



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**LOCALIZACIÓN DE LA RENINA INTRACELULAR EN
FIBROBLASTOS PULMONARES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

ISABEL CATALÁN PEREDA



**DIRECTOR: DR. EDUARDO MONTES MARTÍNEZ
ASESOR: DRA. ISABEL SOTO CRUZ**

2016

México, D. F.



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.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza” por contribuir en mi formación profesional.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, al laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación y a todos los que lo integran, en especial al Dr. Víctor Ruiz por la oportunidad y el apoyo.

A mi director de tesis, el Dr. Eduardo Montes por compartir sus conocimientos, por su paciencia, comprensión y aliento que llevaron a la culminación de este trabajo.

A la Dra. Isabel Soto, la Dra. Teresa Corona, A la Q.F.B. Adriana Hernández y al Mtro. Valentín Islas por el tiempo que dedicaron en la revisión de este trabajo.

Dedicatoria

A mi madre y padre por haberme enseñado lo valioso de los sueños cuando se consiguen con el corazón arraigado a la esperanza, la paciencia, el amor y la lucha constante y por haber creído en mí al apoyarme todo este tiempo en todas las formas para alcanzar esta meta.

A mis hermanos Itzel, Carlos y Pablo por ser la chispa en mi vida, por compartir alegrías y tristezas, por ser además de todo, mis amigos.

A mis amigas y amigos

A Arturo y nuestra nueva familia, que son mi fortuna.

Contenido

Resumen	5
Marco teórico.....	6
Fibrosis Pulmonar	6
Fibrosis pulmonar idiopática	7
Diagnóstico de la FPI	8
Etiología/Factores de riesgo	9
Mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la FPI	10
La Matriz extracelular (MEC)	14
Las Metaloproteasas de matriz (MMPs).....	14
Fibroblastos y fibrosis	15
Sistema Renina Angiotensina sistémico	16
Renina: características y participación en la FPI	18
Sistema Renina Angiotensina intracelular.....	19
Las proteínas activadas por mitógenos (MAP cinasas)	22
Interacciones proteína-proteína	25
Planteamiento del problema:.....	29
Hipótesis.....	30
Objetivos	31
Objetivo General	31
Objetivos particulares.....	31
Diseño experimental.....	32
Materiales.....	33
Métodos	35
Diagrama de flujo de los métodos experimentales	39
Resultados	40
Análisis de resultados	47
Conclusiones.....	50
Perspectivas.....	51
Referencias	52

Resumen

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad crónica, progresiva, irreversible y letal de etiología desconocida. Se ha propuesto la vía epitelial en el desarrollo de la FPI, en donde hay un daño que trae como consecuencia la posterior activación del epitelio alveolar; dando como resultado la sobreexpresión de diversas citocinas y factores de crecimiento con la subsecuente destrucción de la arquitectura pulmonar.(1, 2)

Se ha reportado que el sistema renina angiotensina (SRA) parece tener un papel importante en la fibrogénesis por el efecto de la Angiotensina II, que induce apoptosis en las células epiteliales alveolares; y por efecto de la renina que activa la vía de ERK1/2 resultando en el incremento de la proliferación celular y la sobreexpresión del TGF- β 1, la colágena I y el Inhibidor del activador del plasminógeno 1 (moléculas profibróticas).(3)

En años recientes se ha propuesto la existencia de un SRA intracelular y se ha reportado una isoforma de la renina en el medio intracelular, la cual, pierde el péptido señal de exportación, lo que causa que la renina no sea secretada por la célula.(4-6)

Por ello, dado que la renina esta sobreexpresada en la FPI, el objetivo de este trabajo fue localizar a la renina intracelular en fibroblastos pulmonares control y de pacientes con FPI. Se utilizaron técnicas de inmunoblot, co-precipitación y co-localización por inmunofluorescencia. Se demostró que la renina se localiza en el núcleo de las células y que existe una probable interacción con las cinasas ERK1/2.

Marco teórico

Fibrosis Pulmonar

La fibrosis de un órgano se define como: la acumulación en exceso de componentes de la matriz extracelular (acumulación de tejido conectivo fibroso) en un tejido dañado, lo cual puede conducir a una cicatrización permanente. La fibrosis pulmonar es el resultado final de un grupo diverso de desórdenes conocido como enfermedades pulmonares intersticiales difusas, estos desórdenes son progresivos y se caracterizan por el reemplazo del tejido pulmonar con tejido de cicatrización, resultando en la pérdida permanente de la arquitectura alveolar normal, mal funcionamiento del órgano y por último, la muerte por insuficiencia respiratoria o fallo cardiaco debido a hipertensión pulmonar. (1)

Aunque los cambios fibróticos son típicamente conceptualizados como el engrosamiento fibroso del intersticio, una parte importante de la remodelación pulmonar ocurre en los espacios alveolares por lo que sería más apropiado referirse a enfermedades pulmonares difusas del parénquima. (7-9)

Las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID) constituyen un grupo de afecciones con manifestaciones clínicas, radiológicas y funcionales respiratorias similares; las principales alteraciones anatomopatológicas afectan estructuras alveolo-intersticiales y en muchas ocasiones las pequeñas vías respiratorias, así como la vasculatura pulmonar. Su clasificación se establece en el consenso elaborado por la American Thoracic Society (ATS) y la European Respiratory Society (ERS). Algunas de ellas son de etiología conocida, por ejemplo, por exposición a partículas orgánicas (neumonitis por hipersensibilidad), partículas

inorgánicas (asbestosis), inducidas por fármacos o asociadas a enfermedades colágeno-vasculares (artritis reumatoide), sin embargo alrededor del 40-50% de las EPIDs son de etiología desconocida y éstas son clasificadas como neumonías intersticiales idiopáticas. (9, 10)

Fibrosis pulmonar idiopática

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la más común de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas y está clasificada en el grupo de neumonías intersticiales idiopáticas. Se trata de una enfermedad crónica, progresiva, irreversible y letal de causa desconocida (1, 10).

La incidencia y prevalencia global de la FPI es difícil de determinar en muchas áreas geográficas; de manera global solo se cuenta con los datos que provienen de 15 estudios realizados en poblaciones de EUA, Inglaterra y Japón; por el contrario no hay datos de otras regiones como: Sudamérica, África o Australia, en México no existe ningún estudio estadístico al respecto. (11)

La incidencia anual de FPI en EUA fue estimada en 6.8-8.8 casos/100,000 habitantes, mientras en Europa la incidencia anual está en un rango de 0.22-7.4 casos/100,000 habitantes. La prevalencia de la FPI varía según el estudio, en EUA se estima entre 14 y 27.9 casos por 100,000 habitantes, en Europa el rango va de 1.25-23.4 casos/100,000 habitantes.(11)

La prevalencia es ligeramente mayor en hombres que en mujeres. La edad media de diagnóstico es de 66 años, de un rango de 55-77 años. Se estima que la FPI afecta al menos a 5 millones de personas en el mundo y de acuerdo a un estudio

realizado por Hutchinson et al, la mortalidad a causa de la FPI se ha incrementado en varios de los países estudiados con 28,000-65,000 muertes en Europa y de 13,000-17,000 muertes en EUA. Los pacientes tienen una sobrevida media de 2.5-3.5 años después del diagnóstico.(11-13)

Diagnóstico de la FPI

El diagnóstico de la FPI frecuentemente requiere un enfoque multidisciplinario e involucra neumólogos, radiólogos y patólogos expertos en el campo de las enfermedades intersticiales pulmonares. La valoración se realiza de acuerdo a los criterios del consenso 2011 ATS/ERS/JRS/ALAT en donde se establecen los criterios diagnósticos y las recomendaciones para evaluar su evolución y tratamiento.(1, 14)

El diagnóstico definitivo de la FPI requiere:

1. Conocer la historia clínica del paciente, y con base a una tomografía de alta resolución hacer la exclusión de otras entidades clínicas definidas o enfermedades pulmonares intersticiales difusas de causa conocida (exposición ambiental y ocupacional, enfermedades colágeno vasculares como artritis reumatoide, neumonitis por hipersensibilidad, silicosis, etc.)
2. La evidencia radiológica de un patrón histopatológico de neumonía intersticial usual (NIU) en una tomografía axial computarizada de alta resolución (TCAR).
3. La presencia de un patrón histopatológico de NIU en el examen de tejido pulmonar obtenido mediante una biopsia de pulmón quirúrgica donde se

aprecien las características histopatológicas conocidas de una neumonía intersticial usual.(14, 15)

La valoración multidisciplinaria consigue aumentar la precisión diagnóstica, lo que es importante ya que muchas de las EPIDs tienen un comportamiento heterogéneo que puede mejorar, sanar o evolucionar a fibrosis, sin embargo la FPI siempre progresa a la destrucción del parénquima pulmonar y no responde a la terapia antiinflamatoria como otras EPIDs. (2, 14)

Etiología/Factores de riesgo

Diversos factores pueden contribuir al daño epitelial y apoptosis en el desarrollo de la FPI. Dentro de los factores ambientales se ha asociado el hábito de fumar, la exposición al sílice, al plomo o al polvo de madera. Por otro lado, se ha relacionado la infección viral crónica, principalmente por el virus del herpes, con la patogénesis de la FPI. (1)

Se ha propuesto, además, que el desarrollo de FPI involucra la convergencia de una combinación de factores de riesgo genéticos (polimorfismos comunes o raros) con ciertos procesos de envejecimiento acelerado (acortamiento de los telómeros, disfunción mitocondrial, senescencia celular), aunque estos factores no han sido asociados consistentemente con el desarrollo de la enfermedad (16). En un estudio realizado por García-Sancho et al, los resultados indican que la diabetes mellitus II puede constituir un factor de riesgo para el desarrollo de FPI en la población mexicana.(17)

Sin embargo, la opinión predominante es que el desarrollo de la FPI es el resultado del daño crónico y excesivo al pulmón seguido de la cicatrización anormal.(18)

Mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la FPI

Los mecanismos patogénicos para el desarrollo de la FPI aún no son claros, sin embargo, evidencias recientes indican que la enfermedad es resultado de los microdaños al epitelio que provocan la proliferación/activación de los fibroblastos y finalmente una cicatrización anormal. (2)

Se consideró por mucho tiempo que una alveolitis crónica precedía a la respuesta fibrótica en el pulmón, sin embargo, la evidencia recientemente descrita sugiere que la inflamación parece no ser tan importante en la FPI y que los mecanismos que regulan la fibrogénesis son, hasta cierto punto, distintos de aquellos que regulan la inflamación, esto puede explicar en general, la falta de eficacia de las terapias antiinflamatorias en el tratamiento de la FPI. (2, 19)

Por lo anterior, se han propuesto dos rutas que pueden conducir al desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática:

- 1) La vía inflamatoria, representada por la mayoría de las EPIDs diferentes de la FPI, en donde se distingue claramente una fase de alveolitis seguida de una fase fibrótica.
- 2) La vía epitelial, representada por la FPI, en donde hay un daño inicial en el pulmón que provoca la activación de células epiteliales, las cuales participan en el inicio de los eventos fibrogénicos tales como la migración, la proliferación y la activación de las células epiteliales con la formación de

focos de fibroblastos y miofibroblastos. Los miofibroblastos a su vez secretan cantidades exageradas de proteínas de la matriz extracelular (MEC) con la subsecuente destrucción de la arquitectura pulmonar.(1, 2)

En el mecanismo por vía epitelial se sugiere que el pulmón de un individuo susceptible por los factores de riesgo ya mencionados, es blanco de microlesiones repetidas de naturaleza incierta que provocan que las células epiteliales alveolares (CEAs) mueran y haya un inadecuado mecanismo de reparación. (1)

En un adulto las CEAs tipo I (90%) y las CEAs tipo II (10%) constituyen el componente epitelial del alveolo. Los pacientes con FPI tienen una pérdida importante de CEAs tipo I y con ellas, la reducción de moléculas antifibróticas como la caveolina 1, además existe una diferenciación de CEAs tipo II en tipo I para reestablecer la función alveolar, éstas células diferenciadas son hiperplásicas e hipertróficas, con diversos fenotipos alterados y a pesar del daño epitelial y la apoptosis incrementan en número.(1, 20, 21)

Después de las microlesiones y la apoptosis de CEAs, se incrementa la permeabilidad vascular a las proteínas (v.g. fibrinógeno, fibronectina) causando la formación de una matriz provisional (punto de inicio de la lesión). La degradación de la MEC es mediada principalmente por las metaloproteasas de matriz (MMPs) y la plasmina, sin embargo, la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) se encuentra incrementada en la FPI, lo que disminuye la producción local de plasmina y en consecuencia se favorece un microambiente intra-alveolar procoagulante/anti-fibrinolítico facilitando el incremento de la respuesta fibrótica.

Por lo tanto, la activación de la cascada de la coagulación tiene un papel importante en el proceso patológico de la FPI.(2, 22)

En este microambiente, las CEAs activadas anormalmente producen diversos factores de crecimiento y quimiocinas como: el PDGF, el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y la endotelina 1 que se ven involucrados en la migración, proliferación y diferenciación de los fibroblastos residentes y los fibrocitos provenientes de la médula ósea hacia los sitios en donde han ocurrido las microlesiones. (1, 9)

Adicionalmente, los fibroblastos secretan y activan el TGF- $\beta 1$ latente, el cual promueve la transición epitelio-mesénquima (TEM) y su diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos. Es decir, las fuentes de reclutamiento de fibroblastos en el desarrollo de la FPI son: los fibroblastos residentes, los fibrocitos circulantes y aquellos fibroblastos derivados de la TEM; juntas y en proporciones desconocidas, estas células participan en la formación de los focos de fibroblastos y miofibroblastos. (1, 2, 9)

En el foco, los miofibroblastos secretan cantidades excesivas de proteínas de la matriz extracelular, principalmente colágenas fibrilares, además provocan la apoptosis del epitelio alveolar mediante los péptidos de la angiotensina (Ang) II que ha sido propuesta como mediadora de la apoptosis de células epiteliales en la patogénesis de la FPI. En esta remodelación pulmonar anormal, varias cicatrices vecinas junto con la secreción desproporcionada de algunas enzimas (v.g. la MMP1) pueden provocar la formación de quistes en forma de panal de abeja.(1, 23)

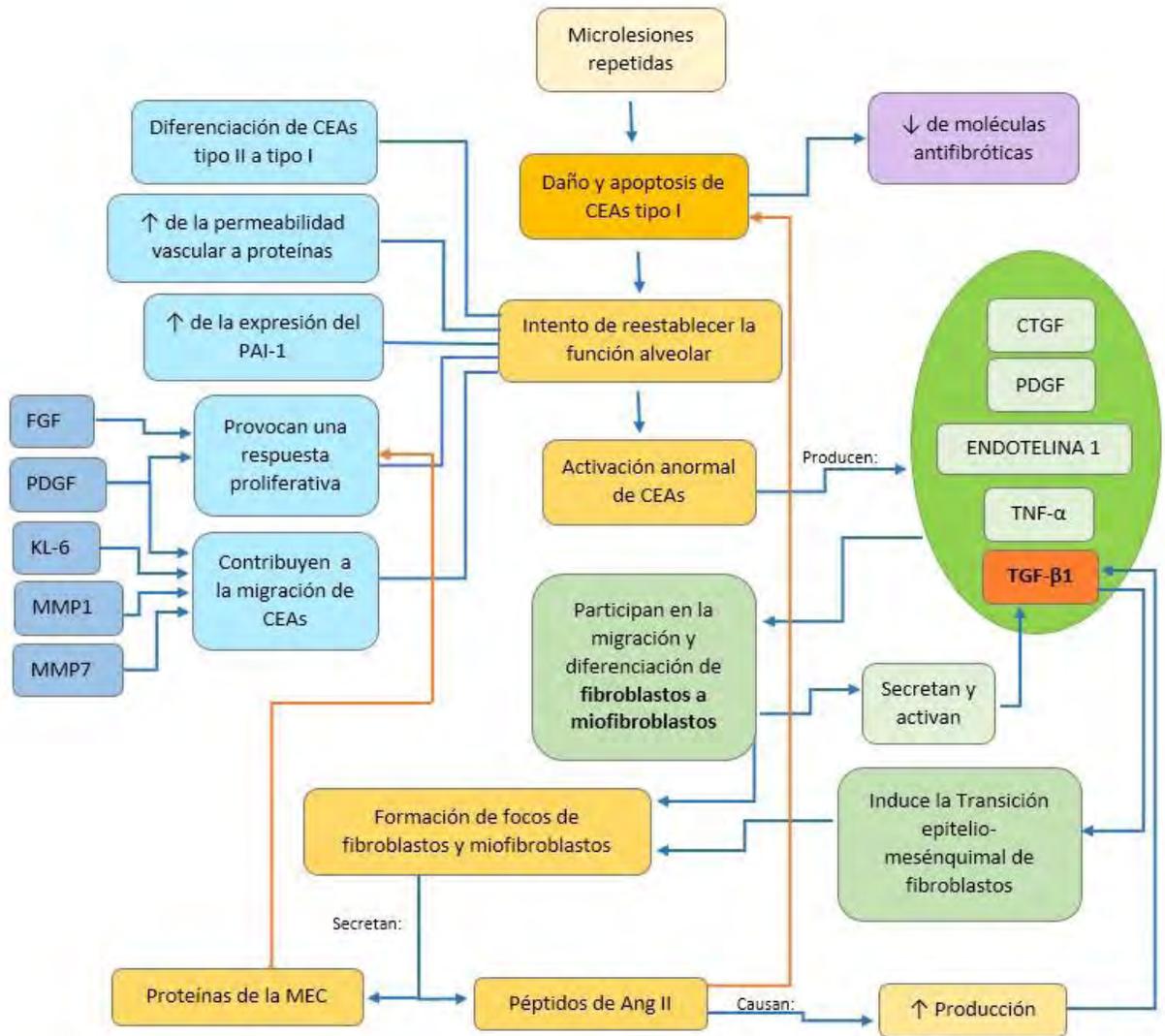


Figura 1. Diagrama de la patogénesis de la FPI. Proteínas que participan en el inicio y desarrollo de la enfermedad: factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), Glicoproteína Krebs von den Lungen-6 (KL-6), metaloproteína de matriz (MMP), Inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1) y Angiotensina II (Ang II). Elaboración propia.

A pesar de los diversos estudios que se han realizado, el mecanismo molecular que rige el inicio y progreso de la FPI es incierto. En los últimos años se ha sugerido y demostrado mediante estudios en diferentes órganos la participación del sistema renina angiotensina (SRA) en el desarrollo de la fibrosis, la cual es atribuida principalmente a la angiotensina II (Ang II) que incrementa la producción de TGF- β 1 y de moléculas de la matriz extracelular además del efecto apoptótico ya mencionado.(3)

La Matriz extracelular (MEC)

La matriz extracelular es una compleja red de proteínas estructurales y macromoléculas que rodean a cada célula del cuerpo, define la arquitectura del tejido y controla activamente el comportamiento, la forma y la función celular. En el pulmón la MEC está compuesta por las colágenas (I, III, IV y V), las fibras de elastina que interactúan con los glucosaminoglicanos (GAGs), las fibrillas de fibronectina y los proteoglicanos (PGs) que son producidos y secretados por los fibroblastos. La MEC es esencial para la homeostasis del tejido y la recuperación del daño, por lo se ha reportado que contribuye a la progresión de patologías pulmonares como la FPI. (24-26)

Las Metaloproteasas de matriz (MMPs)

Las MMPs son una familia de alrededor de 24 endopeptidasas dependientes de zinc encargadas de degradar cualquier componente de la MEC. Además de degradar proteínas, las MMPs también actúan en sustratos ajenos a la MMPs como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (27). Las MMPs son esenciales en la remodelación de la MEC, la cicatrización y la angiogénesis, además tienen la

capacidad de degradar todo el contenido de colágena del intersticio y entonces tener participación en la permeabilidad alveolar anormal; por lo anterior han sido implicadas en la patogénesis de la FPI. Diversos estudios han reportado niveles elevados en la FPI de diferentes MMPs tales como: la MMP1, responsable de la degradación de colágenas fibrilares, las MMP2 y MMP9, secretadas por los miofibroblastos, contribuyen a la activación del TGF- β 1 y a la ruptura de las membranas basales. (1, 28)

Fibroblastos y fibrosis

En este contexto, se considera que los fibroblastos son los principales mediadores de la fibrosis; son células de tejido mesenquimal (tejido conjuntivo), el cual se compone de células poco organizadas que se encuentran individualmente dentro de la matriz extracelular que ellas mismas producen, son células quiescentes derivadas del mesodermo, expresan la colágena tipo I y III, la fibronectina y la vimentina; además poseen capacidad contráctil y migratoria (29, 30);

El papel mejor conocido de los fibroblastos pulmonares es la copiosa producción y secreción de todos los componentes de la MEC como: las colágenas [I, III, IV y V] y las fibras de elastina, recíprocamente, estas proteínas pueden activar a los fibroblastos, es decir, incrementar su proliferación, incrementar la producción de la MEC y promover la diferenciación de los mismos a miofibroblastos. (24, 25)

Los fibroblastos tienen además un papel importante en el mantenimiento y la reabsorción de la MEC, la cicatrización, la inflamación, la angiogénesis y la coagulación (producen activadores del plasminógeno y sus inhibidores), por lo que

producen y responden a varias señales paracrinas y autocrinas como las citocinas y los factores de crecimiento. (26, 29)

La activación de los fibroblastos es de vital importancia en la reparación del tejido dañado, sin embargo, en algunos casos (como en la FPI) y por razones aún desconocidas su activación llega a ser perpetua aunque el estímulo primario haya cesado, lo que conduce a la acumulación de la MEC y disminución de su degradación debido a la supresión de MMPs por sobrerregulación de inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs).(26, 29)

En un estudio realizado por Wang et al determinaron que en el medio condicionado de fibroblastos pulmonares de FPI el nivel elevado de Ang II es el factor responsable de la inducción de apoptosis a las CEAs; en otro estudio con fibroblastos pulmonares humanos realizado por Abdul-Hafez et al demostraron la sobrerregulación de la expresión de Ang I en respuesta a TGF- β 1. (31, 32)

Sistema Renina Angiotensina sistémico

El sistema renina angiotensina (SRA) es un sistema hormonal encargado de múltiples funciones fisiológicas, tales como la regulación de la presión sanguínea, y la homeostasis de fluidos a través de la reabsorción del sodio, el agua y la vasoconstricción. Sin embargo, las evidencias reportadas sobre este sistema lo han colocado en la posición de ser no solo un sistema endocrino (sistémico), sino uno con funciones autócrinas (afectando a la célula misma) y parácrinas (afectando a células vecinas).(4)

El SRA actúa mediante la Ang II que es el efector principal, el cual es producido por medio de una cascada proteolítica, ésta comienza con la escisión del angiotensinógeno (AGT, una α -globulina de origen hepático) por acción de la enzima renina para producir el decapeptido inactivo angiotensina I (Ang I), que es el sustrato de la enzima convertidora de angiotensina (ECA); la ECA realiza un corte en la Ang I dando lugar a la generación de la Angiotensina II, el principal efector que actúa predominantemente a través de dos tipos de receptores: el AT₁R y el AT₂R.(4, 33)

Además del sistema originalmente identificado como un sistema endocrino clásico, existe evidencia de un SRA tisular o local en varios órganos incluido el pulmón, el riñón, el corazón y el cerebro. Los componentes de estos sistemas han sido ubicados en tejidos periféricos y todos producen localmente Ang II. Estos sistemas locales parecen estar regulados y compartimentalizados independientemente de la circulación sistémica.(4)

Existe evidencia experimental de que el SRA pulmonar está involucrado en la patofisiología de la FPI: se ha encontrado que el gen del AGT está sobreexpresado en pacientes con FPI y ha sido asociado con la progresión de la enfermedad; se ha demostrado que la Ang II estimula el crecimiento y la proliferación de los fibroblastos pulmonares y sobrerregula la expresión del TGF- β 1, un elemento central en la fibrogénesis; la generación de TGF- β 1 inducida por Ang II está asociada con la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos lo cual aumenta el depósito de proteínas de la MEC; los fibroblastos derivados de FPI pueden inducir apoptosis paracrina de células epiteliales a través de la generación de la Ang II y se ha

mostrado que la inhibición del receptor de la Ang II bloquea la apoptosis de las células epiteliales mediada por Fas, finalmente, la Ang II participa en la promoción de efectos procoagulatorios por activación del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), el cual, inhibe la actividad del activador del plasminógeno, conduciendo a la acumulación de la MEC.(22, 23, 34)

Renina: características y participación en la FPI

La renina es una aspartil proteasa, cuyo único sustrato conocido es el angiotensinógeno. Su locus se encuentra en el Cr1 q32, el gen está conformado por 10 exones y 9 intrones. La renina es sintetizada en diferentes tejidos como una preproteína, el primer exón codifica el péptido señal que dirige a la proteína naciente hacia el retículo endoplasmico en donde sufre glicosilación, y es secretada en dos formas: la prorenina (forma inactiva) y la renina (forma activa). La forma madura contiene 340 aminoácidos y un peso molecular de 37 KDa. (35, 36)

Se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* que la renina y la prorenina ejercen un efecto profibrosante independiente de Ang II, que es llevado a cabo vía el receptor Renina/Prorenina causando un aumento en los niveles de expresión del PAI-1, TGF- β 1 y colágena tipo I en células mesangiales. Estudios posteriores demostraron que la inducción en la expresión de TGF- β 1 es por medio de la señalización de las cinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2, por sus siglas en inglés). (37)

Estudios anteriores sugieren que existe una interacción entre los componentes del SRA y los mediadores clave de la fibrosis, y se ha propuesto que la renina, independientemente de su acción enzimática, incrementa la producción del factor

de crecimiento transformante $\beta 1$, una citocina fibrogénica, que a su vez, incrementa el PAI-1, la fibronectina y la colágena I, por lo que la renina puede contribuir a la respuesta fibrótica.(38)

Se ha reportado, además, que la inducción de moléculas profibrosantes causada por la renina activa la señalización ERK 1 / 2 en células mesangiales a través de su receptor (receptor renina/prorenina) de manera independiente de la generación de la Ang II. La renina induce la fosforilación de ERK1/2 que resulta en el incremento de la proliferación celular y la sobreexpresión de los genes profibrosantes. (3, 39)

Sistema Renina Angiotensina intracelular

Algunos componentes del SRA intracelular han sido localizados en los organelos celulares como son: el núcleo y la mitocondria, por ejemplo, la Ang II ha sido detectada en el citoplasma, el núcleo y las mitocondrias siendo producida por el AGT intracelular localizado en el citoplasma y el núcleo para actuar en los receptores AT2R. Otros hallazgos han mostrado la presencia de los AT2Rs en la membrana mitocondrial interna.(5, 40)

La relevancia fisiológica y la regulación del SRA intracelular aún no han sido completamente establecidas. En efecto, no es claro cómo funciona el SRA intracelular para sintetizar los péptidos activos de Ang II y Ang-(1-7), ni la contribución de estos péptidos en la función celular y señalización .(41)

La evidencia reciente sugiere que el SRA intracelular puede estar presente a través de dos diferentes vías teóricas. La primera vía corresponde al SRA intracelular como un sistema transitorio en el que sus componentes son transportados mediante

vesículas secretorias a la superficie celular. La segunda vía involucra un sistema constitutivo no secretado compuesto por una ECA unida a la membrana celular orientada al citosol, receptores de Ang II localizados en la mitocondria, la isoforma de la renina que no es secretada y el receptor intracelular de la renina localizado en la zona perinuclear y el retículo endoplásmico. Esta información sugiere que es posible la existencia de un SRA completo dentro de la célula.(4)

La renina descrita en el medio intracelular es derivada de un sitio de inicio de la transcripción alternativo en donde se pierde el péptido de exportación, lo que causa que la renina no sea secretada por la célula, esta isoforma fue identificada en ratones transgénicos de cromosomas artificiales derivados de fago P1 que contenían al gen de la renina humana, fueron identificados tres transcritos de la renina a partir del RNA mensajero por el uso de distintos sitios de inicio de la transcripción: un transcrito específico de riñón, uno de cerebro y uno de pulmón. (42, 43)

Los transcritos que codifican la isoforma intracelular de la renina han sido encontrados en ratas, ratones y humanos. Uno de estos transcritos llamado renina-c se expresa exclusivamente en el pulmón, en éste la transcripción del gen se inicia dentro del intrón 1, 79 pb río arriba del exón 2, generando una fusión entre las secuencias de la extensión 3' del intrón 1 con el exón 2 para producir un exón quimérico: el exón 1c, por lo tanto, en el pulmón se sintetiza una forma alterada de la renina que pierde el péptido secretorio y una porción del prosegmento, aunque esto no ha sido comprobado.(40, 42)

Los datos obtenidos en estudios previos sugieren que la renina citosólica puede ser funcionalmente activa, a pesar de que muchas de sus funciones aún son desconocidas, podrían mencionarse algunas como las funciones mitocondriales, las bioenergéticas, la participación en la comunicación celular a través del control de la conductancia de unión y la apoptosis por afluencia de calcio. Por otro lado, la unión de la renina a su receptor incrementa su actividad catalítica en 4-5 veces lo que a su vez incrementa la generación de Ang I. (4, 40)

Se ha observado en numerosos estudios que algunas proteínas que tienen su actividad fuera de la célula pueden localizarse en el núcleo y mostrar una actividad distinta, ejemplos de esto son: el factor de crecimiento de fibroblastos y la proteína odontogénica asociada a ameloblastoma, las cuales son expresadas en el núcleo y citoplasma así como en la MEC; la proteína NAG-1 (Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1), la cual pertenece a la superfamilia de TGF- β y es usualmente secretada, sin embargo, se ha encontrado expresada en el núcleo donde puede inhibir a la vía de señalización de las Smad. La proteína MT1-MMP (metaloproteinasa anclada a membrana) modula la respuesta inflamatoria de una manera independiente de proteasas en tándem con su transporte al compartimiento nuclear. (44-46)

Por lo anterior, la renina localizada al interior de la célula puede afectar distintos eventos moleculares. En este contexto, resultados preliminares de nuestro laboratorio han encontrado mediante el software en línea SITESCAN, que analiza secuencias de aminoácidos de la proteína de interés y predice posibles sitios de

unión a diversas cinasas, que la secuencia de la renina intracelular posee un probable dominio D que puede ser reconocido por las cinasas ERK1/2.

Las proteínas activadas por mitógenos (MAP cinasas)

Las MAP son proteínas cinasas de serina/treonina citoplasmicas que participan en la transducción de señales desde la superficie hasta el interior de la célula, en este grupo se incluyen la familia de las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK). Las MAP cinasas activadas catalizan la fosforilación de numerosos sustratos proteicos incluyendo factores de transcripción, proteínas cinasas y fosfatasas. La cascada de señalización de las ERK1/2 participa en la regulación de una gran variedad de procesos como la progresión del ciclo celular, la migración celular, la supervivencia, la diferenciación, la proliferación, entre otros y se ha descrito que se encuentra alterada en varias enfermedades como el cáncer, diabetes e inflamación. Adicionalmente, se ha reportado que el estado de activación de las proteínas ERK1/2 puede regular las interacciones con proteínas sustrato y que estas interacciones no necesariamente se correlacionan con los efectos en la fosforilación del sustrato.(47, 48)

Las ERK 1 y 2 son proteínas de 43 y 41 KDa de peso molecular, respectivamente, comparten un 84% de similitud y son ubicuamente expresadas. Se encuentran distribuidas a través de la célula asociadas con receptores de la membrana plasmática y son usualmente retenidas en el citoplasma por proteínas como la tubulina, componente del citoesqueleto. (49, 50)

zLa vía de señalización de MAPK es una compleja cascada lineal de cinasas de serina/treonina en la cual, la cinasa Raf (MAPK cinasa cinasa) fosforila y activa a

proteínas MEK1/2 (MAPK cinasas), las cuales a su vez, fosforilan y activan a las proteínas ERK/MAPK y éstas catalizan la fosforilación de numerosos sustratos, incluyendo factores de transcripción, proteínas cinasas, fosfatasas y otras proteínas funcionales como algunas proteínas del citoesqueleto y nucleoporinas. Los componentes de la cascada han sido encontrados en compartimientos de membrana asociados con balsas lipídicas y caveolas.(39, 47, 49)

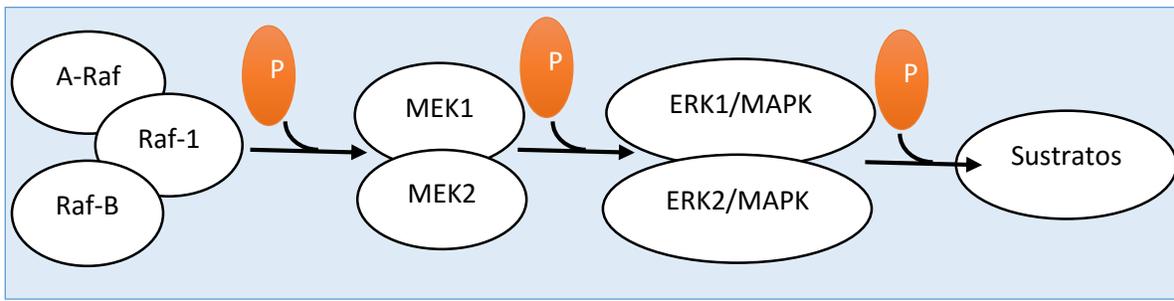


Figura 2. Cascada de señalización de las ERK/MAPK. Elaboración propia.

En la FPI las proteínas ERK son activadas por una gran variedad de moléculas desembocando en diversos efectos profibróticos como se muestra en la siguiente figura: (39, 47, 51)

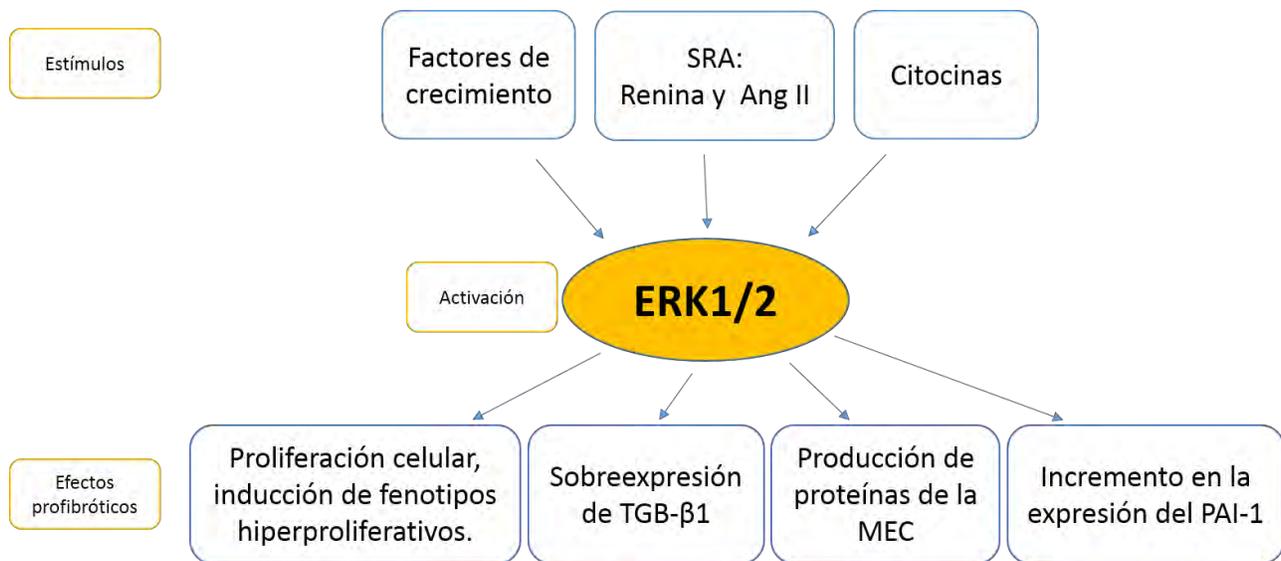


Figura 3. Factores que activan a las ERK1/2 y efectos profibróticos en los fibroblastos. Elaboración propia.

Las proteínas de andamiaje interactúan con más de un componente en una cascada dada, mediando la activación de las vías de señalización de MAPK, por ejemplo la KSR (cinasa supresora de Ras-1) y la paxilina (proteína del citoesqueleto) funcionan como andamios en la vía de ERK1/2.

El citoplasma es el sitio predominante donde se localizan los componentes de la cascada de las ERK1/2 en la célula; en respuesta a diferentes estímulos, los componentes de la cascada cambian su localización y son dirigidos a varios compartimientos en donde se encuentran con sus sustratos específicos e inducen los efectos propios de dichos estímulos. Las proteínas ERK1/2 usualmente se localizan en el citoplasma de las células quiescentes debido a la interacción con diversas proteínas, sin embargo, durante muchos procesos celulares las ERKs se traslocan al núcleo para inducir la transcripción mediante la fosforilación de los factores de transcripción; la translocación de las ERKs es necesaria para la proliferación de los fibroblastos.(50, 51)

La cascada de señalización Ras-Raf- MEK-ERK se encuentra desregulada en una variedad de enfermedades incluyendo el daño cerebral, la hipertrofia cardiaca, el cáncer, la diabetes e inflamación y como ya se mencionó, es activada por la renina, lo que provoca la subsecuente proliferación celular mediante el receptor de la renina, este efecto profibrótico es independiente de la Ang II.(39, 47)

Interacciones proteína-proteína

En los organismos vivos existe un constante flujo de información mediante interacciones entre DNA, RNA, proteínas y otras moléculas, estas interacciones son esenciales para cualquier proceso vital, por ejemplo, la transferencia de la información, la inhibición o activación de la función, el ensamblaje de estructuras macromoleculares y más. En un organismo, las proteínas pueden participar en interacciones específicas con sólo una o unas pocas proteínas, aunque en las interacciones funcionales promiscuas la interacción se da con muchas de ellas y/o en interacciones no específicas con numerosas proteínas no afines funcionalmente.(52)

Los diferentes rangos de afinidad son los que determinan la concentración requerida para obtener un 50 % de unión, por lo que las concentraciones del complejo formado dependen de las concentraciones locales. Aunque la concentración de una pareja de proteínas de unión específica es, por lo general, muy baja en la célula, el total de concentraciones de otras moléculas es muy alta, lo que permite interacciones débiles y no específicas o transitorias que pueden tener un papel importante.(52, 53).

Las proteínas usan dominios estructuralmente conservados y motivos para mediar muchas interacciones, cuando tales dominios se encuentran presentes en un organismo o entre organismos se da la oportunidad de que surja la especificidad o multiespecificidad para que una proteína pueda unirse a otra o a múltiples proteínas relacionadas.(52)

Las proteínas ERK1/2 interactúan con dos dominios de acoplamiento independientes que se encuentran dentro de sus proteínas sustrato: el sitio D y el sitio F; las ERKs poseen un sitio de reclutamiento D que interactúa con el sitio de acoplamiento D en el sustrato y un sitio de reclutamiento F que interactúa con el sitio de acoplamiento F del sustrato; algunos sustratos presentan el sitio D, otros presentan el sitio F, otros poseen ambos y otros, ninguno.(47)

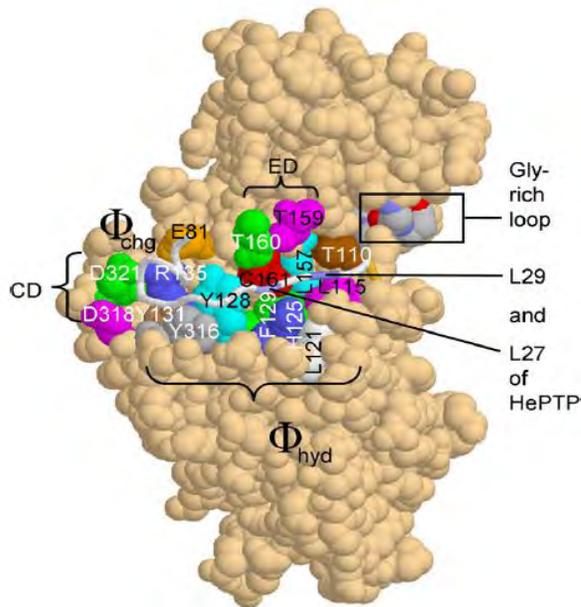


Figura 4. Modelo del sitio de reclutamiento de ERK2 no fosforilado indicado por el espacio coloreado ED. Tomada de Roskoski, 2012.

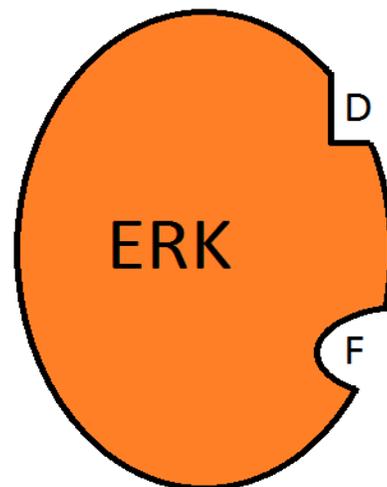


Figura 5. Representación de los sitios de reclutamiento de ERK1/2. Elaboración propia.

Tras la activación, las ERKs son fosforiladas y eliminadas del complejo de señalización RAF/MEK/ERK. Las ERKs fosforiladas se unen a otras proteínas y se translocan a nuevos destinos celulares; por ejemplo, la unión de las ERKs a β -arrestina (una proteína que media la transducción de señales intracelulares a través de interacciones proteína-proteína –IPPs– por unión de dos o más proteínas en proximidad) resulta en la retención citosólica de este complejo, mientras que su asociación con importinas nucleares resulta en la translocación de las ERKs al núcleo.(54)

Entre las proteínas sustrato que interactúan con las ERK1/2 se encuentran los sustratos nucleares como: el Elk1 (un factor de transcripción cuya activación conduce al incremento de la actividad transcripcional), el cFos (un factor de transcripción que regula procesos transcripcionales tempranos); los sustratos citoplasmicos como: la familia de proteínas RSK (proteínas cinasa que catalizan la fosforilación de muchos sustratos y han sido asociadas a la oncogénesis); las proteínas del citoesqueleto como: la paladina (una proteína de unión a actina que participa en la remodelación del citoesqueleto) y la paxilina (que regula la adhesión focal de cinasas y estas a su vez, la morfogénesis celular); proteínas del complejo de poro nuclear como: la Nup50, la Nup153 y Nup214 (su fosforilación evita la acumulación nuclear de proteínas que pueden ser translocadas).

Otras proteínas que interactúan con las ERK1/2 son las proteínas de andamiaje o adaptadoras, estas pueden unir uno o más componentes de un módulo de señalización y así regular e integrar toda la transducción de la señal, por ejemplo: las KSR1/2 (cinasa supresora de Ras), IQGAP1 (una proteína de 189 kDa que

regula la adhesión, la proliferación celular y la diferenciación celular) y la MEK cinasa 1 (es una MAPK3 cinasa, es tanto una proteína cinasa como una adaptadora para la vía de ERK y JNK MAP cinasas).(47, 54)

Los métodos para la investigación de las interacciones proteína-proteína (IPPs) suelen ser ensayos de doble híbrido y métodos de co-inmunoprecipitación además de métodos computacionales. Por lo anterior, la identificación de IPPs es crucial para dilucidar la función de las proteínas y para una mejor comprensión de los procesos biológicos o patológicos en la célula, que en el caso de la FPI aún son desconocidos y así proveer blancos terapéuticos a futuro, dado que para la FPI no existe tratamiento efectivo alguno. (55)

Planteamiento del problema:

La fibrosis pulmonar idiopática es un padecimiento crónico, letal, las causas y los mecanismos de la enfermedad son desconocidos hasta el día de hoy y no existe tratamiento efectivo para los pacientes, quienes tienen una sobrevivencia media de 2.5-3.5 años después del diagnóstico. De lo anterior deriva la importancia de estudiar las rutas implicadas y los diversos mecanismos de la FPI en donde se encuentran involucradas diversas proteínas como la renina y las cinasas ERK1/2, por lo que la localización de éstas en los fibroblastos pulmonares provenientes de pacientes diagnosticados con la enfermedad y fibroblastos pulmonares control, podría ayudar a comprender el desarrollo de la FPI y así proveer blancos terapéuticos a futuro.

Hipótesis

En los fibroblastos de pulmón humano se localizará a la renina intracelularmente e interactuará con las cinasas ERK1/2.

Objetivos

Objetivo General

- Determinar la distribución intracelular de la renina y su asociación con las proteínas ERK1/2 en fibroblastos pulmonares control y procedentes de pacientes con FPI.

Objetivos particulares

- Determinar la localización de las cinasas ERK1/2 en fibroblastos pulmonares control y procedentes de pacientes con FPI.
- Determinar la interacción entre la renina intracelular y las ERK1/2 en fracciones celulares de citoplasma y núcleo de fibroblastos pulmonares control y procedentes de pacientes con FPI.

Diseño experimental

Tipo de estudio:

- Experimental

Población de estudio:

1. Fibroblastos de pulmón humano normal adquiridos de la American Type Culture Collection (ATCC), línea celular CCD25
2. Fibroblastos pulmonares procedentes de pacientes con FPI

Criterios de inclusión:

1. Fibroblastos de pulmón humano normal adquiridos de la American Type Culture Collection (ATCC), línea celular CCD25 entre los pasajes 4-10
2. Fibroblastos pulmonares procedentes de pacientes con FPI entre los pasajes 4-10

Criterios de exclusión:

1. Fibroblastos de pulmón humano normal adquiridos de la American Type Culture Collection (ATCC), línea celular CCD25 en pasajes >10
2. Fibroblastos pulmonares procedentes de pacientes con FPI en pasajes >10

Variables:

- V. dependiente: La localización de la renina intracelular y su interacción con las cinasas ERK1/2
- V. independiente: El tipo de fibroblastos

Materiales

Cultivo celular:

Medio Ham F12 (Life Technologies, USA), Medio Minimum Essential Medium Eagle, EMEM (BioWhitaker, USA), Phosphate Buffered Saline, PBS (Sigma Life Science, USA), Antibiotico-antimicótico (Life Technologies, USA), Tripsina-EDTA (Life Technologies, USA).

Extracto total de proteínas:

Buffer RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) (Sigma, USA), Inhibidor de Proteasas (Calbiochem, Alemania).

Fraccionamiento celular:

Estuche de fraccionamiento subcelular de proteínas (Thermo Scientific, USA) que contiene: buffer de extracción citoplasmica (CEB), Buffer de extracción de membrana (MEB), buffer de extracción nuclear (NEB), Nucleasa Micrococcal, Cloruro de calcio (CaCl) e inhibidor de proteasas.

Inmunoprecipitación:

Proteína A-agarosa y Proteína G PLUS- agarosa (Santa Cruz Biotechnology, USA).

Anticuerpos primarios:

Anti-Renina, Anti-MAPK (ERK1/2) fosfo-p44/42 (Thr202/Tyr204), anti-HSP90, anti-SP1, anti-Histone H3 (Cell Signaling Technology), anti-MAPK (ERK1/2) (Santa Cruz Biotechnology, USA), Anti-pERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology, USA).

Anticuerpos secundarios:

Anticuerpos anti-conejo y anti-ratón (GE Healthcare, Reino Unido), anticuerpo anti-conejo acoplado a fluoroforo Alexa Fluor 596 y anti-cabra acoplado a fluoroforo Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch, USA).

Western Blot:

Marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standards, BIO-RAD, USA), Membrana de Fluoruro de polivilideno, PVDF (BIO-RAD, USA), leche libre de grasa (Santa Cruz Biotechnology, USA), estuche supersignal west femto máximo sensitive substrate (Thermo Scientific, USA).

Inmunofluorescencias:

DAPI (para teñir DNA), ProLong Gold antifade reagent (medio de montaje) y Bloqueador universal 10X (Life Technologies, USA).

Métodos

Cultivo celular

Se utilizaron fibroblastos de pulmón humano normal adquiridos de la American Type Culture Collection (ATCC), línea celular CCD25 entre los pasajes 4-10 y fibroblastos humanos de pulmón procedentes de pacientes con FPI entre los pasajes 4-11. Incubados a 37 °C, en ambiente húmedo con 95% de aire y 5% de CO₂ en cajas plásticas para cultivo T175 cm² (Corning) en medio Ham F12 al 10% de suero fetal bovino (SFB).

Obtención del extracto total de proteínas

Las células fueron lavadas dos veces con PBS frío, se adicionó una mezcla de 150 µL de buffer RIPA (que contiene TRIS, NaCl, SDS y Tritón X 100; permite la lisis celular y la solubilización de proteínas) y 1.5 µL de inhibidor de proteasas a una caja de cultivo T175, se obtuvo el lisado por raspado del fondo de la caja. Posteriormente el lisado se centrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos, recuperando el sobrenadante y descartando los restos celulares. Se almacenó hasta su uso a -70 °C

Fraccionamiento celular

Las células confluentes se lavaron dos veces con PBS y se cosecharon por centrifugación a 1800 rpm por 10 minutos. El pellet resultante fue tratado con el estuche de fraccionamiento subcelular de proteínas conforme a las instrucciones del fabricante, brevemente:

- Se adicionaron 200 μL de buffer de extracción de citoplasma, se incubó 10 min a 4°C y se centrifugó a 2500 rpm por 5 min a 4°C . se almacenó el sobrenadante (extracto citoplásmico) y se conservó el pellet.
- Se adicionaron 200 μL de buffer de extracción de membrana al pellet anterior, se incubó 10 min a 4°C y se centrifugó a 5700 rpm por 5 min a 4°C . Se almacenó el sobrenadante (extracto de membrana) y se conservó el pellet.
- Se adicionaron 100 μL de buffer de extracción de núcleo al pellet anterior, se dejó incubar 30 min a 4°C y se centrifugó a 7700 rpm por 5 min a 4°C . Se almacenó el sobrenadante (extracto nuclear soluble) y se conservó el pellet.
- Se adicionaron 100 μL de buffer de extracción de núcleo con 3 μL de nucleasa micrococcal y 5 μL de CaCl_2 al pellet anterior, se incubó 15 min a 25°C y se centrifugó a 13000 rpm por 5 min a 4°C . Se almacenó el sobrenadante (extracto núcleo-cromatina) y se descartó el pellet.
- Se utilizó 1 μL de inhibidor de proteasas en cada paso.

Cuantificación de proteínas

Se realizó la cuantificación por duplicado de cada extracto proteico obtenido por el método de Bradford. Se utilizó BSA como estándar proteico para realizar la curva estándar (0.3- 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Las muestras se diluyeron cinco veces para su cuantificación. La lectura de la absorbancia se hizo a 595 nm.

Co- Inmunoprecipitación

Se utilizaron 240 μg de lisado total, 104 μg de fracción citoplásmica, 77 μg de fracción nuclear soluble y 8 μg de fracción cromatínica. Se incubaron con 10 μL de

anticuerpo de captura por 1 hora a 4 °C en agitación, se adicionaron 20 µL de Proteína A o G y se incubaron por 1 hora a 4 °C en agitación. Se obtuvo el pellet por centrifugación a 2500 rpm por 5 minutos, éste se lavó 4 veces con PBS. El pellet final se resuspendió en 40 µL de buffer de carga para detectar proteínas bajo condiciones desnaturalizantes/reductoras y se calentó a 95 °C por 5 minutos para su posterior utilización en el Western Blot.

Electroforesis

Las proteínas obtenidas de la co-inmunoprecipitación o del fraccionamiento celular se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. Las muestras fueron desnaturalizadas adicionandoles el buffer de carga (SDS/ β -mercaptoetanol), se calentaron a 95 °C por 5 minutos para asegurar que la desnaturalización/reducción es total. Se cargaron 35 µL de cada muestra. Posteriormente, el gel se sometió a un campo eléctrico generado por una fuente de alimentación, a 120 V por 1.5 horas.

Western Blot

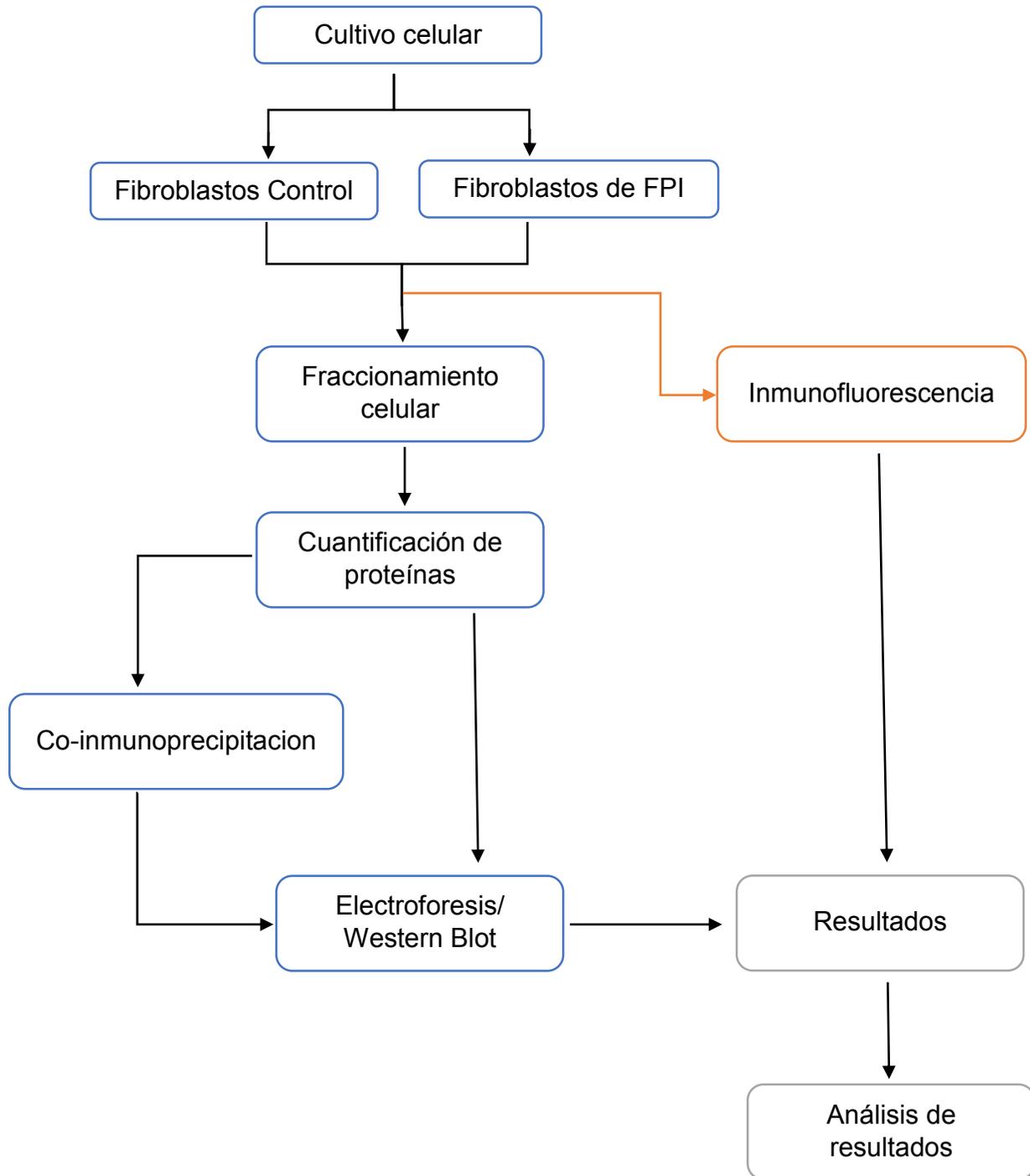
Una vez que la electroforesis del gel terminó, las proteínas se transfirieron en una cámara semi-seca a 15 V por 15 min a una membrana de PVDF, al término de la transferencia ésta se bloqueó con leche libre de grasa al 5% en PBS-Tween a 4 °C durante toda la noche. Después se incubó 1 hora a 25 °C con el anticuerpo primario respectivo usando la dilución recomendada por el fabricante, posteriormente se lavó la membrana 4 veces con una solución de TBS-Tween (TRIS-HCl/NaCl), al término de los lavados se incubó 1 hr a 25 °C con el anticuerpo secundario respectivo en la

dilución correspondiente y después del tiempo de incubación se lavó 4 veces con la solución de TBS-Tween. El revelado se realizó con el estuche Supersignal West Femto en el equipo ChemidocXRS (Bio-Rad).

Inmunofluorescencia

Se sembraron 6000 células en un cubreobjetos previamente tratado con una mezcla de HCl/H₂SO₄ para aumentar la adherencia de las células al vidrio, se monitorearon hasta la confluencia requerida para posteriormente fijarlas en frío con metanol (3 min.) y acetona (2 min.). Las células fijadas se bloquearon con un bloqueador universal 1X por 20 minutos y se incubaron con los anticuerpos primarios (anti-renina y anti pERK1/2) toda la noche. Posteriormente se lavaron con una solución de TBS-Tween 0.05% y se incubaron con los anticuerpos secundarios (anti-(α) acoplado a Alexa fluor 596 y anti-(β) acoplado a Alexa fluor 647) en una dilución 1:200 por 1 hora. Después se lavaron con PBS y se incubaron con el DAPI por 15 min, al término se lavaron con PBS y finalmente se utilizó el medio de montaje para su conservación, se dejaron secar 48 horas antes de su observación en el microscopio confocal (Olympus FluoView FV1000).

Diagrama de flujo de los métodos experimentales



Resultados

Control del fraccionamiento celular

Para comprobar la integridad de las fracciones celulares obtenidas se realizó un western blot con las mismas (figura 4); se utilizaron diferentes marcadores tales como: HSP90 como control de la fracción de citoplasma, que es una proteína de choque térmico de 90 kDa expresada en citosol, para el extracto nuclear se utilizó la proteína SP1, un factor de transcripción de 90 kDa expresado ubicuamente en el núcleo de las células y para el extracto de cromatina se utilizó la histona H3, una proteína de 17 kDa relacionada con la condensación de los cromosomas.

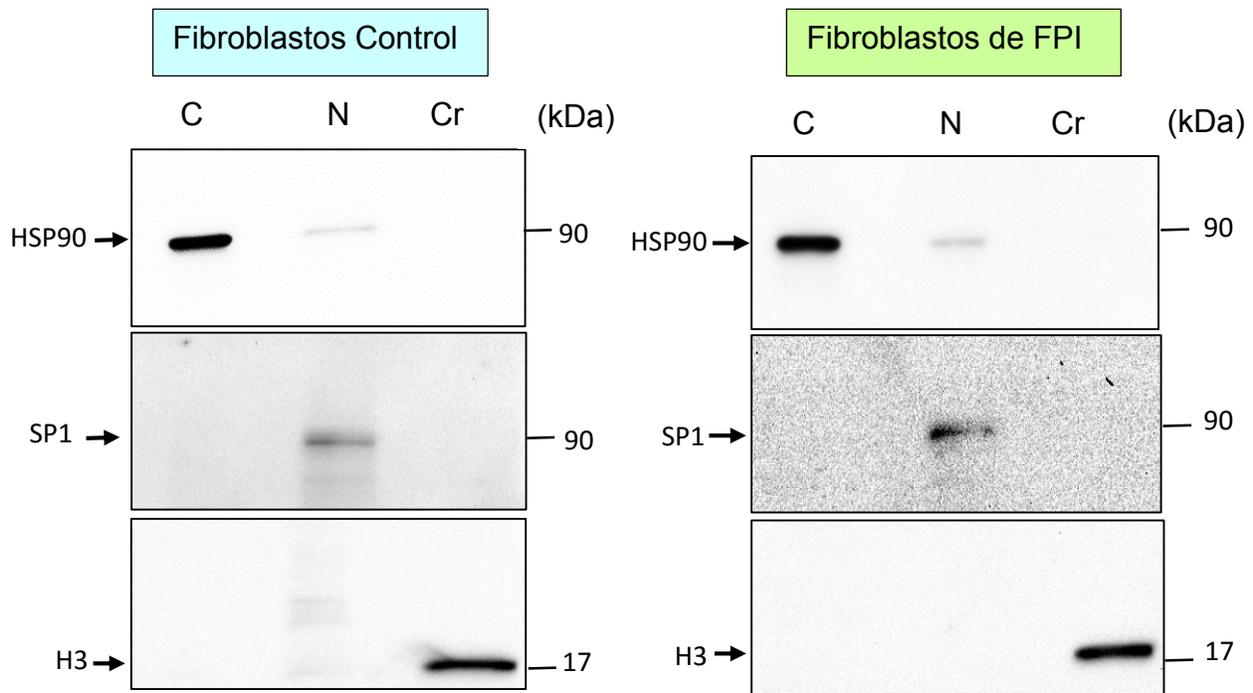


Figura 4. Análisis por Western Blot de la integridad de las fracciones celulares aisladas de fibroblastos CCD25 y fibroblastos HIPF 286. Se indican las fracciones celulares analizadas: C, fracción citoplásmica; N, fracción nuclear; Cr, fracción de cromatina. Se utilizó HSP90 (marcador para citoplasma), SP1 (marcador para núcleo) y H3 (marcador para cromatina) que se encontraron en la fracción celular correspondiente.

Los marcadores utilizados se observan en la fracción celular correspondiente: como se puede observar en la figura 4, los marcadores utilizados se localizan en la fracción celular correspondiente: la banda correspondiente a HSP90 se observa mayormente en la fracción de citoplasma y una ligera banda en núcleo, por tanto, se obtuvo una fracción enriquecida de citoplasma; SP1 se observó en núcleo y la histona H3 en la fracción de cromatina, por lo que puede asegurarse que las fracciones fueron separadas adecuadamente.

Localización de la renina intracelular y las cinasas ERK1/2

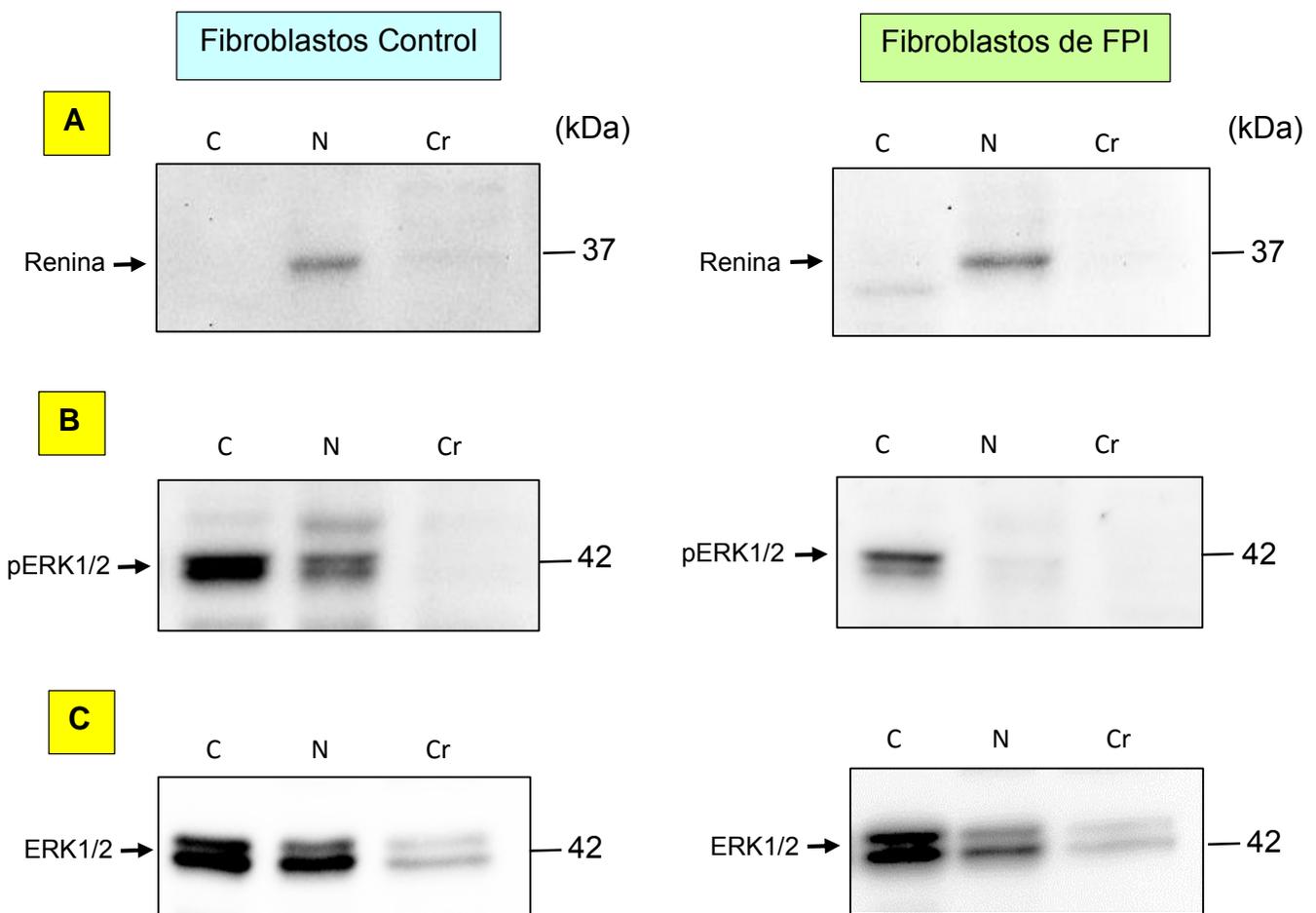


Figura 5. Localización de la renina intracelular y ERK1/2 por Western Blot. Se indican las fracciones celulares analizadas: C, fracción citoplásmica; N, fracción nuclear; Cr, fracción de cromatina. Se localizó a la renina en las fracciones de núcleo, a pERK1/2 en las fracciones de citoplasma y núcleo y a ERK1/2 en las tres fracciones.

Para averiguar la localización intracelular de la renina se realizó un western blot con todas las fracciones como se muestra en la figura 5 panel A. Se puede observar que existe una forma de la renina localizada en la fracción nuclear de ambos tipos de fibroblastos.

Por otro lado, en la figura 5 panel B, las ERK1/2 fosforiladas se localizan mayormente en la fracción citoplásmica y nuclear de los fibroblastos control, mientras que en los fibroblastos de FPI se localizan mayoritariamente en la fracción citoplásmica con una mínima señal en la fracción nuclear, esta diferencia puede deberse a que se utilizó la misma cantidad de proteína de cada fracción celular para el ensayo (20 µg) y no fue suficiente para observar a la proteína en la fracción de núcleo. En la figura 5 panel C, las ERK1/2 sin fosforilar se observaron en las tres fracciones, en mayor grado en la fracción citoplásmica y nuclear que en la fracción de cromatina con un mismo patrón en ambos tipos celulares.

Debido a que el análisis *in silico* con el software SITESCAN predijo una posible interacción entre ambas proteínas, se decidió realizar la co-inmunoprecipitación de cada fracción celular seguida de un análisis por western blot.

Cuando se inmunoprecipitó a la renina intracelular con su anticuerpo específico anti-renina y se utilizaron anticuerpos anti-ERKs fosforiladas como anticuerpo primario en el western blot el ensayo reveló que la renina interactúa con las ERKs fosforiladas como se aprecia en la figura 6 panel A; lo mismo sucedió realizando el mismo experimento pero usando anticuerpos anti-ERKs no fosforiladas en el western blot que se muestra en la figura 6 panel C.

Para comprobar los resultados de los experimentos anteriores se realizó ahora una co-inmunoprecipitación con anticuerpos anti-ERKs fosforiladas y anticuerpos anti-renina como anticuerpo primario en el western blot, mostrado en la figura 6 panel B y otra co-inmunoprecipitación con anticuerpos anti-ERKs no fosforiladas y anticuerpos anti-renina como anticuerpo primario en el western blot que se muestra en la figura 6 panel D. Estos resultados mostraron igualmente la interacción entre ambas proteínas.

Se advirtió, además, que la banda correspondiente a ERK1 es más intensa en el panel 6 A y C de los tres tipos de extractos de fibroblastos de FPI, lo que puede sugerir que la renina se une más a ERK1 que a ERK2.

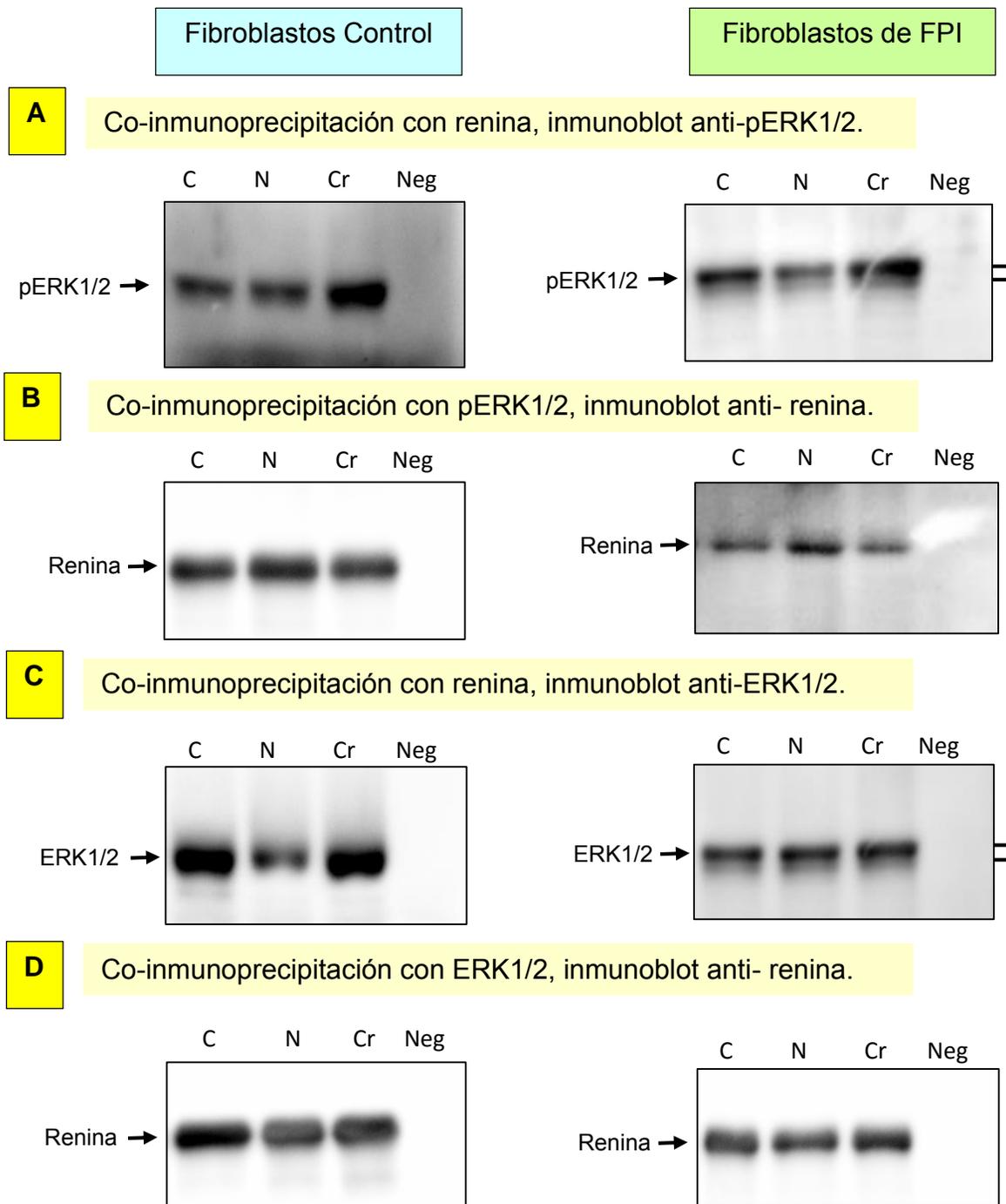


Figura 6. Se pueden observar las co-inmunoprecipitación de cada fracción celular seguida de un análisis por Western Blot. Se indican las fracciones celulares analizadas: C, fracción citoplásmica; N, fracción nuclear; Cr, fracción de cromatina; Neg, negativo. Para comprobar el resultado del panel A se realizó el panel B, para comprobar el resultado del panel C se realizó el panel D. Se halló la probable interacción entre la renina y las ERK1/2 en todas las fracciones celulares de ambos tipos de fibroblastos.

Localización de la renina intracelular y las ERK1/2 fosforiladas por inmunofluorescencia

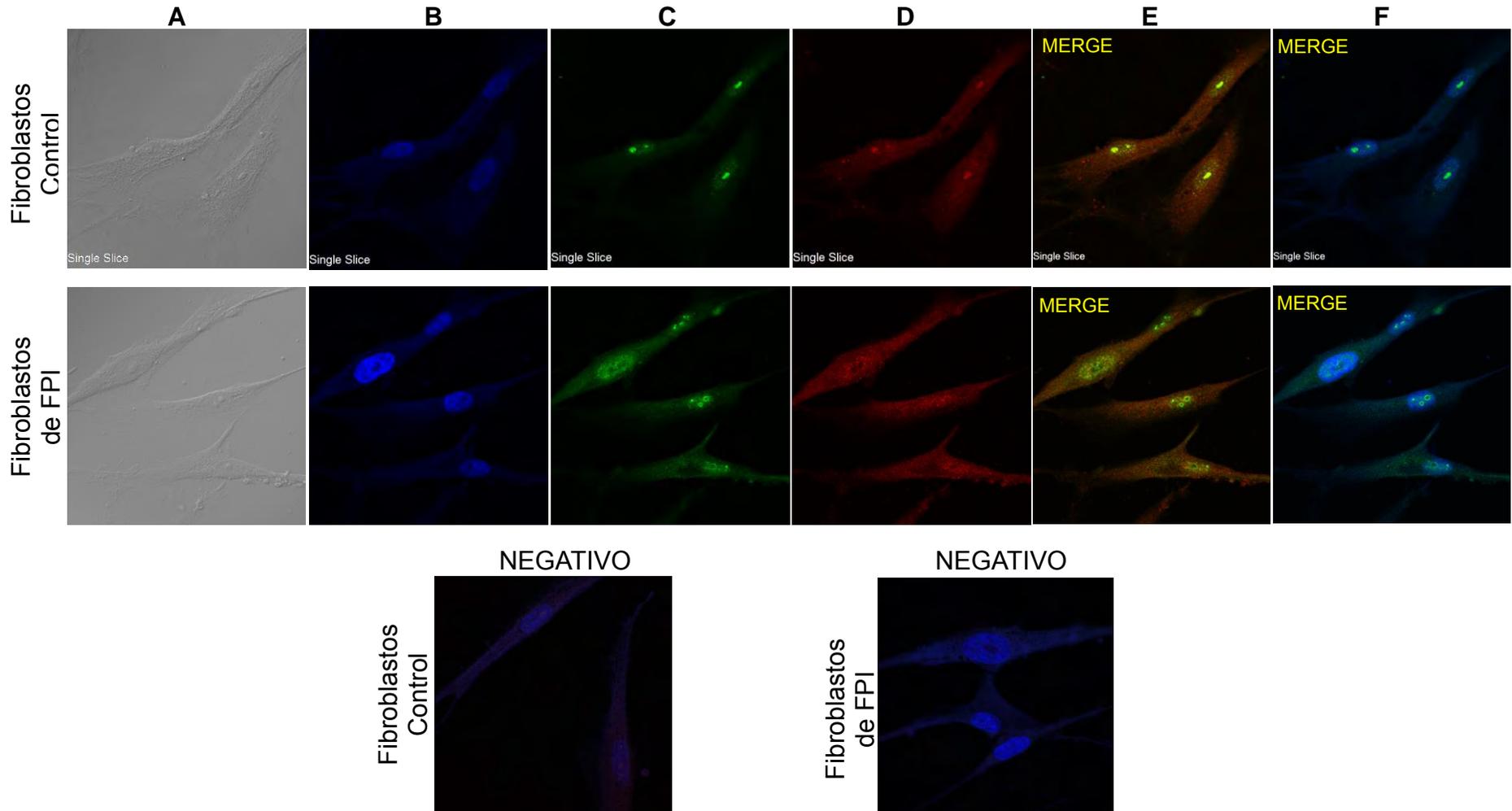


Figura 7. Localización de la renina y pERK1/2 por inmunofluorescencia. Panel A, imagen de contraste de fases. Panel B, tinción para núcleo con DAPI. Panel C, tinción para la renina; D, tinción para las pERK1/2; E, Merge de tinción para la renina + la tinción para las pERK1/2; F, merge de la tinción para la renina + la tinción con el DAPI; Negativo, tinción solo con anticuerpos secundarios indicando que las tinciones son específicas. Se halló presencia de la renina en núcleo y distribución de las pERK1/2 en toda la célula.

Para comprobar por otro método estos hallazgos se realizó un ensayo de co-localización con inmunofluorescencia mostrado en la figura 7. En el panel C se observó la presencia de la renina en la zona del núcleo, cuya señal correspondió con la región del núcleo teñida con DAPI observada en el panel F. Las cinasas pERK1/2 expuestas en el panel D se encontraron distribuidas tanto en citoplasma como en núcleo. La co-localización de la renina y pERK1/2 pudo observarse en las zonas nucleares de los fibroblastos en color amarillo mostradas en el panel E. La co-localización es muy evidente tanto en los núcleos de los fibroblastos control como en los de FPI.

Análisis de resultados

El mecanismo patogénico que conduce al desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática aun no es comprendido completamente ni se conocen todas las moléculas que podrían participar en este proceso; se ha reportado que la renina en su forma secretada es una de las moléculas que podría estar influenciando el microambiente fibrótico, ya que se encuentra sobreexpresada en la FPI y por lo tanto puede estar involucrada en la progresión de la enfermedad, por lo que este trabajo se ha centrado en encontrar y localizar a la renina intracelular en los fibroblastos pulmonares.

Se halló que la renina intracelular se expresa en los fibroblastos pulmonares control y de pacientes con FPI, ésta renina intracelular se encontró expresada en el núcleo, lo cual no había sido reportado con anterioridad. Sin embargo, otros estudios han reportado también la presencia de la renina en el medio intracelular en órganos como el corazón, en donde se ha localizado en el citosol y las mitocondrias de cardiomiocitos y en el cerebro, donde sólo se ha indicado su presencia intracelular en astrocitos pero no su localización, además no se ha determinado si esta isoforma de la renina es la renina completa o la isoforma intracelular. (56, 57)

Con el ensayo de co-localización con inmunofluorescencias se confirmó la presencia de la renina dentro de la célula y de manera muy interesante dentro del núcleo, donde se observaron regiones en las que hay mayor intensidad de la señal de la renina sin la co-localización con las pERK1/2, este tipo de señal tan particular nos hace pensar que se trata de nucléolos, puesto que se ha reportado que los nucléolos son fácilmente observables en un cultivo celular en monocapa bajo

microscopio de contraste de fases, donde aparecen como formas ovales de distintos tamaños; aunque esto no puede asegurarse hasta hacer una tinción específica para tal estructura.(58)

La ubicación de la renina intracelular en el núcleo es de gran interés ya que no se conocen actualmente todas las funciones de ésta proteína en el medio intracelular. No obstante, no es la primera vez que se encuentra a una proteína que normalmente es secretada fuera de la célula en el medio intracelular, su presencia en el núcleo podría indicar que participa en eventos moleculares dentro del mismo como se ha reportado con otras proteínas como la MMP12 (metaloproteasa de matriz 12) y NAG-1 (Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1) que parecen tener actividad como coactivadores de la transcripción o factores de transcripción cuando se localizan en núcleo.(44, 45)

Las ERKs no fosforiladas también se encontraron distribuidas en el núcleo, esto puede deberse a que las ERKs sin fosforilar pueden entrar al núcleo por un mecanismo independiente de energía facilitado por interacción directa con las nucleoporinas. Por otro lado, las ERKs fosforiladas se observaron tanto en citoplasma como en núcleo, tal como se esperaba pues los fibroblastos necesitan de la translocación de pERK1/2 al núcleo para su proliferación, por tanto estas proteínas se encontraron distribuidas en toda la célula. (47, 51)

La interacción entre la renina y las ERKs observada en los ensayos de co-precipitación y co-localización confirma los datos hallados previamente en el laboratorio mediante el software SITESCAN en cuanto a la interacción de ambas proteínas. Además, los inmunoblots podrían sugerir que la renina intracelular se une

predominantemente a ERK1, sin embargo esto no será más claro hasta utilizar un control de carga en el inmunoblot y después hacer un análisis de densitometría. Aunque se ha sugerido que las dos isoformas de las ERK son muy similares en peso molecular y funciones, ERK2 ha sido más estudiada que ERK1 y sus funciones no son completamente iguales, por lo que ésta interacción podría resultar en una diferencia en la función de ambas ERKs.(47)

Se desconoce si el tipo de interacción que se da entre las proteínas ERK1/2 y la renina es transitoria o permanente tanto en el núcleo como en el citoplasma, sin embargo esta unión podría estar involucrada en la activación de las funciones de las ERKs, pues se ha identificado en otros estudios que algunas proteínas pueden controlar la duración, magnitud y compartimentalización de la actividad de las ERKs, lo que afectaría las respuestas celulares, ejemplos de estas proteínas son las GTPasas Ras y Rap1, la proteína cinasa C (PKC) y las proteínas de andamiaje como la KSR (cinasa supresora de Ras-1) y MP1 (MEK partner-1) .(51)

Conclusiones

- El estudio demostró la presencia de la renina intracelular en fibroblastos pulmonares humanos localizada en el núcleo de las células.
- Se determinó que existe la probable interacción entre la renina intracelular y las ERK1/2 en las fracciones citoplásmica, nuclear y de cromatina, la cual podría ejercer un papel importante en la regulación de la actividad de las ERKs dentro de la célula.

Aunque no se realizaron ensayos funcionales para la renina intracelular, la localización de ésta es el primer paso en la posterior dilucidación de sus funciones intracelulares.

Perspectivas

Localizar a la renina intracelular en dos cultivos o líneas de fibroblastos pulmonares diferentes para así poder determinar si hay alguna diferencia en su localización o expresión entre fibroblastos control y fibroblastos procedentes de pacientes con FPI.

Transfectar la renina intracelular a fibroblastos control y procedentes de pacientes con FPI para sobreexpresarla e inhibirla y así estudiar sus funciones.

Referencias

1. King TE, Jr., Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2011 Dec 3;378(9807):1949-61. PubMed PMID: 21719092.
2. Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2002 Dec;34(12):1534-8. PubMed PMID: 12379275.
3. Montes E, Ruiz V, Checa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J, Montano M, et al. Renin is an angiotensin-independent profibrotic mediator: role in pulmonary fibrosis. *The European respiratory journal*. 2012 Jan;39(1):141-8. PubMed PMID: 21659414.
4. Abadir PM, Walston JD, Carey RM. Subcellular characteristics of functional intracellular renin-angiotensin systems. *Peptides*. 2012 Dec;38(2):437-45. PubMed PMID: 23032352. Pubmed Central PMCID: 3770295.
5. Abadir PM, Foster DB, Crow M, Cooke CA, Rucker JJ, Jain A, et al. Identification and characterization of a functional mitochondrial angiotensin system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011 Sep 6;108(36):14849-54. PubMed PMID: 21852574. Pubmed Central PMCID: 3169127.
6. Alzayadneh EM, Chappell MC. Nuclear expression of renin-angiotensin system components in NRK-52E renal epithelial cells. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2015 Dec;16(4):1135-48. PubMed PMID: 24961503. Pubmed Central PMCID: 4276551.
7. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature medicine*. 2012 Jul;18(7):1028-40. PubMed PMID: 22772564. Pubmed Central PMCID: 3405917.
8. Panganiban RA, Day RM. Hepatocyte growth factor in lung repair and pulmonary fibrosis. *Acta pharmacologica Sinica*. 2011 Jan;32(1):12-20. PubMed PMID: 21131996. Pubmed Central PMCID: 4003323.
9. Pardo A, Selman M. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2002 Aug 1;7:d1743-61. PubMed PMID: 12133818.
10. Xaubet A, Ancochea J, Blanquer R, Montero C, Morell F, Rodriguez Becerra E, et al. [Diagnosis and treatment of diffuse interstitial lung diseases]. *Archivos de bronconeumologia*. 2003 Dec;39(12):580-600. PubMed PMID: 14636495. Diagnostico y tratamiento de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas.
11. Nalysnyk L, Cid-Ruzafa J, Rotella P, Esser D. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2012 Dec 1;21(126):355-61. PubMed PMID: 23204124.
12. Meltzer EB, Noble PW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Orphanet journal of rare diseases*. 2008;3:8. PubMed PMID: 18366757. Pubmed Central PMCID: 2330030.
13. Hutchinson JP, McKeever TM, Fogarty AW, Navaratnam V, Hubbard RB. Increasing global mortality from idiopathic pulmonary fibrosis in the twenty-first century. *Annals of the American Thoracic Society*. 2014 Oct;11(8):1176-85. PubMed PMID: 25165873.

14. Xaubet A, Ancochea J, Bollo E, Fernandez-Fabrellas E, Franquet T, Molina-Molina M, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. Sociedad Espanola de Neumologia y Cirugia Toracica (SEPAR) Research Group on Diffuse Pulmonary Diseases. *Archivos de bronconeumologia*. 2013 Aug;49(8):343-53. PubMed PMID: 23742884.
15. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Jr., Lynch DA, Nicholson AG, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013 Sep 15;188(6):733-48. PubMed PMID: 24032382.
16. Selman M, Pardo A. Stochastic age-related epigenetic drift in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014 Dec 15;190(12):1328-30. PubMed PMID: 25496096.
17. Garcia-Sancho Figueroa MC, Carrillo G, Perez-Padilla R, Fernandez-Plata MR, Buendia-Roldan I, Vargas MH, et al. Risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis in a Mexican population. A case-control study. *Respiratory medicine*. 2010 Feb;104(2):305-9. PubMed PMID: 19782552.
18. Macneal K, Schwartz DA. The genetic and environmental causes of pulmonary fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2012 Jul;9(3):120-5. PubMed PMID: 22802285.
19. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of clinical investigation*. 2007 Mar;117(3):524-9. PubMed PMID: 17332879. Pubmed Central PMCID: 1804380.
20. Selman M, Pardo A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2006 Jun;3(4):364-72. PubMed PMID: 16738202.
21. Gifford AH, Matsuoka M, Ghoda LY, Homer RJ, Enelow RI. Chronic inflammation and lung fibrosis: pleiotropic syndromes but limited distinct phenotypes. *Mucosal immunology*. 2012 Sep;5(5):480-4. PubMed PMID: 22806097.
22. Liu RM. Oxidative stress, plasminogen activator inhibitor 1, and lung fibrosis. *Antioxidants & redox signaling*. 2008 Feb;10(2):303-19. PubMed PMID: 17979497. Pubmed Central PMCID: 3686819.
23. Harari S, Caminati A. IPF: new insight on pathogenesis and treatment. *Allergy*. 2010 May;65(5):537-53. PubMed PMID: 20121758.
24. Godwin J, Kuraitis D, Rosenthal N. Extracellular matrix considerations for scar-free repair and regeneration: insights from regenerative diversity among vertebrates. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014 Nov;56:47-55. PubMed PMID: 25450455.
25. Balestrini JL, Niklason LE. Extracellular Matrix as a Driver for Lung Regeneration. *Annals of biomedical engineering*. 2014 Oct 25. PubMed PMID: 25344351.
26. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Frontiers in pharmacology*. 2014;5:123. PubMed PMID: 24904424. Pubmed Central PMCID: 4034148.
27. Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2015 Jan 16. PubMed PMID: 25599939.

28. McKeown S, Richter AG, O'Kane C, McAuley DF, Thickett DR. MMP expression and abnormal lung permeability are important determinants of outcome in IPF. *The European respiratory journal*. 2009 Jan;33(1):77-84. PubMed PMID: 18829682.
29. Guarino M, Tosoni A, Nebuloni M. Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Human pathology*. 2009 Oct;40(10):1365-76. PubMed PMID: 19695676.
30. RC G-d-A. Fibrocitos circulantes. Descubrimiento, características y relevancia clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2007;20(2):10. Epub abril 2007. Español.
31. Sakai N, Tager AM. Fibrosis of two: Epithelial cell-fibroblast interactions in pulmonary fibrosis. *Biochimica et biophysica acta*. 2013 Jul;1832(7):911-21. PubMed PMID: 23499992. Pubmed Central PMCID: 4041487.
32. Wang R, Ramos C, Joshi I, Zagariya A, Pardo A, Selman M, et al. Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *The American journal of physiology*. 1999 Dec;277(6 Pt 1):L1158-64. PubMed PMID: 10600886.
33. Ferrao FM, Lara LS, Lowe J. Renin-angiotensin system in the kidney: What is new? *World journal of nephrology*. 2014 Aug 6;3(3):64-76. PubMed PMID: 25332897. Pubmed Central PMCID: 4202493.
34. Shenoy V, Ferreira AJ, Qi Y, Fraga-Silva RA, Diez-Freire C, Dooies A, et al. The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010 Oct 15;182(8):1065-72. PubMed PMID: 20581171. Pubmed Central PMCID: 2970847.
35. Tamargo J GR, Amorós I, Barana A, Caballero R, Delpón E. Fisiopatología de la prorenina y la renina. Cincuenta años en busca de los inhibidores directos de la renina. Sus ventajas y sus limitaciones. *Revista española de cardiología*. 2009;9(Supl A):17. Epub 2009. Español.
36. Lee-Kirsch MA, Gaudet F, Cardoso MC, Lindpaintner K. Distinct renin isoforms generated by tissue-specific transcription initiation and alternative splicing. *Circulation research*. 1999 Feb 5;84(2):240-6. PubMed PMID: 9933256.
37. Montes E. Receptor Renina/Prorenina y su relación con la fibrosis pulmonar idiopática. *Neumol Cir Torax*. 2010;69(2):7. Epub Abril-Junio 2010. Español.
38. Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, McQuillan D, Owens RT, Yu L, et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney international*. 2006 Jan;69(1):105-13. PubMed PMID: 16374430.
39. Huang Y, Noble NA, Zhang J, Xu C, Border WA. Renin-stimulated TGF-beta1 expression is regulated by a mitogen-activated protein kinase in mesangial cells. *Kidney international*. 2007 Jul;72(1):45-52. PubMed PMID: 17396111.
40. Peters J. Cytosolic (pro)renin and the matter of intracellular renin actions. *Frontiers in bioscience*. 2013;5:198-205. PubMed PMID: 23277045.
41. Alzayadneh EM, Chappell MC. Nuclear expression of renin-angiotensin system components in NRK-52E renal epithelial cells. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2014 Jun 24. PubMed PMID: 24961503.

42. Sinn PL, Sigmund CD. Identification of three human renin mRNA isoforms from alternative tissue-specific transcriptional initiation. *Physiological genomics*. 2000 Jun 29;3(1):25-31. PubMed PMID: 11015597.
43. Re RN. Intracellular renin and the nature of intracrine enzymes. *Hypertension*. 2003 Aug;42(2):117-22. PubMed PMID: 12860832.
44. Min KW, Liggett JL, Silva G, Wu WW, Wang R, Shen RF, et al. NAG-1/GDF15 accumulates in the nucleus and modulates transcriptional regulation of the Smad pathway. *Oncogene*. 2015 Apr 20. PubMed PMID: 25893289. Pubmed Central PMCID: 4613816.
45. Marchant DJ, Bellac CL, Moraes TJ, Wadsworth SJ, Dufour A, Butler GS, et al. A new transcriptional role for matrix metalloproteinase-12 in antiviral immunity. *Nature medicine*. 2014 May;20(5):493-502. PubMed PMID: 24784232.
46. Shimizu-Hirota R, Xiong W, Baxter BT, Kunkel SL, Maillard I, Chen XW, et al. MT1-MMP regulates the PI3Kdelta.Mi-2/NuRD-dependent control of macrophage immune function. *Genes & development*. 2012 Feb 15;26(4):395-413. PubMed PMID: 22345520. Pubmed Central PMCID: 3289887.
47. Roskoski R, Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2012 Aug;66(2):105-43. PubMed PMID: 22569528.
48. Burkhard KA, Chen F, Shapiro P. Quantitative analysis of ERK2 interactions with substrate proteins: roles for kinase docking domains and activity in determining binding affinity. *The Journal of biological chemistry*. 2011 Jan 28;286(4):2477-85. PubMed PMID: 21098038. Pubmed Central PMCID: 3024742.
49. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3100-12. PubMed PMID: 17496909.
50. Zehorai E, Yao Z, Plotnikov A, Seger R. The subcellular localization of MEK and ERK--a novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010 Jan 27;314(2):213-20. PubMed PMID: 19406201.
51. Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *Journal of cell science*. 2005 Jul 15;118(Pt 14):2997-3002. PubMed PMID: 16014377.
52. Schreiber G, Keating AE. Protein binding specificity versus promiscuity. *Current opinion in structural biology*. 2011 Feb;21(1):50-61. PubMed PMID: 21071205. Pubmed Central PMCID: 3053118.
53. Levy ED, Pereira-Leal JB. Evolution and dynamics of protein interactions and networks. *Current opinion in structural biology*. 2008 Jun;18(3):349-57. PubMed PMID: 18448325.
54. Eishingdrelo H, Sun W, Li H, Wang L, Eishingdrelo A, Dai S, et al. ERK and beta-arrestin interaction: a converging point of signaling pathways for multiple types of cell surface receptors. *Journal of biomolecular screening*. 2015 Mar;20(3):341-9. PubMed PMID: 25361946.
55. Arenas AF, Salcedo GE, Montoya AM, Gomez-Marin JE. MSCA: a spectral comparison algorithm between time series to identify protein-protein interactions. *BMC bioinformatics*. 2015 May 13;16(1):152. PubMed PMID: 25963052.

56. Wanka H, Kessler N, Ellmer J, Endlich N, Peters BS, Clausmeyer S, et al. Cytosolic renin is targeted to mitochondria and induces apoptosis in H9c2 rat cardiomyoblasts. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009 Sep;13(9A):2926-37. PubMed PMID: 18671756. Pubmed Central PMCID: 4498947.
57. Lavoie JL, Liu X, Bianco RA, Beltz TG, Johnson AK, Sigmund CD. Evidence supporting a functional role for intracellular renin in the brain. *Hypertension*. 2006 Mar;47(3):461-6. PubMed PMID: 16446393.
58. Lo SJ, Lee CC, Lai HJ. The nucleolus: reviewing oldies to have new understandings. *Cell research*. 2006 Jun;16(6):530-8. PubMed PMID: 16775624.