 µg de proteína total en geles de poliacrilamida (8-10%). La separación de proteínas se realizó de la siguiente manera: todas la muestras se pre-incubaron 5 min a 100 °C con el buffer de carga, se cargaron en el gel y se separaron en una cámara de electroforesis durante 1 hora con 20 min a 120volts. Al término las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Biorad) por 30 min en una cámara semi-seca (Trans blot SD, Semi Dry transfer cell, Biorad). Posteriormente se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios de acuerdo a las instrucciones del fabricante (el anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente y el anticuerpo secundario 1 hora a temperatura ambiente). Se reveló utilizando quimioluminiscencia (Pierce, west femto) mediante el sistema de detección Chemidoc XRS (Biorad). Las densitometrías se realizaron utilizando el software Image Lab (Biorad laboratories, Inc.).

### **Cuantificación de colágena.**

Se llevó a cabo con el kit de Sircol collagen assay (Biocolor Ltd, United Kingdom) en los medios condicionados. La cantidad de medio condicionado se colocó de tal manera que todos tuvieran la misma concentración de proteína. Posteriormente se incubaron las muestras con el reactivo Sircol Dye Reagent durante 30 minutos, se centrifugo a 12 000 g y el pellet se lavó 1 vez con el reactivo acid-salt wash, se centrifugo a 12 000g y el pellet se disolvió y se leyó a una longitud de onda de

555nm. La concentración de colágena se calculó extrapolando los valores de absorbancia con la curva patrón de colágena.

### **Cuantificación de TGF- $\beta$ 1.**

Se midió la cantidad de TGF- $\beta$ 1 activo con 3  $\mu$ g de proteína total de medio condicionado de fibroblastos estimulados con renina recombinante usando un kit comercial de ELISA (Emax, Promega, Madison, Wisconsin) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras se colocaron con la misma concentración de proteína, un grupo de muestras se pre-trataron con ácido (activación del TGF- $\beta$ ) y otro grupo se dejó sin tratamiento. Se incubó la placa de ELISA por 90 minutos, después se lavó 5 veces con TBS-T y se dejó 2 horas con el anticuerpo secundario. Posteriormente se lavó 5 veces con TBS-T, se agregó la solución sustrato, se detuvo la reacción con ácido clorhídrico 1 N y se leyó la placa a una longitud de onda de 450nm.

### **Inmunocitoquímica.**

Los fibroblastos fueron cultivados en cubreobjetos ( $1 \times 10^4$  células) en medio libre de suero por 24 horas. Posteriormente se fijaron con una mezcla de acetona/metanol (1:1) a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-renina (ABD serotec, Kidlington, United Kingdom) a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min, enseguida se colocó el anticuerpo secundario biotinilado cabra-anti inmunoglobulina G de ratón (Biogenex, San Ramon, California) por 20 min. El sustrato para revelar fue 9-amino etil carbazol (Biogenex). Los núcleos de las células fueron contrateñidos con hematoxilina.

Las imágenes fueron capturadas en un microscopio Olympus con una camera Evolution MP. La cuantificación de la señal se realizó usando el programa Image Pro Plus 4.5 y está expresada en densidad media de pixeles (DMP).

### **Zimograma de Gelatina**

Para identificar la actividad gelatinolítica presente en el medio condicionado de fibroblastos pulmonares estimulados con la renina se usaron geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) conteniendo 1mg/mL de gelatina. Cada carril se cargó con 0.3  $\mu$ g de proteína total, se separaron las proteínas

en una cámara de electroforesis a 150 volts, se dejó el gel durante 24 horas en buffer de incubación y se tiñó con azul de coomassie por 15 min.

### **RNA de interferencia.**

La secuencia del RNA de interferencia se diseñó usando el software de clontech: <http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/>. La homología de la secuencia blanco fue corroborada usando el BLAST. Posteriormente se sintetizaron 2 oligonucleótidos complementarios (Applied Biosystems) y se clonaron en el vector pSIREN Retro Q-Tet vector (BD Clontech), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se alinearon los oligonucleótidos (sentido y antisentido) se adicionó a la mezcla de reacción de ligación 0.5µM de los oligonucleótidos para poder incorporarlos al vector pSIREN Retro Q-Tet. La transformación de las bacterias competentes (cepa *E. coli* K1) se realizó adicionando 2µL de la mezcla de reacción de ligación, se incubaron en hielo por 30 min y después se calentaron en baño maría durante 45 segundos a 42°C. Inmediatamente se colocaron 950 µL de medio SOC, después se incubaron por 60 min a 37°C en agitación, al término de la incubación se sembraron las bacterias en medio selectivo para aislar a las clonas que incorporaron el plásmido.

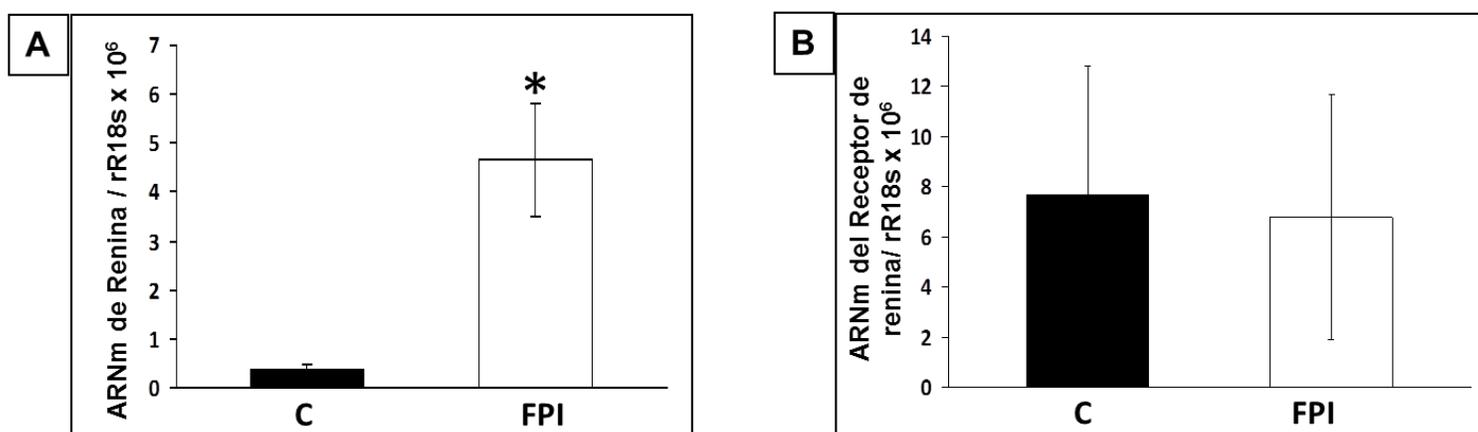
Posteriormente se transfectó el plásmido usando lipofectamina 2000 (invitrogen) en las células empaquetadoras Retro pack PT67 (Clontech) y se incubaron por 24 h. Después se retiró el medio de cultivo, se lavó una vez con PBS y se colocó medio de cultivo completo dejándolas durante 72h. Al término de este tiempo se retiró el medio completo, se adiciono el medio de selección y se aislaron colonias largas y sanas. Se propagaron las clonas seleccionadas y se colecto el medio de cultivo que contiene las partículas víricas. Se centrífugo el medio colectado para descartar los restos celulares, se alicuotó y almacenó el medio de cultivo a -70° C hasta su uso.

Para la infección los fibroblastos pulmonares estos se cultivaron en placas de 6 pozos a una densidad de 400,000 células por pozo. Se adicionaron 20µL de medio de infección por cada pozo y se incubaron 24 h. Posteriormente las células infectadas se seleccionaron con puromicina a una concentración de 0.5µg/mL. Las colonias seleccionadas se propagaron y después se les extrajo el RNA total y las proteínas.

## RESULTADOS

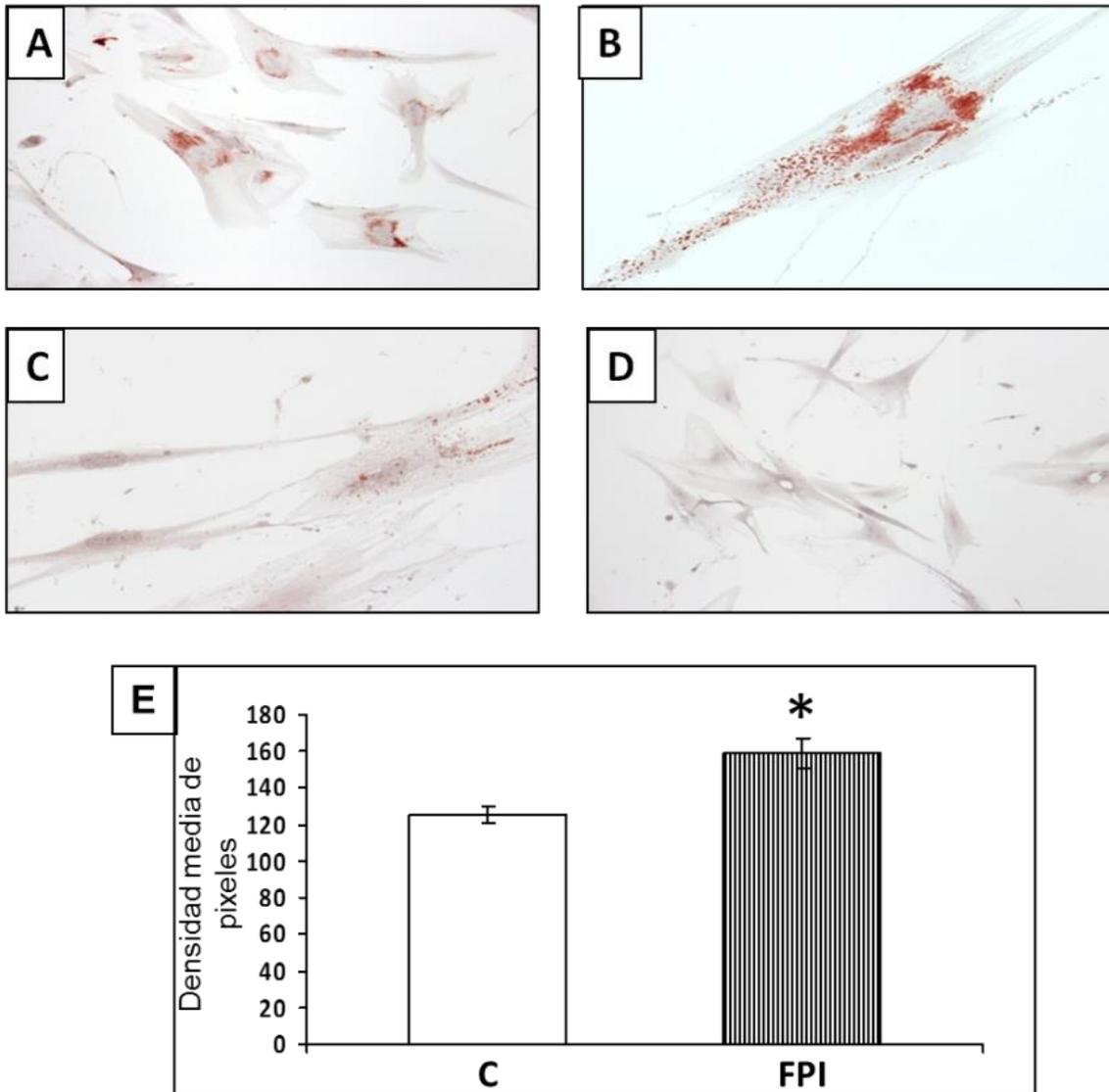
### Expresión de la renina y su receptor en muestras de pulmón y fibroblastos de pacientes con FPI.

Primero se evaluaron los niveles de expresión de la renina y de su receptor a nivel del RNAm y proteína en fibroblastos procedentes de biopsias de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y control. En la figura 1 panel A; se muestra como los niveles del RNAm de renina están aumentados de manera significativa (10 veces más, en los fibroblastos de pacientes con FPI con respecto al control), no así los niveles del receptor de renina, donde no se observó diferencia alguna (panel B).



**FIGURA 1. Panel A)** se observa la expresión de la renina en fibroblastos control y procedentes de pacientes con FPI, donde hay una mayor expresión de la renina en células de pacientes con FPI (\*P<0.01). En el **panel B)** se representan los niveles de expresión del receptor de la renina en fibroblastos control vs FPI, en éste caso no se encontró ninguna diferencia en el nivel de RNAm.

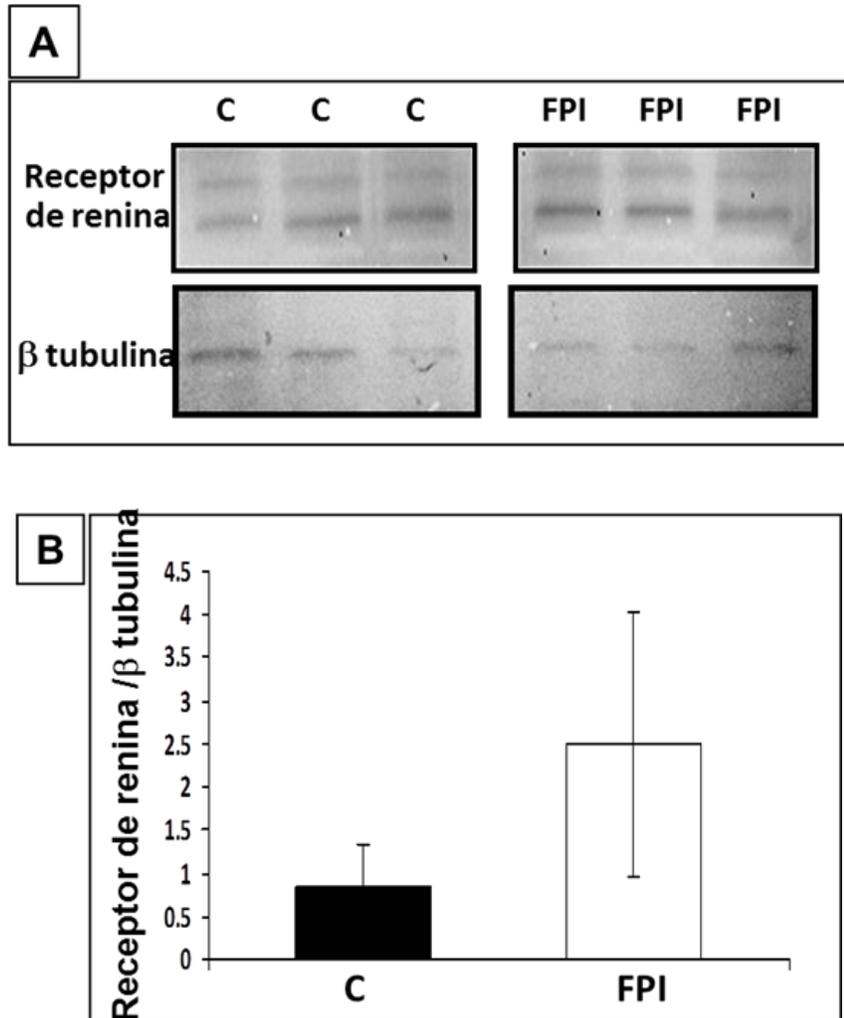
El incremento de la renina observado en el RNAm fue corroborado por una inmunocitoquímica (Figura 2). Los fibroblastos procedentes de pacientes con FPI mostraron una tinción más intensa para la renina comparadas con el control. El análisis de cuantificación se realizó utilizando el software Image Pro Plus 4.5, el resultado está expresado en densidad media de píxeles (DMP), este análisis evidenció una diferencia significativa en la intensidad de señal de la renina (159 FPI vs 125 en controles DMP).



**FIGURA 2.** Se muestran los niveles proteicos de la renina por inmunocitoquímica. **Panel A y B)** Fibroblastos de pacientes con FPI. **Panel C)** Fibroblastos control. **Panel D)** Control negativo. Se nota una mayor tinción en las células procedentes de pacientes con FPI en comparación con las células control. En el **panel E)** se representa de manera cuantitativa la señal observada en las inmunocitoquímicas (expresada en densidad media de pixeles). Hay una diferencia significativa en los niveles proteicos de la renina en fibroblastos FPI (\* $P < 0.01$ ).

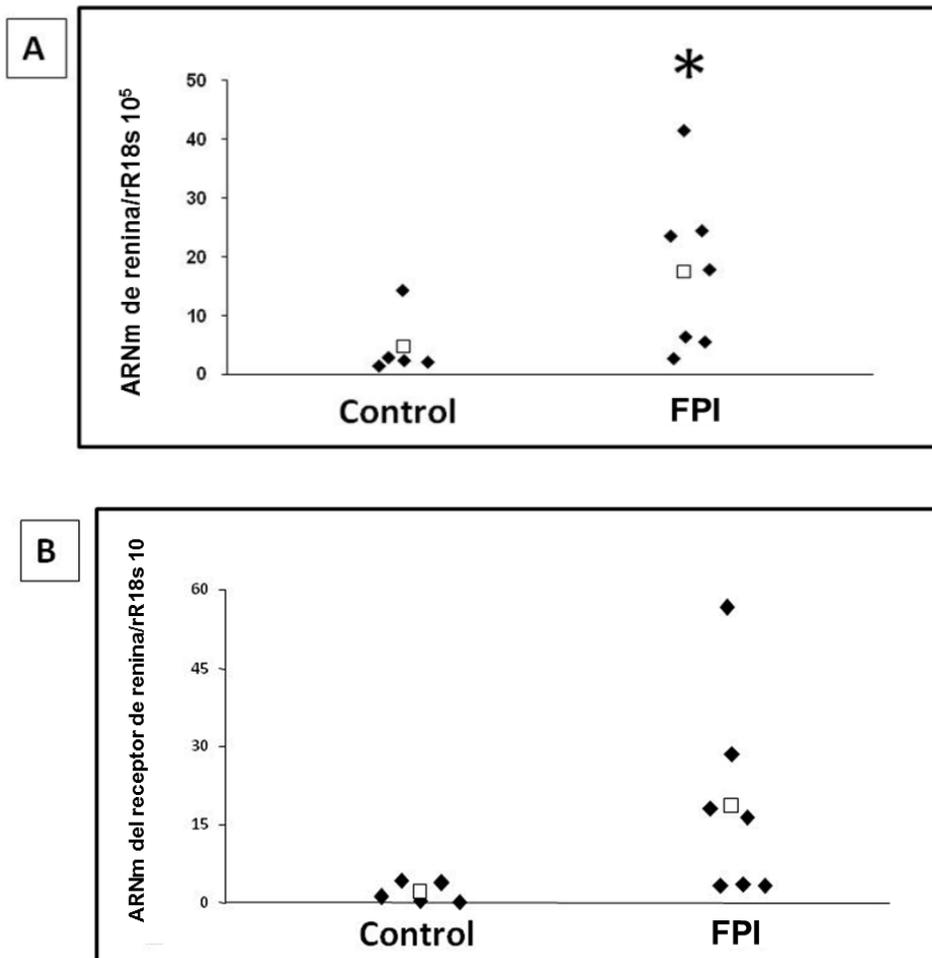
También se evaluó el nivel de la proteína del receptor de renina/prorenina en 3 líneas de fibroblastos de pacientes con FPI y 3 líneas control por western blot. Los fibroblastos de pacientes

con FPI presentaron una tendencia a tener una mayor cantidad del receptor de renina, pero la diferencia no alcanzó significancia estadística (Figura 3).



**FIGURA 3.** Western blot del receptor de renina en diferentes líneas de fibroblastos control y de pacientes con FPI en proteína total de lisados celulares, no se encontraron diferencias significativas.

Del mismo modo los niveles del RNAm de la renina también se encontraron incrementados en las muestras de biopsias pulmonares de pacientes con FPI en comparación con el grupo control (Figura 4 A). Para el receptor de la renina solo se pudo observar una tendencia al aumento pero sin significancia estadística (Figura 4 B).



**FIGURA 4. Panel A)** se observan los niveles de expresión de la renina los cuales se encuentran elevados de manera significativa en biopsias procedentes de pacientes con FPI (\* $p < 0.01$ ). **Panel B)** no hubo diferencias significativas en la expresión del RRP.

**La renina estimuló la producción de moléculas pro-fibrosantes de manera independiente de la generación de la Ang II.**

Para evaluar el efecto de la renina sobre la expresión del TGF- $\beta$ 1 y la colágena  $\alpha$ 1 tipo I, se estimularon fibroblastos normales con 10nM de renina recombinante y para saber si el efecto era de manera independiente de los efectos de la angiotensina II, se realizaron estímulos de manera

paralela usando 2 fármacos, uno para inhibir la generación de Ang II (captopril) y otro como antagonista del receptor  $AT_1$  (losartan).

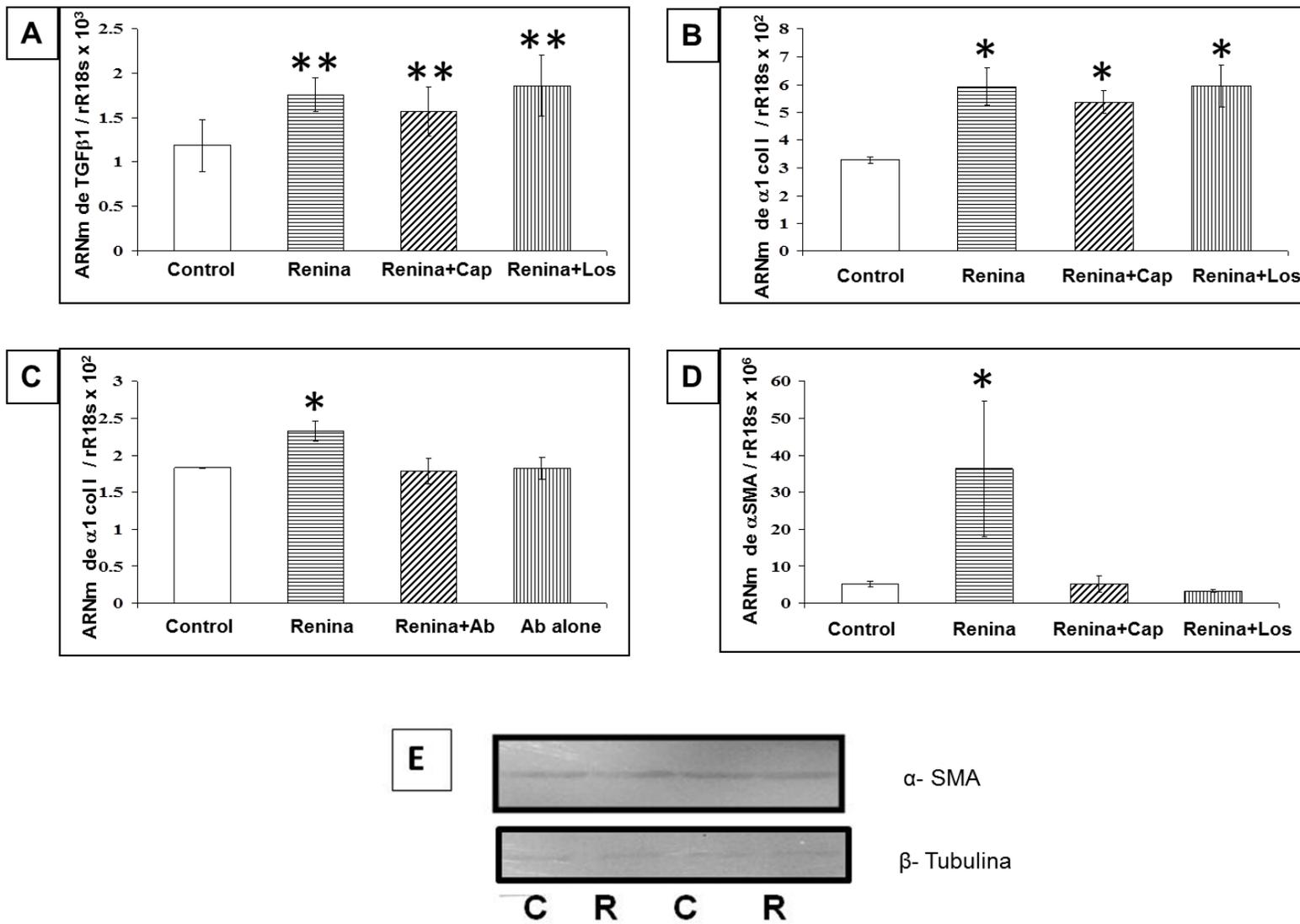
El estímulo con la renina recombinante en fibroblastos aumentó de manera significativa los niveles del RNAm del TGF- $\beta$ 1 y la colágena  $\alpha$ 1 tipo I en comparación con el grupo control (Figura 5, panel A y B). Cuando se bloqueó el RRP con el uso de un anticuerpo, los niveles de la colágena  $\alpha$ 1 tipo I retornaron a los niveles que presentaba el grupo control (Figura 5C).

Nuestros datos sugieren que este efecto fue independiente de la Ang II, ya que cuando se pre-incubó a los fibroblastos con los bloqueadores farmacológicos de la Ang II y después se les estimuló con la renina recombinante, se conservó el aumento de las moléculas pro-fibrosantes (Figura 5, panel A y B). Además, la renina incrementó los niveles del RNAm de la  $\alpha$  actina de músculo liso y en los grupos tratados con captopril y losartan no se observó este efecto, así como tampoco se observaron los cambios a nivel proteico cuando se analizaron por western blot (Figura 5, panel D y E).

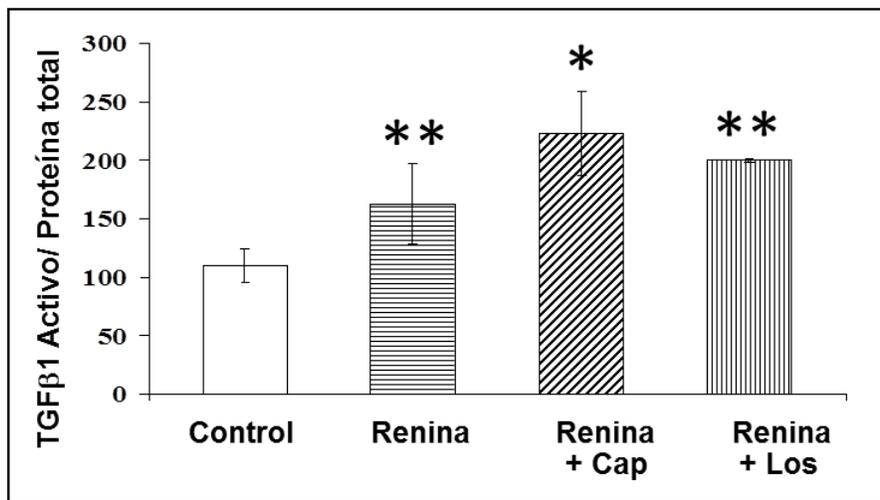
#### **La renina indujo la activación del TGF- $\beta$ 1 de manera independiente de la Ang II.**

Los fibroblastos fueron incubados con la renina para evaluar los niveles del TGF- $\beta$ 1 activo en medio condicionado. Como se muestra en la figura 6, la renina incrementó de manera significativa los niveles del TGF- $\beta$ 1 activo, además este aumento se mantuvo aun con el uso de captopril y losartan.

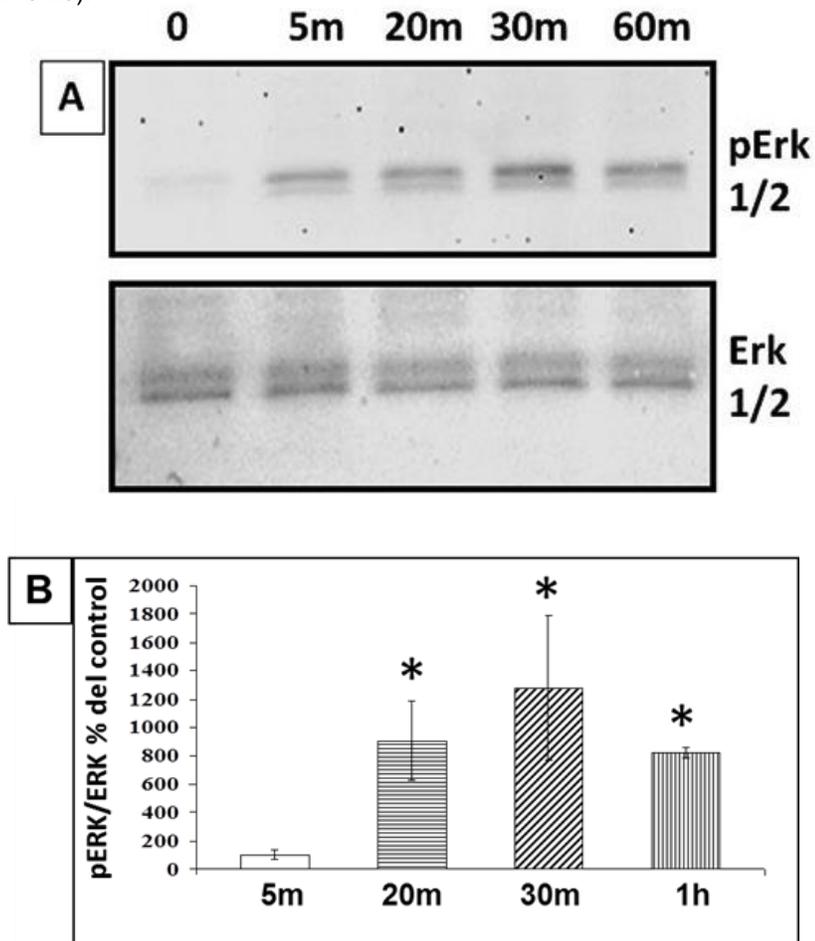
Se ha reportado que el incremento en la producción del TGF- $\beta$ 1 por la renina es por medio de la fosforilación de las MAP cinasas ERK 1 / 2. Por lo que se incubaron fibroblastos con la renina y se realizaron extractos celulares totales, se evaluaron por western blot los niveles de fosforilación de ERK 1 / 2, como se observa en la figura 7, se detectó un aumento significativo en la fosforilación estas cinasas entre los 20-30 min.



**FIGURA 5.** **Panel A)** El estímulo con la renina aumenta de manera significativa los niveles del TGFβ 1 (\*\*P<0.05). **Panel B)** colágena α1 tipo I (\*P<0.01). **Panel D)** α actina de músculo liso (\*P<0.01). Cuando se pre-trata a las células con captopril o losartan y se estimulan con la renina el aumento se mantiene, sugiriendo que este aumento es de manera independiente de la generación de angiotensina II. **Panel C)** Cuando se bloquea al receptor de la renina con un anticuerpo, este bloquea los efectos sobre la colágena α1 tipo I (\*P<0.01). **Panel E)** se muestra un western blot para la α actina de músculo liso en el cual no se hallaron diferencias significativas en los niveles de esta proteína.



**FIGURA 6.** La renina aumenta de manera significativa los niveles del TGF-β1 activo en medio condicionado obtenido de fibroblastos incubados con la renina recombinante (\*\*P<0.05). El bloqueo con captopril y losartan también aumentan la cantidad de TGF-β1 (\*P<0.01 y P\*\*<0.05 respectivamente).

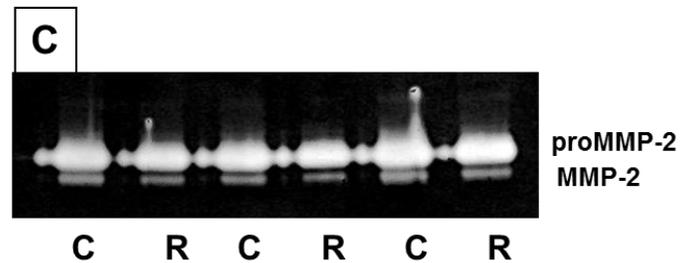
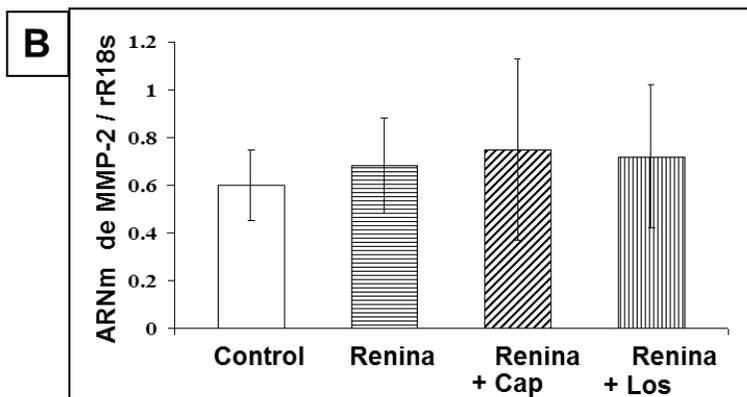
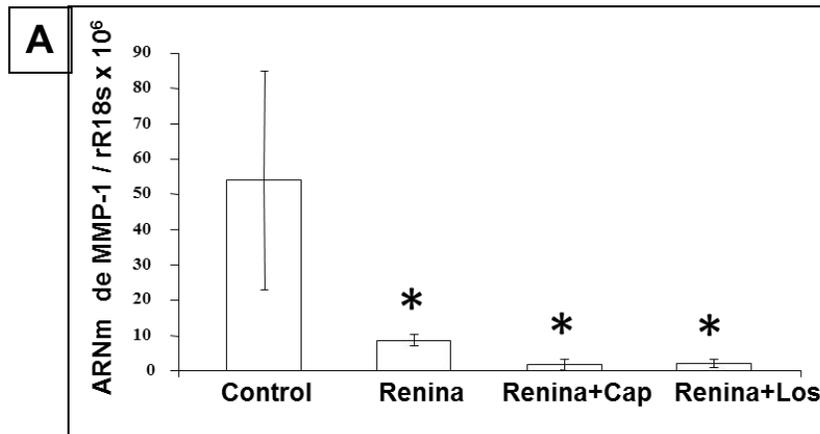


**FIGURA 7. Panel A)** El estímulo de la renina en los fibroblastos pulmonares, induce un aumento en la fosforilación de ERK 1 / 2. **Panel B)** El análisis de densitometría muestra un pico máximo a los 30 min. que empieza a decaer a los 60 min. del estímulo.

**La renina disminuyó la expresión de la MMP1, pero no afectó la expresión de la MMP2.**

Debido al papel fundamental que en la FPI desempeña el equilibrio entre la síntesis y la degradación de las proteínas de matriz extracelular. Se midió la expresión de 2 metaloproteínas de matriz la MMP1 y la MMP2. La renina disminuyó el nivel de expresión de la MMP1 y no tuvo efecto en el mensajero de la MMP2, así como en su actividad gelatinolítica (Figura 8, panel A, B y

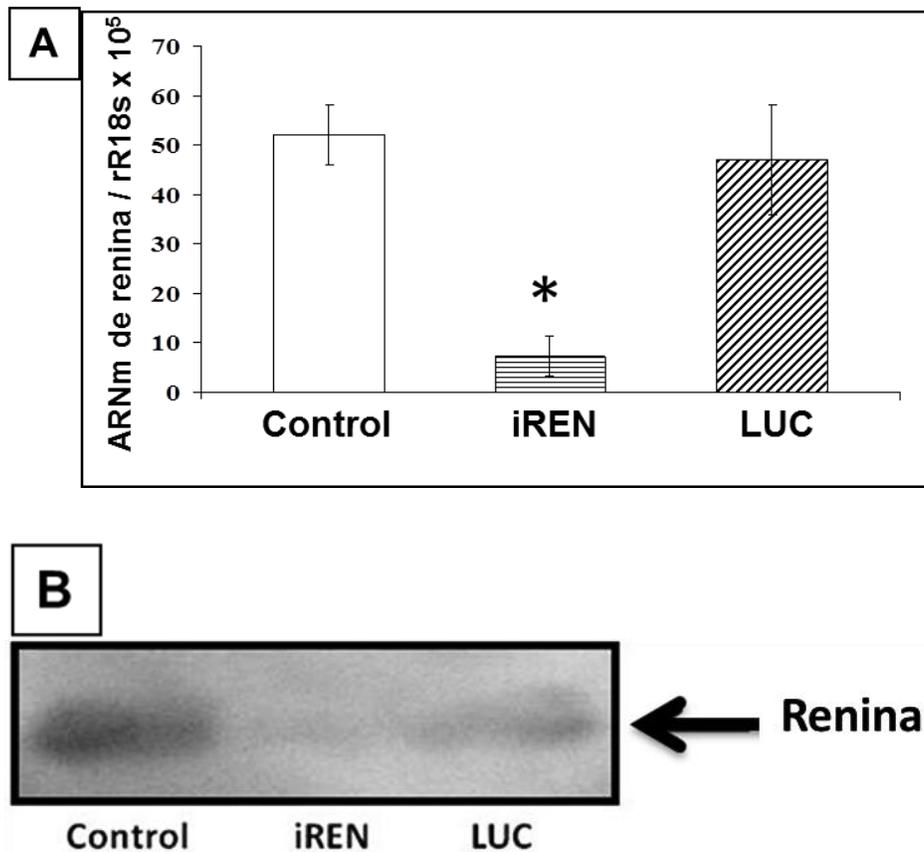
C).



**FIGURA 8. Panel A)** Se muestran los niveles de expresión en fibroblastos pulmonares de la MMP1 después de ser incubados con la renina, hay una disminución significativa del RNAm de la MMP1 ( $P < 0.01$ ). **Panel B y C)** Se observa que la renina no tiene efecto sobre los niveles de expresión de la MMP2 y tampoco en la actividad gelatinolítica (C=control y R= incubados con renina) respectivamente.

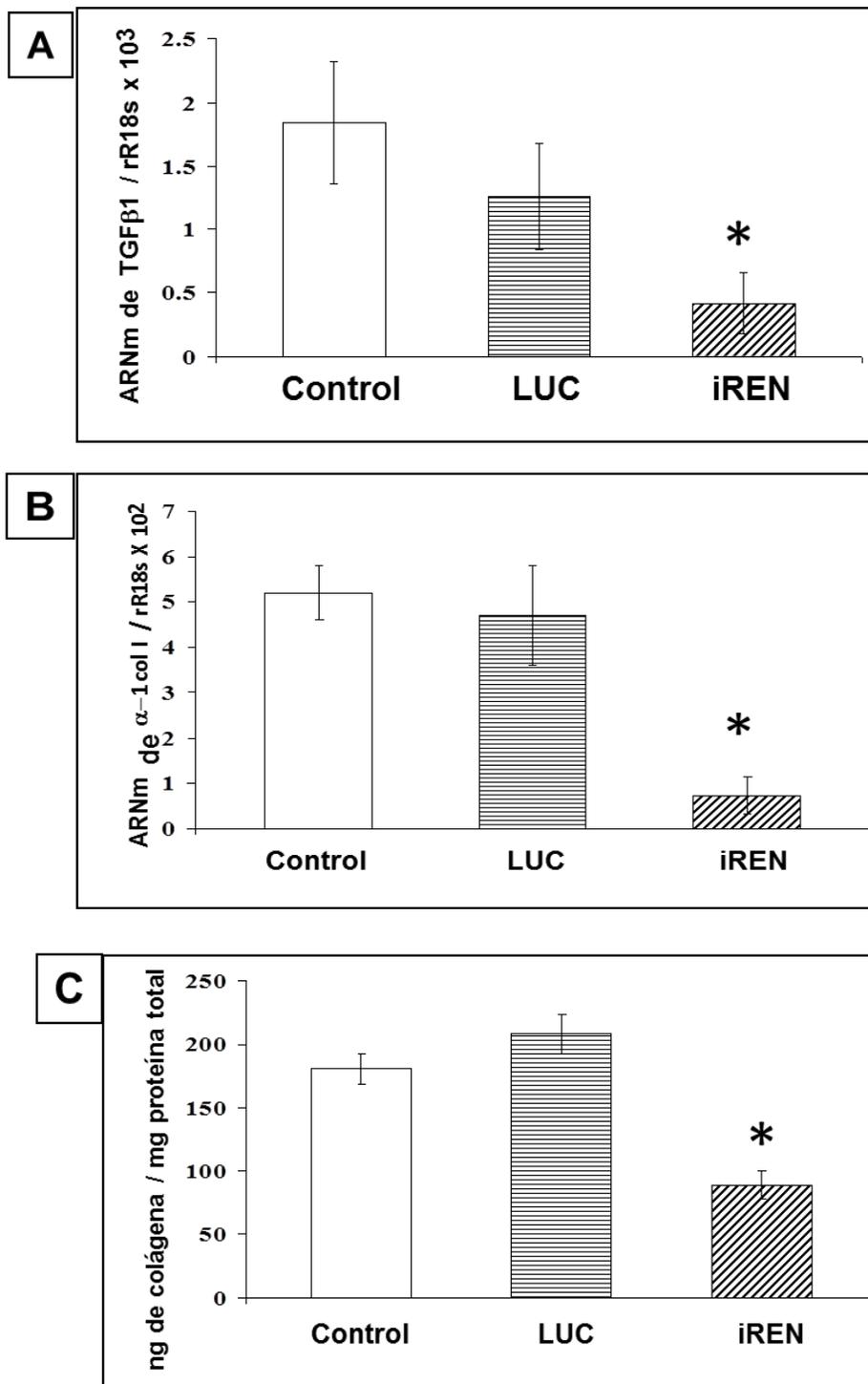
**La inhibición de la renina aminoró los niveles de TGF- $\beta$ 1 y de la colágena  $\alpha$  1 tipo I.**

Para evaluar la importancia de la ausencia de la renina, los fibroblastos fueron tratados con un RNA de interferencia dirigido contra la renina. Para comprobar la efectividad del RNA de interferencia se midió el RNAm de la renina por PCR en tiempo real y la proteína por western Blot (Figura 9, panel A y B respectivamente). El bloqueo de la renina disminuyó la expresión del TGF- $\beta$ 1 y de la colágena  $\alpha$ 1 tipo I (también a nivel de proteína) figura 10, panel A, B y C.



**FIGURA 9.** Niveles de expresión de la renina en fibroblastos pulmonares tratados con el RNA de interferencia contra la renina. Grupos de análisis: control, iREN (células que expresan el RNA de interferencia) y LUC (células que expresan el vector de la luciferasa, como control de la infección).

**Panel A)** El RNA de interferencia disminuyó la expresión de la renina a nivel del RNAm. **Panel B)** Se observa nivel proteico de la renina evaluado por western blot.



**FIGURA 10. Panel A y B)** El bloqueo de la renina disminuyó los niveles del TGF-β1 y la colágena α1 tipo I de manera significativa (\*P<0.01). **Panel C)** También se inhibió la síntesis de la colágena en medios condicionados procedentes de fibroblastos con la renina inhibida (\*P<0.01).

## DISCUSIÓN.

---

La fibrosis pulmonar idiopática es un padecimiento caracterizado por una excesiva proliferación de fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos, causando un aumento en la producción de proteínas de matriz extracelular como las colágenas tipo I y III [4]. Las causas y los mecanismos patogénicos de esta enfermedad aún son desconocidos, por lo cual es substancial tratar de esclarecer las posibles vías por las cuales esta patología se desarrolla.

En la FPI hay un aumento de diversas citocinas y factores de crecimiento que favorecen un microambiente pro-fibrosante, se ha demostrado que el TGF- $\beta$ 1 juega un papel importante en la patogénesis de la FPI ya que induce el depósito de proteínas de matriz extracelular, incrementa la activación de los fibroblastos y su posterior diferenciación a miofibroblastos [9]. Por lo que es importante analizar los factores que están induciendo su aumento en la FPI.

Varios reportes han demostrado que el sistema renina angiotensina forma parte de los mecanismos que están involucrados en el desarrollo de la FPI mediante su principal efector la Ang II. Se sabe que la Ang II puede inducir apoptosis del epitelio alveolar y aumentar la expresión del TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos [13, 18].

Sin embargo, no se había descrito nada acerca de la participación de la renina en la FPI; en este trabajo se demuestra por primera vez que la renina y su receptor se expresan en tejido pulmonar total y de manera específica que los fibroblastos derivados de biopsias de pulmón expresan a la renina y a su receptor. No solo producen estas dos proteínas, sino que la renina se encuentra aumentada en pacientes con diagnóstico de FPI, tanto en tejido pulmonar como en fibroblastos.

La expresión del gen de renina está sujeta a una compleja regulación tejido específica, éste es esencialmente de respuesta a AMPc (adenosín monofosfato cíclico). Borensztein P. et al. describió en 1994 la presencia de una secuencia funcional del promotor de la renina que se encuentra en la posición -226 a la -219 que responde al factor de transcripción CREB, el aumento del AMPc activa a la PKA, que a su vez fosforila a CREB, ésta recluta a CBP y se unen a la secuencia CRE

del promotor del gen de la renina induciendo su actividad [106, 107]. En la FPI Liu Xiaoqiu et, al. reportó que los fibroblastos procedentes de pacientes con FPI tienen mayor cantidad de CREB en su forma fosforilada con respecto a los controles; proceso por el cual pudiera verse afectada la expresión de la renina [108]. También en la región proximal de su promotor se encuentra una secuencia que es reconocida por el factor de transcripción CBF-1 y un sitio para el factor Ets-1, que es regulado por la vía de señalización de Notch, esta vía está incrementada en la FPI y se ha reportado que induce el cambio de fibroblastos a miofibroblastos y también estimula la transición epitelio mesénquima [107, 109, 110]. De manera contraria el promotor de la renina se ve regulado negativamente por la vitamina D (vía su receptor VDR/RXR) y a su vez se ha reportado que la vitamina D tiene un efecto anti-profibrosante, inhibiendo la síntesis de la colágena y antagonizando los efectos del TGF- $\beta$ 1 como la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto y la transición epitelio mesénquima [111, 112].

Además los datos encontrados en este trabajo sugieren que la renina vía el RRP inducen la expresión de moléculas pro-fibrosantes en fibroblastos procedentes de tejidos pulmonares normales. Se observó que este efecto fue de manera independiente de la formación de los péptidos de la Ang II, debido a que el bloqueo farmacológico del receptor AT<sub>1</sub> de la Ang II o la inhibición también farmacológica de la enzima convertidora de angiotensina que participa en la formación de la Ang II, no redujeron el efecto del estímulo de la renina sobre la expresión del TGF- $\beta$  1 y la colágena  $\alpha$ 1 tipo I. Para la  $\alpha$ -actina de músculo liso, solo se observó un aumento en el grupo tratado sólo con renina y en los grupos con el inhibidor de la ACE y el antagonista del receptor AT<sub>1</sub> se disminuyó el efecto de la renina, esto sugiere que el aumento puede ser por un mecanismo dependiente de la angiotensina II, figuras 5 (panel A, B y D).

Un hallazgo sumamente interesante es que la renina no solo incrementó la cantidad del TGF- $\beta$ 1, a nivel del RNA mensajero sino que, aumentó la cantidad de este factor ya activo, es decir liberado del complejo del LAP y el LTBP (figura 6). Las enzimas que pueden activar al TGF- $\beta$ 1 son varias: la plasmina, la trombina, la elastasa, las metaloproteínas de matriz MMP2, MMP9 y MMP13, estas últimas están incrementadas en la FPI. El estímulo con la renina recombinante no modificó

los niveles de expresión de la MMP2, pero sería importante analizar las diferentes enzimas activadoras del TGF- $\beta$ 1, para saber cuál se ve modificada por el efecto de la renina [21, 113, 114].

Se ha descrito en varios tipos celulares que el mecanismo por el cual la renina induce el aumento en la producción del TGF- $\beta$ 1 es a través de ERK 1 / 2, nuestros datos sugieren que en la FPI también se activa esta vía con el estímulo de la renina (Figura 7).

Se observó un aumento en los niveles del RNAm de la renina, así que buscamos cual sería el efecto de la ausencia de ésta sobre la expresión de moléculas pro-fibrosantes, por lo que se inhibió su expresión mediante un RNA de interferencia. Observamos que hubo una disminución significativa de la expresión del TGF- $\beta$ 1, aunque en este caso no se puede atribuir el efecto únicamente a la renina y su receptor, porque la renina también afecta la generación de la Ang II que se ha demostrado aumenta los niveles del TGF- $\beta$ 1. Igualmente la ausencia de la renina disminuyó la expresión de la colágena I y por otro lado la inhibición del receptor de la renina, mediado por un anticuerpo antagonista, también aminoró los niveles de la colágena I, sugiriendo que el RRP puede directamente afectar la producción de esta proteína (figuras 5C y 10B). Se ha reportado que la renina incrementa la expresión de la proteína p85  $\alpha$ , subunidad del fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K- p85  $\alpha$ ) y se conoce que el PI3K induce la elevación de la colágena tipo I en fibroblastos de pulmón.

El equilibrio entre la generación de la matriz extracelular y su degradación es un punto medular en un padecimiento como la FPI. Las proteínas de matriz extracelular, principalmente las colágenas fibrilares, son degradadas por la metaloproteínasa de matriz 1. La renina disminuyó la expresión de la MMP1 de manera significativa en los fibroblastos, efecto parecido al que causa el estímulo del TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos pulmonares, disminuyendo la capacidad de los fibroblastos para degradar la colágena intersticial que se acumula de manera excesiva en el pulmón. [32].

En el caso de la MMP2, los fibroblastos incubados con la renina no modificaron los niveles de RNAm de esta MMP, ni su actividad gelatinolítica, este efecto ya se había reportado en células del epitelio ocular pigmentado, en donde el RRP no influyó en la actividad de la MMP2. Aunque el efecto del RRP sobre la MMP2 aún no es claro, recientemente Funke-Kaiser H., et al. (2013)

mediante un estudio de microarreglos reportaron que la ausencia del RRP por un RNA de interferencia aumenta los niveles de la MMP2, esto es importante porque la MMP2 está aumentada en la FPI y se le ha asociado con la capacidad invasiva de los fibroblastos [80]. En otro estudio de microarreglos en cardiomiócitos se reportó que el RRP elevó los niveles del inhibidor de metaloproteínas de matriz 1 (TIMP 1), en la FPI los TIMP 1, 2, 3, 4 están elevados en tejidos procedentes de pacientes con FPI y en modelos experimentales con bleomicina el TIMP 1 se encuentra incrementado [94, 115, 116].

## CONCLUSIONES

---

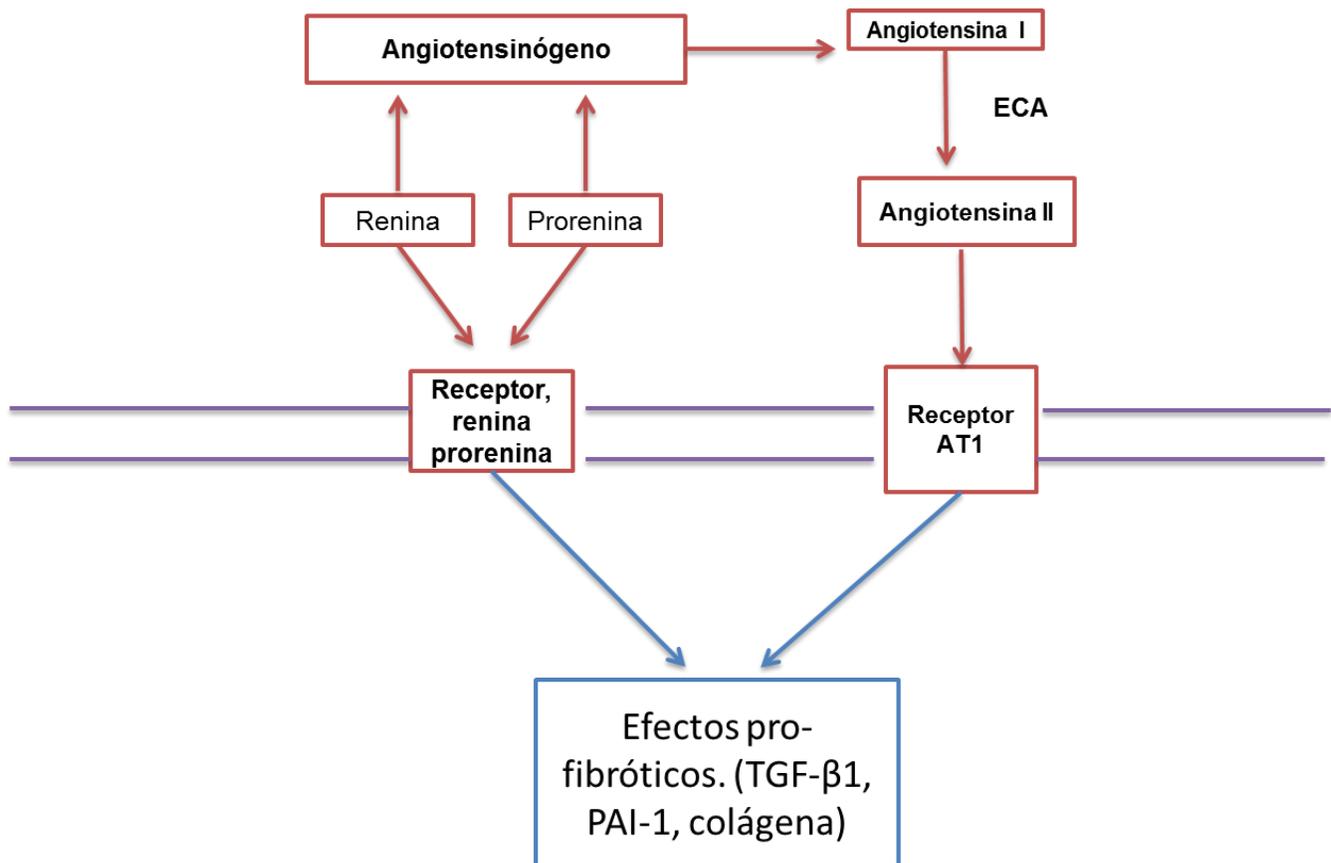
Nuestra conclusión es que, el sistema renina angiotensina posee 3 mecanismos para la generación de un microambiente fibrótico. 1) El aumento de los niveles de la renina incrementarían los niveles de la Ang II, lo cual induciría un incremento en la expresión del TGF- $\beta$ 1 y la colágena I. 2) Con la presencia del receptor de la renina se provee una segunda alternativa que podría contribuir a la producción de la angiotensina I por medio de la activación de la pro-renina, que se ha demostrado se activa y es capaz de procesar al angiotensinógeno generando Ang I [83]. 3) El RRP con su ligando puede incrementar los niveles de TGF- $\beta$ 1 como ya se demostró en nuestros resultados, siendo una fuente adicional de inducción del TGF $\beta$ 1 y de la colágena I (esquema 4).

El sistema renina angiotensina por mucho tiempo se consideró solo como un regulador de la presión arterial sistémica y también se asumió que la angiotensina II era el único efector del sistema. El hallazgo del RRP abre una ventana para explorar rutas de señalización nuevas, cuyo estudio podrá ampliar el conocimiento en el proceso de inducción de la expresión de genes pro-fibrosantes y de los mecanismos que contribuyen a la progresión de la enfermedad, además de usar de mejor manera los bloqueadores del sistema renina-angiotensina ya que en conjunto la renina/RRP y la AngII/AT<sub>1</sub> convergen y modulan vías que promueven la FPI.

En 2009 se reportó una forma soluble del RRP, es decir, el receptor completo de 35kDa, es cortado dentro de la célula y secretado al espacio extracelular (28 kDa). La función de esta forma del receptor aún no está descrita, pero se conoce que es capaz de unirse a renina y prorenina, al unirse a prorenina puede activarla liberando su sitio catalítico, por lo que sería interesante explorar su función en la FPI. [117, 118].

Por los hallazgos en este trabajo y por lo reportado en la literatura, el estudio del efecto de la renina en la FPI puede darnos más respuestas acerca de los mecanismos patogénicos de la enfermedad y también se aporta un posible blanco terapéutico para esta patología tan agresiva y sin tratamiento.

Por otra parte, los niveles de la renina en suero o en lavado bronquiolo-alveolar pueden servir como un biomarcador de diagnóstico y pronóstico de la FPI. La necesidad de biomarcadores en la FPI es principalmente porque, el criterio de diagnóstico es muy especializado ya que requiere tomografía de alta resolución y en muchos casos una biopsia pulmonar que debe ser interpretada por patólogos expertos en enfermedades intersticiales, sin embargo, este tipo de atención sólo se consigue en centros especializados que geográficamente están distantes para los pacientes y muy pocas veces son remitidos a éstos. [88, 119].



**Esquema 4.** Se muestra como tanto la renina y la angiotensina II participan en la patogénesis de la FPI promoviendo el microambiente pro-fibrosante coincidiendo en la producción de moléculas que promueven procesos pro-fibróticos.

## REFERENCIAS

1. Pardo, A. and M. Selman, *Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d1743-61.
2. Selman, M. and A. Pardo, *Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder*. Respir Res, 2002. **3**: p. 3.
3. Selman, M., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy*. Ann Intern Med, 2001. **134**(2): p. 136-51.
4. Pardo, A. and M. Selman, *Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(12): p. 1534-8.
5. Selman, M., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches*. Drugs, 2004. **64**(4): p. 405-30.
6. Raghu, G., et al., *An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(6): p. 788-824.
7. King, T.E., Jr., A. Pardo, and M. Selman, *Idiopathic pulmonary fibrosis*. Lancet, 2011. **378**(9807): p. 1949-61.
8. Dempsey, O.J., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis: an update*. QJM, 2006. **99**(10): p. 643-54.
9. Strieter, R.M. and B. Mehrad, *New mechanisms of pulmonary fibrosis*. Chest, 2009. **136**(5): p. 1364-70.
10. Pan, L.H., et al., *Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF*. Eur Respir J, 2001. **17**(6): p. 1220-7.
11. Garcia-de-Alba, C., et al., *Expression of matrix metalloproteases by fibrocytes: possible role in migration and homing*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**(9): p. 1144-52.
12. Dobbs, L.G., et al., *The great big alveolar TI cell: evolving concepts and paradigms*. Cell Physiol Biochem, 2010. **25**(1): p. 55-62.
13. Tanjore, H., T.S. Blackwell, and W.E. Lawson, *Emerging evidence for endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. **302**(8): p. L721-9.
14. Drakopanagiotakis, F., et al., *Apoptosis in lung injury and fibrosis*. Eur Respir J, 2008. **32**(6): p. 1631-8.

15. Senoo, T., et al., *Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA interference attenuates pulmonary fibrosis*. Thorax, 2010. **65**(4): p. 334-40.
16. Geiser, T., *Idiopathic pulmonary fibrosis--a disorder of alveolar wound repair?* Swiss Med Wkly, 2003. **133**(29-30): p. 405-11.
17. Kotani, I., et al., *Increased procoagulant and antifibrinolytic activities in the lungs with idiopathic pulmonary fibrosis*. Thromb Res, 1995. **77**(6): p. 493-504.
18. Pardo, A. and M. Selman, *Matrix metalloproteinases in aberrant fibrotic tissue remodeling*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(4): p. 383-8.
19. Kim, S.H., J. Turnbull, and S. Guimond, *Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor*. J Endocrinol, 2011. **209**(2): p. 139-51.
20. Fanjul-Fernandez, M., et al., *Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(1): p. 3-19.
21. Pardo, A., M. Selman, and N. Kaminski, *Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1141-55.
22. Loffek, S., O. Schilling, and C.W. Franzke, *Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance*. Eur Respir J, 2011. **38**(1): p. 191-208.
23. Winkler, M.K. and J.L. Fowlkes, *Metalloproteinase and growth factor interactions: do they play a role in pulmonary fibrosis?* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(1): p. L1-11.
24. Wells, R.G., *Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279**(5): p. G845-50.
25. Koli, K., et al., *Transforming growth factor-beta activation in the lung: focus on fibrosis and reactive oxygen species*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(2): p. 333-42.
26. Poncelet, A.C. and H.W. Schnaper, *Sp1 and Smad proteins cooperate to mediate transforming growth factor-beta 1-induced alpha 2(I) collagen expression in human glomerular mesangial cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 6983-92.
27. Ghosh, A.K., *Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis*. Exp Biol Med (Maywood), 2002. **227**(5): p. 301-14.
28. Chen, S.J., et al., *Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(1): p. 49-57.

29. Ryer, E.J., et al., *PKCdelta is necessary for Smad3 expression and transforming growth factor beta-induced fibronectin synthesis in vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(4): p. 780-6.
30. Peng, F., et al., *TGFbeta-induced RhoA activation and fibronectin production in mesangial cells require caveolae*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. **295**(1): p. F153-64.
31. Gruden, G., et al., *Mechanical stretch-induced fibronectin and transforming growth factor-beta1 production in human mesangial cells is p38 mitogen-activated protein kinase-dependent*. *Diabetes*, 2000. **49**(4): p. 655-61.
32. Eickelberg, O., et al., *Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(5 Pt 1): p. L814-24.
33. Miettinen, P.J., et al., *TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors*. *J Cell Biol*, 1994. **127**(6 Pt 2): p. 2021-36.
34. Willis, B.C. and Z. Borok, *TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. **293**(3): p. L525-34.
35. Aomatsu, K., et al., *TGF-beta induces sustained upregulation of SNAI1 and SNAI2 through Smad and non-Smad pathways in a human corneal epithelial cell line*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011. **52**(5): p. 2437-43.
36. Zhao, Y. and S.L. Young, *Requirement of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type II receptor for TGF-beta-induced proliferation and growth inhibition*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(5): p. 2369-72.
37. Fine, A. and R.H. Goldstein, *The effect of transforming growth factor-beta on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts*. *J Biol Chem*, 1987. **262**(8): p. 3897-902.
38. Khalil, N., et al., *Proliferation of pulmonary interstitial fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta1-induced release of extracellular fibroblast growth factor-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(52): p. 43000-9.
39. Fuentes-Calvo, I., et al., *H-Ras isoform modulates extracellular matrix synthesis, proliferation, and migration in fibroblasts*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012. **302**(4): p. C686-97.

40. Ramos, C., et al., *Acidic fibroblast growth factor decreases alpha-smooth muscle actin expression and induces apoptosis in human normal lung fibroblasts*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **291**(5): p. L871-9.
41. Hautmann, M.B., C.S. Madsen, and G.K. Owens, *A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CArG elements*. J Biol Chem, 1997. **272**(16): p. 10948-56.
42. Powell, D.W., et al., *Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease*. Am J Physiol, 1999. **277**(1 Pt 1): p. C1-9.
43. Folger, P.A., et al., *Transforming growth factor-beta-stimulated connective tissue growth factor expression during corneal myofibroblast differentiation*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(11): p. 2534-41.
44. Jiang, Z., et al., *TGF-beta- and CTGF-mediated fibroblast recruitment influences early outward vein graft remodeling*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H482-8.
45. Uhal, B.D., et al., *Angiotensin-TGF-beta 1 crosstalk in human idiopathic pulmonary fibrosis: autocrine mechanisms in myofibroblasts and macrophages*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(12): p. 1247-56.
46. Maher, T.M., *Idiopathic pulmonary fibrosis: pathobiology of novel approaches to treatment*. Clin Chest Med, 2012. **33**(1): p. 69-83.
47. Leask, A. and D.J. Abraham, *TGF-beta signaling and the fibrotic response*. FASEB J, 2004. **18**(7): p. 816-27.
48. Lavoie, J.L. and C.D. Sigmund, *Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system*. Endocrinology, 2003. **144**(6): p. 2179-83.
49. Paul, M., A. Poyan Mehr, and R. Kreutz, *Physiology of local renin-angiotensin systems*. Physiol Rev, 2006. **86**(3): p. 747-803.
50. Mehta, P.K. and K.K. Griendling, *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C82-97.
51. Leung, P.S., *Circulating RAS*. Adv Exp Med Biol, 2010. **690**: p. 55-68.
52. Uhal, B.D., et al., *Angiotensin signalling in pulmonary fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(3): p. 465-8.

53. Wang, R., et al., *Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 1): p. L1158-64.
54. Li, X., et al., *Extravascular sources of lung angiotensin peptide synthesis in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **291**(5): p. L887-95.
55. Ruster, C. and G. Wolf, *Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(7): p. 1189-99.
56. Gabriel, V.A., *Transforming growth factor-beta and angiotensin in fibrosis and burn injuries*. J Burn Care Res, 2009. **30**(3): p. 471-81.
57. Uhal, B.D., et al., *Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro*. Am J Physiol, 1995. **269**(6 Pt 1): p. L819-28.
58. Day, R.M., et al., *Angiotensin II activates AMPK for execution of apoptosis through energy-dependent and -independent mechanisms*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **301**(5): p. L772-81.
59. Vivar, R., et al., *Phospholipase C/protein kinase C pathway mediates angiotensin II-dependent apoptosis in neonatal rat cardiac fibroblasts expressing AT1 receptor*. J Cardiovasc Pharmacol, 2008. **52**(2): p. 184-90.
60. Ding, G., et al., *Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(1): p. F173-80.
61. Gesualdo, L., et al., *Angiotensin IV stimulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in proximal tubular epithelial cells*. Kidney Int, 1999. **56**(2): p. 461-70.
62. Li, Y.D., E.R. Block, and J.M. Patel, *Activation of multiple signaling modules is critical in angiotensin IV-induced lung endothelial cell proliferation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(4): p. L707-16.
63. Esteban, V., et al., *Angiotensin IV activates the nuclear transcription factor-kappaB and related proinflammatory genes in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 2005. **96**(9): p. 965-73.
64. Numaguchi, Y., et al., *Ablation of angiotensin IV receptor attenuates hypofibrinolysis via PAI-1 downregulation and reduces occlusive arterial thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(12): p. 2102-8.
65. Lijnen, P., et al., *Stimulation of collagen gel contraction by angiotensin II and III in cardiac fibroblasts*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2002. **3**(3): p. 160-6.

66. Blume, A., et al., *ANG III induces expression of inducible transcription factors of AP-1 and Krox families in rat brain*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005. **289**(3): p. R845-50.
67. Clark, M.A., H. Tran, and C. Nguyen, *Angiotensin III stimulates ERK1/2 mitogen-activated protein kinases and astrocyte growth in cultured rat astrocytes*. *Neuropeptides*, 2011. **45**(5): p. 329-35.
68. Wang, H.X., et al., *Effects of angiotensin III on protein, DNA, and collagen synthesis of neonatal cardiomyocytes and cardiac fibroblasts in vitro*. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2010. **15**(4): p. 393-402.
69. Clark, M.A., C. Nguyen, and H. Tran, *Angiotensin III induces c-Jun N-terminal kinase leading to proliferation of rat astrocytes*. *Neurochem Res*, 2012. **37**(7): p. 1475-81.
70. Dominska, K., et al., *Similarities and differences between effects of angiotensin III and angiotensin II on human prostate cancer cell migration and proliferation*. *Peptides*, 2012. **37**(2): p. 200-6.
71. Lu, Y., et al., *Phosphatidylinositol-3-kinase/akt regulates bleomycin-induced fibroblast proliferation and collagen production*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010. **42**(4): p. 432-41.
72. Le Cras, T.D., et al., *Inhibition of PI3K by PX-866 prevents transforming growth factor-alpha-induced pulmonary fibrosis*. *Am J Pathol*, 2010. **176**(2): p. 679-86.
73. Nguyen, G., et al., *Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(11): p. 1417-27.
74. Nguyen, G. and A.H. Danser, *Prorenin and (pro)renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents*. *Exp Physiol*, 2008. **93**(5): p. 557-63.
75. Ichihara, A., *(Pro)renin receptor and vacuolar H(+)-ATPase*. *Keio J Med*, 2012. **61**(3): p. 73-8.
76. Huang, Y., et al., *Renin-stimulated TGF-beta1 expression is regulated by a mitogen-activated protein kinase in mesangial cells*. *Kidney Int*, 2007. **72**(1): p. 45-52.
77. Huang, Y., et al., *Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms*. *Kidney Int*, 2006. **69**(1): p. 105-13.

78. Melnyk, R.A., et al., *Renin and prorenin activate pathways implicated in organ damage in human mesangial cells independent of angiotensin II production*. *Am J Nephrol*, 2009. **30**(3): p. 232-43.
79. Sakoda, M., et al., *(Pro)renin receptor-mediated activation of mitogen-activated protein kinases in human vascular smooth muscle cells*. *Hypertens Res*, 2007. **30**(11): p. 1139-46.
80. Alcazar, O., et al., *(Pro)renin receptor is expressed in human retinal pigment epithelium and participates in extracellular matrix remodeling*. *Exp Eye Res*, 2009. **89**(5): p. 638-47.
81. Contrepas, A., et al., *A role of the (pro)renin receptor in neuronal cell differentiation*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009. **297**(2): p. R250-7.
82. Uraoka, M., et al., *Prorenin induces ERK activation in endothelial cells to enhance neovascularization independently of the renin-angiotensin system*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **390**(4): p. 1202-7.
83. Nguyen, G., *The (pro)renin receptor: pathophysiological roles in cardiovascular and renal pathology*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2007. **16**(2): p. 129-33.
84. Kaneko, K., et al., *Expression of (pro)renin receptor in human erythroid cell lines and its increased protein accumulation by interferon-gamma*. *Peptides*, 2012. **37**(2): p. 285-9.
85. Takahashi, K., et al., *In Situ Hybridization Method Reveals (Pro)renin Receptor Expressing Cells in the Pituitary Gland of Rats: Correlation with Anterior Pituitary Hormones*. *Acta Histochem Cytochem*, 2013. **46**(1): p. 47-50.
86. Clavreul, N., et al., *(Pro)renin promotes fibrosis gene expression in HEK cells through a Nox4-dependent mechanism*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011. **300**(6): p. F1310-8.
87. He, M., et al., *Inhibition of renin/prorenin receptor attenuated mesangial cell proliferation and reduced associated fibrotic factor release*. *Eur J Pharmacol*, 2009. **606**(1-3): p. 155-61.
88. Vij, R. and I. Noth, *Peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Transl Res*, 2012. **159**(4): p. 218-27.
89. Schefe, J.H., et al., *A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein*. *Circ Res*, 2006. **99**(12): p. 1355-66.
90. Chaudhary, N.I., et al., *Inhibition of PDGF, VEGF and FGF signalling attenuates fibrosis*. *Eur Respir J*, 2007. **29**(5): p. 976-85.

91. Kanda, A., et al., *(Pro)renin receptor is associated with angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy*. Diabetologia, 2012. **55**(11): p. 3104-13.
92. Peltonen, T., et al., *(Pro)renin receptors and angiotensin converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis in human aortic valve stenosis*. Atherosclerosis, 2011. **216**(1): p. 35-43.
93. Ghayour-Mobarhan, M., H. Saber, and G.A. Ferns, *The potential role of heat shock protein 27 in cardiovascular disease*. Clin Chim Acta, 2012. **413**(1-2): p. 15-24.
94. Saris, J.J., et al., *Prorenin induces intracellular signaling in cardiomyocytes independently of angiotensin II*. Hypertension, 2006. **48**(4): p. 564-71.
95. Matavelli, L.C., J. Huang, and H.M. Siragy, *(Pro)renin receptor contributes to diabetic nephropathy by enhancing renal inflammation*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010. **37**(3): p. 277-82.
96. Greco, C.M., et al., *Chemotactic effect of prorenin on human aortic smooth muscle cells: a novel function of the (pro)renin receptor*. Cardiovasc Res, 2012. **95**(3): p. 366-74.
97. Shibayama, Y., et al., *Role of (pro)renin receptor in Ang II-mediated EGF receptor transactivation*. Front Biosci (Elite Ed), 2013. **5**: p. 697-705.
98. Huang, J., L.C. Matavelli, and H.M. Siragy, *Renal (pro)renin receptor contributes to development of diabetic kidney disease through transforming growth factor-beta1-connective tissue growth factor signalling cascade*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011. **38**(4): p. 215-21.
99. Peng, H., et al., *(Pro)renin Receptor Mediates Both Angiotensin II-Dependent and -Independent Oxidative Stress in Neuronal Cells*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58339.
100. Hetzel, M., et al., *Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts*. Lung, 2005. **183**(4): p. 225-37.
101. Konigshoff, M., et al., *Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis*. PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2142.
102. Salazar, K.D., S.M. Lankford, and A.R. Brody, *Mesenchymal stem cells produce Wnt isoforms and TGF-beta1 that mediate proliferation and procollagen expression by lung fibroblasts*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **297**(5): p. L1002-11.
103. Bernhard, S.M., et al., *The (pro)renin receptor ((P)RR) can act as a repressor of Wnt signalling*. Biochem Pharmacol, 2012. **84**(12): p. 1643-50.

104. Cruciat, C.M., et al., *Requirement of prorenin receptor and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling*. Science, 2010. **327**(5964): p. 459-63.
105. Huang, J. and H.M. Siragy, *Regulation of (pro)renin receptor expression by glucose-induced mitogen-activated protein kinase, nuclear factor-kappaB, and activator protein-1 signaling pathways*. Endocrinology, 2010. **151**(7): p. 3317-25.
106. Borensztein, P., et al., *cis-regulatory elements and trans-acting factors directing basal and cAMP-stimulated human renin gene expression in chorionic cells*. Circ Res, 1994. **74**(5): p. 764-73.
107. Pan, L. and K.W. Gross, *Transcriptional regulation of renin: an update*. Hypertension, 2005. **45**(1): p. 3-8.
108. Liu, X., S.Q. Sun, and R.S. Ostrom, *Fibrotic lung fibroblasts show blunted inhibition by cAMP due to deficient cAMP response element-binding protein phosphorylation*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **315**(2): p. 678-87.
109. Pan, L., et al., *Activation of the rat renin promoter by HOXD10.PBX1b.PREP1, Ets-1, and the intracellular domain of notch*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20860-6.
110. Matsuno, Y., et al., *Notch signaling mediates TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition through the induction of Snai1*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(5): p. 776-89.
111. Ramirez, A.M., et al., *Vitamin D inhibition of pro-fibrotic effects of transforming growth factor beta1 in lung fibroblasts and epithelial cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **118**(3): p. 142-50.
112. Li, Y.C., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system*. J Clin Invest, 2002. **110**(2): p. 229-38.
113. Perez-Ramos, J., et al., *Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(4): p. 1274-82.
114. Jenkins, G., *The role of proteases in transforming growth factor-beta activation*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1068-78.
115. Selman, M., et al., *TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment?* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(3): p. L562-74.
116. Ruiz, V., et al., *Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **285**(5): p. L1026-36.

117. Cousin, C., et al., *Soluble form of the (pro)renin receptor generated by intracellular cleavage by furin is secreted in plasma*. Hypertension, 2009. **53**(6): p. 1077-82.
118. Biswas, K.B., et al., *Qualitative and quantitative analyses of (pro)renin receptor in the medium of cultured human umbilical vein endothelial cells*. Hypertens Res, 2011. **34**(6): p. 735-9.
119. Thomeer, M., et al., *Clinical use of biomarkers of survival in pulmonary fibrosis*. Respir Res, 2010. **11**: p. 89.