



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PAPEL DE R-SPONDIN 2 EN EL DESARROLLO DE LA FIBROSIS PULMONAR**  
**IDIOPÁTICA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**ADRIÁN MUNGUÍA REYES**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: M. en C. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ**

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**DR. FELIPE VADILLO ORTEGA**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**CD. MX., MAYO, 2018.**



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.




Lic. Ivonne Ramirez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 12 de marzo de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **MUNGUÍA REYES ADRIÁN**, con número de cuenta **99195652**, con la tesis titulada **"PAPEL DE R-SPONDIN 2 EN EL DESARROLLO DE LA FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA"**, realizada bajo la dirección del **M. EN C. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA**:

Presidente: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE  
Vocal: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES  
Secretario: DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ  
Suplente: DR. JULIO MORÁN ANDRADE  
Suplente: DR. FELIPE VADILLO-ORTEGA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 23 de abril de 2018

  
DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de pertenecer a este programa que cuenta con un alto prestigio y reconocimiento a nivel mundial, para llevar a cabo mi formación doctoral. De igual manera, agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por apoyarme financieramente para participar en ATS 2015 International Conference en Denver Col. USA. y al XXX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Guadalajara Jalisco.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo con una beca de manutención (CVU/Becario: 295309/225560) y apoyo para ciencia básica (No. #252624).

A los miembros de mi Comité Tutor, por sus enormes aportes durante el desarrollo de este proyecto, por su apoyo, interés y excelentes discusiones:

- M. En C. Moisés Selman (Tutor)
- Dra. María de Lourdes Segura Valdez
- Dr. Felipe Vadillo Ortega

A los miembros del jurado de examen por sus aportaciones en la revisión de este trabajo: Dra. María Eugenia Gonsebatt, Dra. Teresa Fortoul, Dr. Julio Morán.

A mi tutor Dr. Moisés Selman, por estar al pendiente de este proyecto y de mi desarrollo profesional, brindándome su apoyo siempre y por haberme permitido pertenecer a este excelente grupo de investigación.

A la Dra. Annie Pardo, porque gracias a usted es que comencé mi camino en esta línea de investigación, y sin su apoyo probablemente no estaría hoy aquí, culminando este trabajo.

Al Dr. Jorge Meléndez y el Instituto Nacional de Ciencias Genómicas por su apoyo para la secuenciación de RNA

A Carina Becerril, por estar ahí siempre, para apoyarme y compartir tu conocimiento sin ninguna restricción, por permitirme trabajar contigo, sin tu apoyo este proyecto no hubiera llegado a tan buen término.

A la Dra. Blanca Ortiz y a Dámaris Romero por su apoyo científico y técnico en citometría de Flujo.

A Remedios Ramírez por su ayuda con las inmunohistoquímicas de tejidos.

A mis compañeros y amigos que estuvieron ahí acompañándome en este camino; Miguel Negreros, por siempre tener tiempo para mí aunque no lo tenías. Mariel Maldonado, por escucharme y presionarme siempre. Miguel Ramírez por acompañarme a despejar la cabeza cuando era necesario. Yalbi, por tu apoyo con la parte de secuenciación y su confianza para que pudiera seguir teniendo comida y techo dignamente. Ivette por su visión positiva de la vida. A todos los investigadores y alumnos que forman parte de la unidad de Investigación del INER; Martha y Carlos, Criselda, Ily y Pepe, Ana Lilia, Marco Checa, Victor, Ana Mayela, Erika Rubí, Gaby, Yair, Karen B, Fernando H. (pollo), Claudia, Gael, por supuesto a Alma y Magda.

A mi familia, a todos por ser una gran familia, porque ustedes son una gran inspiración para seguir adelante., incluyendo a Bernardo porque ya sabes que eres parte de mi familia.

A Yis por estar conmigo en mis momentos más oscuros y ayudarme iluminando mi vida, por demostrarme con acciones que el camino que elegimos es posible, por confiar en mí y ser siempre tú. Gracias

**Si nos paramos a pensar en las pequeñas cosas,  
llegaremos a entender las grandes.  
José Saramago**

## Índice general

Índice general .....	I
Índice de figuras .....	III
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
ANTECEDENTES .....	1
Fibrosis pulmonar idiopática .....	1
Vía de señalización Wnt .....	2
La familia de las R-Spondinas .....	5
Estructura de las R-spondinas .....	6
Papel fisiológico de las R-Spondinas .....	7
Participación de R-Spondin 2 en enfermedades crónico-degenerativas ..	8
OBJETIVO GENERAL .....	11
Objetivos particulares... ..	11
MATERIAL Y MÉTODOS .....	12
Obtención de tejidos y células.....	12
PCR-tiempo real.....	12
Inmunohistoquímica.....	13
Secuenciación de RNA de siguiente generación (RNAseq) .....	13
Arreglo de Wnt .....	14
Western blot .....	15
Ensayo de tasa de crecimiento .....	16
Ensayo de proliferación celular .....	17
Ensayo de apoptosis .....	17
Detección de colágena .....	18
Transfección celular .....	19
Análisis estadístico .....	20
RESULTADOS .....	21
R-Spondina 2 y su receptor LGR6 se encuentran sobreexpresados	

en pulmones de FPI y se localizan en fibroblastos y células epiteliales ..	21
La expresión del gen de RSPO2 se encuentra incrementada en fibroblastos de FPI .....	23
R-Spondina 2 modifica el perfil de expresión general en fibroblastos pulmonares humanos normales y de FPI .....	24
R-Spondina 2 modifica la expresión de genes que pertenecen a la vía de señalización de WNT en fibroblastos derivados de FPI .....	26
R-Spondina 2 modifica la expresión de genes involucrados en ciclo celular .....	28
R-Spondina 2 disminuye la proliferación de fibroblastos .....	31
R-Spondina 2 induce apoptosis en fibroblastos pulmonares .....	33
R-Spondina 2 disminuye la producción de colágena e incrementa la expresión de metaloproteasa de matriz (MMP)-1 .....	36
Efecto del silenciamiento de R-Spondina 2 en la proliferación y expresión de estratifina, colágena y MMP-1 por fibroblastos pulmonares humanos .....	38
Efecto de R-Spondina 2 en células epiteliales alveolares .....	40
DISCUSIÓN .....	42
REFERENCIAS .....	50
ARTICULO REQUISITO .....	56



## Índice de figuras y tablas

Figura 1. Vía canónica de WNT .....	4
Figura 2. Estructura primaria de R-Spondina1 .....	6
Figura 3. Arquitectura de los dominios proteicos y localización cromosómica de las R-Spondinas humanas .....	7
Figura 4. Niveles de expresión de R-Spondina 2 y LGR6 en pulmones de FPI y controles .....	21
Figura 5. Localización celular de RSPO2 y LGR6 en tejido pulmonar .....	22
Figura 6. Niveles de expresión génica de RSPO2 y LGR6 en fibroblastos de FPI y de pulmones normales .....	24
Figura 7. Diagrama de Venn .....	25
Tabla 1. R-Spondina 2 modifica la expresión de genes que pertenecen a la vía de señalización de WNT en fibroblastos derivados de FPI .....	25
Figura 8. rhRSPO2 modifica la expresión de genes de la vía de WTN.....	28
Figura 9. R-Spondina 2 modifica la expresión de Stratifina (SFN) en fibroblastos pulmonares de FPI .....	30
Figura 10. Curva dosis-respuesta utilizando tres concentraciones de rhRSPO2 1, 10 y 100 ng/ml .....	31
Figura 11. R-Spondin 2 reduce la tasa de crecimiento de fibroblastos .....	33
Figura 12. R-Spondina 2 induce apoptosis en fibroblastos normales y de FPI ..	35
Figura 13. R-Spondina2 disminuye la producción de colágena .....	37
Figura 14. R-Spondina2 incrementa la secreción de MMP-1 .....	38
Figura 15. Efectos de silenciamiento de R-Spondina2 en proliferación de fibroblastos .....	39
Figura 16. Efectos de silenciamiento de R-Spondina2 en expresión de moléculas blanco .....	40
Figura 17. La concentración de E-caderina se determinó mediante Western Blot .....	41
Figura 18. R-Spondina 2 no modifica la apoptosis en células epiteliales A549 ..	42

## Resumen

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad crónica, progresiva e irreversible de causa desconocida, caracterizada por la activación aberrante del epitelio bronquioalveolar, la expansión de la población de miofibroblastos con acumulación excesiva de matriz extracelular y destrucción del parénquima pulmonar. La familia de R-Spondinas (RSPO) comprende un grupo de proteínas esenciales para el desarrollo embrionario. De ellas la RSPO2 se expresa principalmente en los pulmones y sus mutaciones causan defectos severos en el tracto respiratorio. De manera interesante, RSPO2 participa en la vía canónica de WNT, que es una ruta crítica en la patogénesis de FPI. Así entonces, el objetivo de este estudio fue examinar la expresión y el posible papel de RSPO2 en esta enfermedad. Encontramos que RSPO2 y su receptor LGR6 estaban sobre-regulados en pulmones de FPI y ambas se localizaron principalmente en fibroblastos y células epiteliales. La estimulación de fibroblastos pulmonares normales y derivados de FPI con hRSPO2 recombinante resultó en la des-regulación de numerosos genes, aunque la respuesta transcripcional fue esencialmente distinta. En fibroblastos de FPI, la estimulación con RSPO2 indujo sobre-expresión o disminución de varios genes involucrados en la vía de WNT (principalmente de la señalización no canónica), mientras que tanto en fibroblastos obtenidos de pulmones normales como de FPI, RSPO2 modificó la expresión de genes implicados en diferentes rutas de señalización, incluyendo ciclo celular y apoptosis. Corroborando los datos de expresión génica, la estimulación de fibroblastos normales y de FPI con RSPO2 redujo de manera significativa la proliferación celular e indujo la muerte celular. RSPO2 también inhibió la producción de colágena e incrementó la expresión de metaloproteasa de matriz

(MMP)-1. El silenciamiento de RSPO2 con RNA de horquilla corta indujo los efectos opuestos. Los resultados de esta investigación demuestran por primera vez que RSPO2 está sobre-expresada en FPI donde parece tener un papel antifibrótico.

## **Abstract**

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive and irreversible disease of unknown etiology, characterized by the aberrant activation of the bronchioalveolar epithelium, the expansion of the myofibroblasts population with excessive extracellular matrix accumulation, and destruction of the lung parenchyma. The R-spondins family (RSPO) comprises a group of proteins essential for development. From them, RSPO2 is expressed primarily in the lungs and its mutations cause severe defects in the respiratory tract. Interestingly, RSPO2 participates in the canonical WNT pathway, a critical route in the pathogenesis of IPF. Thus, the aim of this study was to examine the expression and putative role of RSPO2 in this disease. We found that RSPO2 and its receptor LGR6 were upregulated in IPF lungs where they localized primarily in fibroblasts and epithelial cells. Stimulation of IPF and normal lung fibroblasts with recombinant hRSPO2 resulted in the deregulation of numerous genes although the transcriptional response was essentially distinct. In IPF fibroblasts, RSPO2 stimulation induced the up- or down-regulation of several genes involved in the WNT pathway (mainly from non-canonical signaling). In both, normal and IPF fibroblasts RSPO2 modified the expression of genes implicated in several pathways including cell cycle and apoptosis. According with the gene expression, the stimulation of normal and IPF fibroblasts with RSPO2 significantly reduced cell proliferation and induced cell death. RSPO2 also inhibited collagen production and increased the expression of matrix metalloprotease (MMP)-1. Silencing RSPO2 with short hairpin RNA induced the opposite effects. Our findings demonstrate by

the first time that RSPO2 is up-regulated in IPF where it appears to have an antifibrotic role.

## **Antecedentes**

### **Fibrosis Pulmonar Idiopática**

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad crónica, irreversible, habitualmente progresiva y letal de etiología desconocida (1,2). En términos generales, aproximadamente la mitad de los pacientes fallece 2 a 3 años después del diagnóstico y actualmente no existe ningún tratamiento razonablemente efectivo para esta enfermedad. (1). En los últimos años se ha comenzado a usar pirfenidona y nintedanib, dos fármacos potencialmente antifibróticos que reducen la velocidad de progresión de la FPI (1, 3, 4).

Aunque la FPI es de etiología desconocida, se ha propuesto que la enfermedad es resultado de una compleja interacción de factores genéticos y ambientales (5). En este contexto, variantes genéticas asociadas con adhesión celular, mantenimiento del largo de los telómeros, y mecanismos de defensa se han asociado a FPI (6). Entre los diversos factores ambientales que incrementan el riesgo a desarrollar esta enfermedad, el hábito de fumar es el principal de ellos (1, 7, 8). Asimismo, es importante destacar que la FPI es una enfermedad asociada con el envejecimiento, dado que ocurre en individuos adultos mayores de 50 años y su incidencia y prevalencia incrementa considerablemente después de los 60 años de edad. A pesar de esta clara asociación, aún no se conocen con precisión los mecanismos por los cuales el envejecimiento contribuye en la patogénesis de la enfermedad (5,9) aunque varias alteraciones asociadas al envejecimiento, por ejemplo, acortamiento de los telómeros, disfunción mitocondrial y senescencia celular ocurren exageradamente en estos pacientes, afectando primordialmente a las células epiteliales (10, 11, 12, 13).

De hecho, se ha propuesto que la FPI se inicia con daño y activación de las células del epitelio alveolar que secretan una gran variedad de factores que provocan la migración y proliferación de fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos en los sitios de lesión. Estas células se organizan en pequeños focos de fibroblastos/miofibroblastos los cuales son responsables del depósito exagerado de moléculas de matriz extracelular lo que trae como consecuencia la desorganización de la arquitectura del parénquima pulmonar y la pérdida de las unidades de intercambio gaseoso con la consecuente insuficiencia respiratoria (2,14).

Aunque los mecanismos patogénicos que participan en esta secuencia no se conocen con precisión, diferentes evidencias sugieren que la recapitulación de diversas vías de desarrollo embrionario puede desempeñar un papel importante (5,6). Así, se ha demostrado que Wingless / int1 (WNT) y otras vías de señalización embriológicas están sobreexpresadas en pulmones de FPI, afectando principalmente células epiteliales alveolares y fibroblastos (15-20).

### **Vía de señalización WNT.**

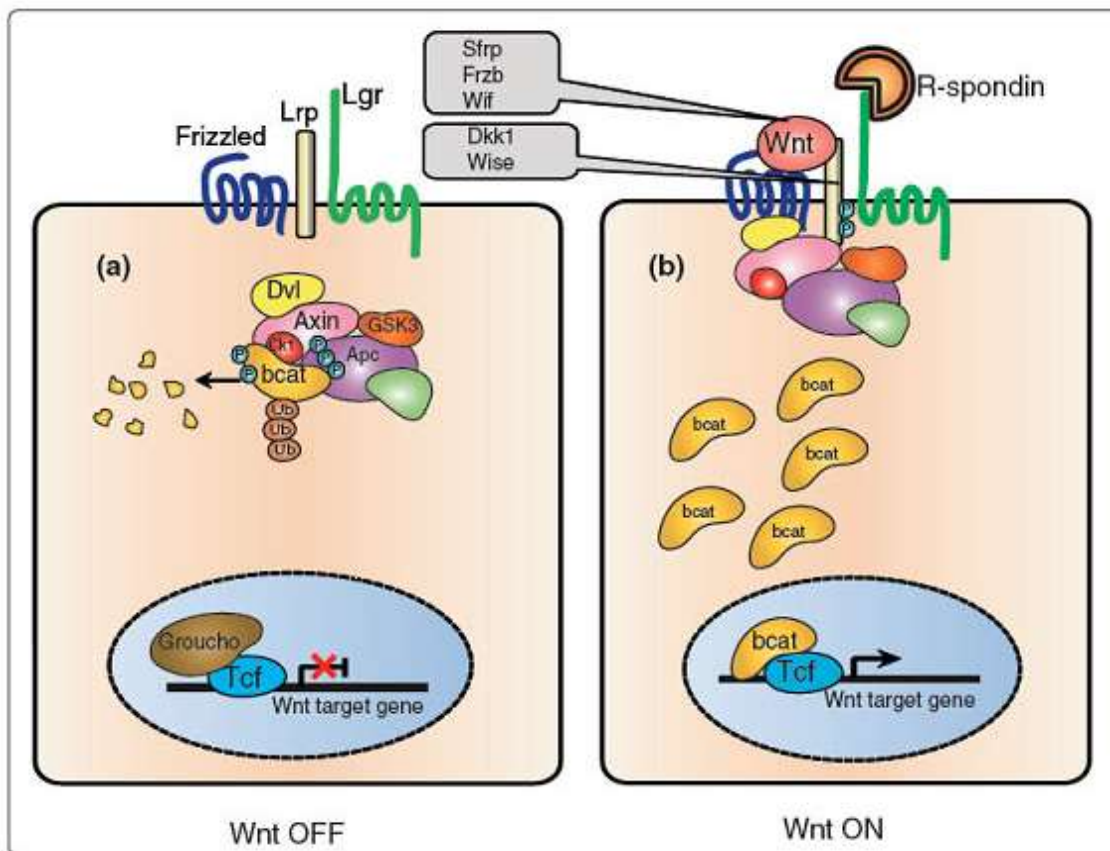
La vía de señalización WNT/ $\beta$ -catenina se encuentra altamente conservada en todos los grupos de animales. En humanos, la familia de WNT está constituida por 19 proteínas de secreción, que se expresan en diferentes etapas durante el desarrollo embrionario y que tienen una notable influencia en la polaridad y el destino celular. También se ha descrito que en organismos adultos, la vía de señalización de WNT está involucrada en homeostasis, mantenimiento de células troncales y regeneración de tejidos, y existe evidencia de que su descontrol se

relaciona con procesos patológicos como cáncer y diversas enfermedades crónicas degenerativas (21).

Como se ilustra en la figura 1, la vía canónica WNT/ $\beta$ -catenina se activa al interactuar el ligando de WNT con su complejo receptor; cuando el ligando de WNT no interactúa con este complejo de receptores,  $\beta$ -catenina es fosforilada en un complejo formado por APC (*Adenomatous polyposis coli*), que es la proteína encargada del reconocimiento de  $\beta$ -catenina, y Axina. En este complejo, APC interactúa con Axina y con la participación de dos quinasas de treonina/serina, CK1 (*Casein kinase 1*) y GSK3 $\alpha/\beta$  (*Glycogen synthase kinase-3 alpha/beta*) la  $\beta$ -catenina es fosforilada y posteriormente reconocida por  $\beta$ -TrCP (*beta-transducin repeat containing protein*) que ubiquitina a  $\beta$ -catenina lo que la lleva a una degradación por proteosoma. Cuando esto sucede, Groucho se une en el núcleo con el factor de transcripción de células T (TCF) e inhibe la transcripción de genes blanco de WNT. Por el contrario, cuando el ligando WNT está presente, se une al complejo de receptores de membrana, Frizzled y LRP5/6 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6*) lo que activa la llamada vía canónica. Frizzled interactúa con Dishevelled (Dvl) que es una proteína que participa tanto en la vía canónica como en la vía no canónica WNT/PCP (*Planar cell polarity*). La función principal de Dvl es transferir la señal de WNT y su receptor con los componentes río abajo en la vía de señalización. Cuando WNT se une a su complejo de receptores se fosforila Dvl y WNT controla la fosforilación de LRP5/6 por Gsk3b y Ck1 lo que lleva al acoplamiento de Axina con LRP fosforilada. Este acoplamiento permite la estabilización y acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma, su translocación al núcleo y el desplazamiento de Groucho de su



interacción con TCF/Lef (*Lymphoid enhancer factor*) lo que permite la transcripción de genes blanco de WNT (22, 23) (**Figura 1**).



**Figura 1. Vía canónica de WNT. Panel izquierdo.** Cuando no está presente el ligando WNT, las cinasas CK1 y GSK3 fosforilan a  $\beta$ -catenina la cual es reconocida por bTrCP, un miembro del complejo de ubiquitinación. Una vez que esto ocurre,  $\beta$ -catenina es degradada por proteosoma. Mientras tanto en el núcleo, la unión de Groucho al factor TCF inhibe la transcripción de genes blanco de WNT. **Panel Derecho.** Cuando WNT se une al complejo de receptores Fzd/LRP la vía canónica se activa. En membrana también se encuentra el receptor LGR, al cual se unen los miembros de la familia de R-Spondinas, lo cual potencia el efecto de WNT. En la parte interna de la membrana Fzd interactúa con Dvl, e induce la fosforilación de LRP mediante CK1 y GSK3 lo que regula el acoplamiento de Axina, y su reclutamiento lejos del complejo de destrucción lo que permite la estabilización de  $\beta$ -catenina y su translocación al núcleo donde desplaza a groucho y promueve la transcripción de genes blanco (imagen modificada de Clevers H).

## La familia de las R-Spondinas

Existen moléculas agonistas que potencian la vía de señalización de WNT. En este sentido, se conoce a las R-Spondinas (RSPO) una familia de proteínas de secreción descrita recientemente. Miembros de esta familia desempeñan distintos papeles durante el desarrollo embrionario y en diferentes desórdenes patológicos tanto del desarrollo como en algunos padecimientos de la vida adulta, incluyendo cáncer y enfermedades fibrosantes (24,25).

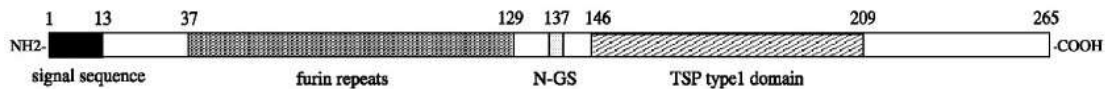
En mamíferos se han descrito cuatro miembros (RSPO1-4), todos los cuales potencian la vía de señalización WNT/ $\beta$ -catenina. El primer miembro de esta familia fue descrito en 2002 (R-Spondin3) y fue descubierto a partir de una librería de DNA fetal de cerebro. Esta molécula fue llamada hPWTSR y se describió como una proteína con una repetición de trombospondina tipo 1 (26). En 2004 Kamata y Katsube describieron a R-Spondin1; este grupo de investigación estaba enfocado al estudio del desarrollo embrionario del sistema nervioso central y encontraron un gen que se expresaba transitoriamente en el desarrollo de este sistema en un modelo murino, específicamente en la lámina plana del tubo neural, y la llamaron R-Spondin (*Roof plate-specific Spondin*) (**Figura 2**) (27). Los otros dos miembros de esta familia (R-Spondin2 y 4) fueron descubiertos en 2004 y 2006, respectivamente (28,29).

Existen muchos indicios de la relación funcional entre los miembros de RSPO y WNT. Por ejemplo, cuando se describió RSPO1 se reportó que la expresión del gen se redujo significativamente al ser evaluada en un modelo de doble KO de WNT1/3a. RSPO2, a la que enfocamos este estudio, fue descubierta en 2004 en un análisis de expresión de moduladores de la vía de WNT/ $\beta$ -catenina en *Xenopus*

y en este estudio revelaron que XRSP02 activaba la señalización de  $\beta$ -catenina y potenciaba la actividad de  $\beta$ -catenina mediada por WNT. Además se encontró que desempeñaba un papel esencial en el desarrollo embrionario de músculo (28).

### Estructura de las R-Spondinas

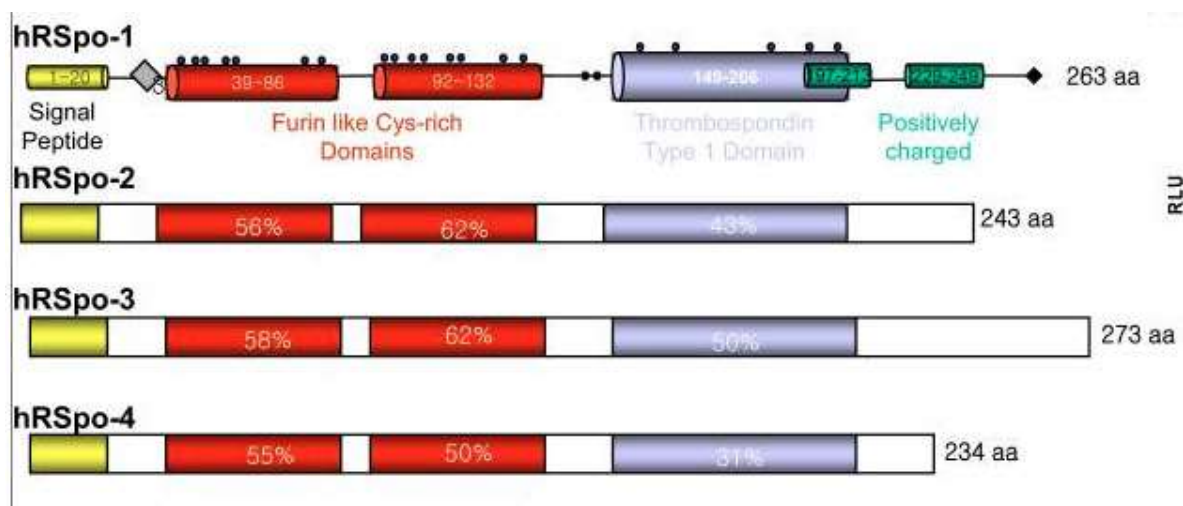
Los miembros de esta familia se caracterizan por tener una secuencia señal cerca del extremo aminoterminal, dos repeticiones tipo furina y un dominio de trombospondina (TSP). Este último dominio hace que esta familia pertenezca a la superfamilia de proteínas que contienen repetición trombospondina tipo 1. La región carboxilo-terminal presenta aminoácidos cargados positivamente y una señal de localización nuclear (27,30).



**Figura 2. Estructura primaria de R-Spondina1**

Los 4 miembros de esta familia comparten una organización genética de 5 exones y una similitud de aminoácidos de entre el 40% y 60%; además, comparten la organización de dominios en la estructura proteica (**Figura 3**) (29). Diversos estudios han demostrado la funcionalidad de los dominios en RSPO. En el dominio aminoterminal se ha descrito una secuencia señal para su salida de las células y sus actividades extracelulares. Pero adicionalmente, se ha encontrado en el dominio carboxiterminal una secuencia señal de entrada y localización nuclear. Un ensayo en células embrionarias de riñón humano (HeEK293 T) demostró la actividad extracelular de R-Spondina2 que potenciaba la respuesta de TCF

cuando se coexpresaba con WNT-1, FZD-8 y LRP, sugiriendo que las R-spondinas pueden mediar efectos de señalización desde la superficie celular. Por otro lado, la transfección de R-Spondina1 en células mesenquimatosas derivadas de riñón de mono verde (COS7) mostró su localización en núcleo. Estudios *in vitro* han demostrado que los dominios tipo furina son fundamentales para la activación de la vía de señalización de WNT. El dominio TSP se une a heparina y también es requerido para esta función dado que se ha demostrado que la pérdida de este dominio reduce significativamente la señalización de WNT (31,32).



**Figura 3. Arquitectura de los dominios proteicos y localización cromosómica de las R-Spondinas humanas.** Se representan 3 tipos de dominios: dos repeticiones tipo furina, un dominio trombospodina y un dominio rico en aminoácidos básicos (imagen tomada de Kim, 2008).

### **Papel fisiológico de las R-Spondinas durante el desarrollo embrionario.**

Es bien conocido que la vía de señalización de WNT es vital para el correcto desarrollo embrionario. En este contexto, estudios de patrones de dinámica de expresión de los miembros de RSPO en tejidos embrionarios junto con su

habilidad de potenciar la vía de WNT sugieren que los miembros de esta familia desempeñan un papel fundamental en desarrollo. De hecho, los 4 miembros de RSPO se expresan durante desarrollo embrionario, aunque cada uno de ellos tiene patrones únicos de expresión y de función (1,33,34). Específicamente, R-Spondina2 es necesaria para el desarrollo de extremidades, pulmones y folículos pilosos. En los inicios de su desarrollo embrionario, las 4 extremidades muestran producción de R-Spondina2 y 3, mientras que en los pulmones se expresa exclusivamente R-Spondina2. El papel de este miembro de la familia de RSPO se exploró en un modelo de ratón con R-spondin2 mutada (RSPO2tg) y en animales con inactivación dirigida para este gen (RSPO2<sup>-/-</sup>). Se observó que los ratones con R-Spondina2 mutada desarrollan malformaciones severas en el tracto respiratorio e hipoplasia pulmonar, mientras que los ratones deficientes de R-Spondin2 presentaron problemas en el desarrollo de extremidades, como la ausencia de garras y de osificación de los huesos de las. Asimismo, se confirmó su relación con la vía de WNT ya que al cruzar ratones RSPO2tg con ratones mutantes para LRP6 los efectos patológicos se exacerbaban. Aún más, cuando se cruzaron ratones RSPO2tg con ratones reporteros de WNT se observó una disminución en la actividad de WNT del epitelio de ramificación en las extremidades distales (33,35-37).

### **Participación de R-Spondina2 en enfermedades crónico-degenerativas.**

En etapas adultas se ha descrito que la desregulación de algunos miembros de la familia de RSPO puede estar relacionada con distintas enfermedades. Por ejemplo, evidencia experimental ha demostrado que la inducción exagerada de R-Spondina2 durante una infección con *Citrobacter rodentum*, bacteria causante de

diarrea en ratón, provoca en cepas susceptibles una respuesta proliferativa mediada por WNT que afecta a las células de cripta en colon, lo que resulta en la generación de epitelio inmaduro y poco diferenciado con deficiencias en componentes de transporte de iones (38,39). También se ha reportado que la fusión de genes de RSPO 2 y 3 está presente en cáncer colorectal en poblaciones tanto norteamericana como japonesa. En este caso, la reducción de RSPO2 correlaciona con la diferenciación, tamaño tumoral y metástasis, mientras que su sobreexpresión suprime la proliferación y tumorigenicidad de esta neoplasia. La disminución de RSPO2 parece ser provocada por mecanismos epigenéticos, dado que se ha relacionado con la hipermetilación de su promotor (40).

Por otro lado, en un reporte reciente se encontró que RSPO2 está implicado en la proliferación de queratinocitos, así como en la patogénesis de las cicatrices queloides que representan procesos fibróticos aberrantes. En este estudio se observó un incremento en la expresión y secreción de RSPO2 en cultivos de fibroblastos y queratinocitos derivados de lesiones queloides, así como un efecto sinérgico de RSPO2 con WNT3 a través de WNT/ $\beta$ -catenina provocando un aumento en la proliferación de queratinocitos (41). Otra enfermedad fibrosante en la que se ha reportado alteraciones en R-Spondin2 es la enfermedad de Dupuytren's que es una fibromatosis en manos y dedos que provoca la contractura progresiva de las manos. En un estudio realizado en 960 personas con enfermedad de Dupuytren's con el objetivo de encontrar marcadores para esta enfermedad se encontraron 11 polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) como factores de riesgo. Seis de estos polimorfismos se encontraron en genes involucrados en la ruta de señalización WNT/ $\beta$ -catenina, incluyendo WNT4,

RSPO2, y WNT7b (42). Sin embargo, hasta donde sabemos, no hay estudios que aborden esta molécula en enfermedades pulmonares adultas.

En el contexto de estos hallazgos, planteamos la hipótesis de que RSPO2 podría contribuir a la respuesta fibrótica en FPI. Para probar esto, decidimos examinar la expresión de RSPO2 y su receptor LGR6 en pulmones y fibroblastos de FPI, y evaluar el efecto de RSPO2 en fibroblastos de pulmones humanos normales y de FPI. Inesperadamente, encontramos que RSPO2 induce un fenotipo antifibrótico en fibroblastos, inhibiendo la proliferación, induciendo la apoptosis y disminuyendo la expresión de las moléculas de la matriz extracelular.

## **Objetivo General**

Evaluar la expresión de RSPO2 y su receptor en tejidos y fibroblastos provenientes de pacientes con FPI y describir los efectos de esta proteína sobre fibroblastos *in vitro*.

## **Objetivos Particulares:**

Analizar la expresión y localización de RSPO2 y su receptor en tejidos obtenidos de pacientes con FPI y controles.

Cuantificar la expresión de RSPO2 a nivel de gen y proteína en fibroblastos obtenidos de pulmón de pacientes con FPI y controles.

Analizar el efecto de RSPO2 sobre fibroblastos pulmonares normales y derivados de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática en:

Expresión génica global, proliferación, apoptosis, expresión de colágena y metaloproteinasa de matriz 1 (MMP-1)

Examinar el efecto de la inhibición de RSPO2 en fibroblastos pulmonares normales y provenientes de pacientes con FPI

Evaluar el efecto de RSPO2 en el proceso de transición epitelio-mesénquima en células epiteliales pulmonares estimuladas con RSPO2



## **Material y métodos**

### ***Obtención de tejidos y células***

Fragmentos de tejidos de biopsia que se realizan para propósitos de diagnóstico y fibroblastos extraídos de los mismos, se obtienen en el INER con la aprobación del comité de ciencia y bioética, además del consentimiento firmado por los pacientes.

### ***PCR tiempo real***

Para este análisis se extrajo el RNA total de 4 tejidos de FPI y de 4 tejidos de otras enfermedades fibrosantes pulmonares (no-FPI) mediante el uso del reactivo TRIzol™ (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY). El RNA de pulmones control se obtuvo de dos RNAs de pulmones humanos normales comerciales (Ambion AM7968, Agilent 540019). Asimismo, se obtuvo el RNA de 5 cultivos primarios de fibroblastos derivados de FPI y tres de cultivos primarios de fibroblastos pulmonares humanos normales. El RNA se trató con transcriptasa reversa para obtener cDNA y el PCR en tiempo real se realizó utilizando el Sistema Step One Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se utilizaron sondas TaqMan etiquetadas con FAM para RSPO2 (Hs00379983\_m1), Stratifina (SFN Hs00968567\_s1), Colágena 1 $\alpha$ 1 (Hs00164004\_m1) y el receptor LGR6 (Hs00663887\_m1). Como controles endógenos se utilizaron RNA ribosomal 18S (4352930E) y POLR2A (Hs00172187\_m1). La PCR se realizó en una reacción de 15- $\mu$ l de volumen que contenían 2  $\mu$ l de cDNA y 13  $\mu$ l de Master Mix (Applied Biosystems); las condiciones para la PCR fueron 2 minutos a 95°C seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y un minuto a 60°C. Todas las

PCRs se realizaron por triplicado, y los resultados se expresaron como  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  normalizados con 18s o PolR2A (43).

### **Inmunohistoquímica**

La localización de RSPO2 y LGR6 se examinó en 4 pulmones de FPI y 3 pulmones normales. El análisis inmunohistoquímico se realizó como se ha descrito previamente (44). Brevemente, secciones de pulmón se incubaron a 4°C toda la noche con uno de los siguientes anticuerpos primarios monoclonales: anti-RSPO2 [Abcam/ab73761 (1:100)], anti-LGR6 [Abcam/ab126747 (1:50)]. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario biotinilado seguido de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (BioGenex, San Ramon, CA). Como sustrato se utilizó 3-Amino-9-etilcarbazol en buffer de acetato que contenía 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para los controles negativos, el anticuerpo primario se reemplazó con suero no inmune.

### **Secuenciación de RNA de siguiente generación (RNA-seq)**

Los efectos de RSPO2 en la expresión génica global se examinaron en dos líneas celulares de fibroblastos primarios de pulmones de FPI y dos de pulmones normales humanos pareados por edad. Los fibroblastos se estimularon con 10 ng/mL de RSPO2 recombinante humana (rhRSPO2) en medio Ham F-12 sin suero durante 24 horas y luego se extrajo el RNA total usando el reactivo TRIzol™. La concentración y calidad del RNA se determinó mediante una combinación de espectrofotometría (ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies USA) y electroforesis

capilar automatizada usando Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA). Los valores de RIN obtenidos fueron superiores a 8.0 en todos los casos. La secuenciación masiva de RNA se realizó en NextSeq500 (Illumina). Brevemente, se eliminó el RNA ribosómico y las bibliotecas se crearon por rtPCR con kits comerciales (TruSeq Total RNA Ribo-Zero) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos fueron normalizados y procesados utilizando el protocolo descrito por Trapnell et al (45), con herramientas de código abierto TopHat2, Cufflinks y Cuffdiff2 (45-47) para reconstruir el transcriptoma en cada condición y obtener los genes con expresión diferencial significativa (veces de cambio  $>1.5$  y  $p < 0.05$ ). Estos genes se clasificaron y analizaron con Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity® Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)), GATHER genoma (<http://gather.genome.duke.edu/>) y con Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (48,49). Estos análisis tienen como objetivo identificar no solo genes codificantes sino también no-codificantes, reguladores, funciones y vías de acuerdo con los cambios producidos por RSPO2.

### **Arreglo de WNT**

Se estimularon fibroblastos normales de pulmón humano y de FPI con rhRSPO2 (10 ng/ml) en medio Ham F-12 sin suero durante 24 horas y se extrajo el RNA total usando el reactivo TRIzol™. La expresión de los genes relacionados con WNT se midió usando el arreglo de sondas TaqMan de la vía de señalización de WNT (TaqMan Array Human WNT Pathway 4414100; Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se usaron placas de 96 pozos que contenían 92 sondas para

señalización de WNT y cuatro sondas para controles endógenos. La reacción se llevó a un volumen final de 20  $\mu$ l, las condiciones de ciclaje fueron 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Los datos se analizaron con el software Data Assists V3.01 (Applied Biosystems).

### **Western blot**

Se estimularon fibroblastos de pulmón con FPI y normales con rhRSPO2 (10 ng / ml) en medio Ham F-12 libre de suero durante 24 horas y se lisaron con reactivo RIPA (Tris • HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, Nonidet 1% P-40, 0,1% de SDS, 1% de Triton X-100, 1 mM de NaF, 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM de fenilmetilsulfonfluoruro, 1  $\mu$ g / ml de leupeptina, 1  $\mu$ g / ml de aprotinina). En paralelo, se obtuvieron los medios condicionados de los fibroblastos, se concentraron por liofilización y se reconstituyeron en agua. La concentración de proteína se cuantificó usando el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hercules CA). Se mezclaron alícuotas que contenían 20  $\mu$ g de proteína de extractos totales y 12  $\mu$ g de medio con buffer Laemmli y se separaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10% como se ha reportado previamente (50). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa bloqueadas con leche descremada al 5% durante 1 hora y se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpo monoclonal de ratón anti-14-3-3sigma (Stratifina, 1:1000, ab14123; abcam Inc. Cambridge, MA EE. UU.), anti-pro-caspasa-3, 1:500 (BioLegend 622701, San Diego CA) y Anti-WNT16 1:1000 (ab109437; abcam Inc. Cambridge, MA, EE. UU.) para extractos celulares totales y anti-MMP-1 policlonal de conejo (2  $\mu$ g / ml; Abcam ab38929)

para medios condicionados. Los anticuerpos se detectaron usando IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano o anticuerpos IgG anti-conejo (Invitrogen Life Technologies) durante 1 hora a temperatura ambiente y se visualizaron mediante el sistema ChemiDoc XRS + (Bio-Rad) con sustrato de alta sensibilidad Super Signal West Femto Maximum (Thermo Scientific Rockford, IL EE. UU.). La detección de  $\beta$ -tubulina (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) se utilizó como control de carga para 14-3-3sigma y la de  $\beta$ -actina (1: 500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) para procaspasa-3 y WNT16 en extractos celulares totales. El análisis de densitometría se realizó con el programa Image Lab (Bio-Rad).

### **Ensayo de tasa de crecimiento**

Se sembraron fibroblastos de pulmón humano normales y derivados de FPI en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad celular de  $10 \times 10^3$  y se incubaron en medio Ham F-12 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% en condiciones estándar. Después de 24 h, el medio se reemplazó por medio Ham F-12 suplementado con SFB al 2% solo o con rhRSPO2 (10 ng / ml) y las células se mantuvieron en cultivo durante 24 o 48 h. El crecimiento celular se determinó usando el reactivo de proliferación celular WST-1 (Boehringer, Mannheim, Alemania) como se describe (51). En experimentos paralelos, los fibroblastos se pretrataron con el inhibidor de WNT IWP-2 (Selleckchem, Alemania) durante 24 h, y se estimularon con RSPO2 (10 o 100 ng / ml) durante 24 o 48 h. IWP-2 es un inhibidor general de la vía de WNT que inactiva Porcn, una O-aciltransferasa unida a la membrana, e inhibe selectivamente la palmitoilación de WNT. IWP-2 bloquea

la fosforilación dependiente de WNT del receptor Lrp6 y Dvl2, y la acumulación de  $\beta$ -catenina.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **Ensayo de proliferación celular**

Fibroblastos pulmonares se cultivaron y sembraron en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad de  $10 \times 10^3$  y se incubaron en medio Ham's F-12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) en condiciones de crecimiento estándar. Después de 24 horas, el medio se substituyó por Ham's F-12 suplementado con 2% de SFB solo o con rhRSPO2 (10ng/ml), y las células se mantuvieron en cultivo por 24 o 48 horas. La proliferación celular se midió utilizando el ensayo de proliferación CyQUANT (Thermo Scientific Rockford, IL USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, al terminar el tiempo de estímulo, el medio se removió invirtiendo gentilmente la placa y se lavó con PBS; posteriormente, las células se congelaron a  $-70$  °C y se guardaron hasta su uso. En el día de la lectura, la placa se descongeló a temperatura ambiente y se agregaron 200  $\mu$ l del buffer de lisis CyQUANT (1:400, CyQUANT® Cell Proliferation assay Kit, INVITROGEN, Molecular Probes, Inc. OR, USA) a cada pozo mezclando gentilmente. Las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz y la fluorescencia emitida se midió en un lector de microplacas (Synergy HT, BioTek Instruments, Inc. VT, USA) con 480 nanómetros (nm) de excitación y 520 nm de emisión.

### **Ensayo de apoptosis**

Para evaluar el efecto de RSPO2 en apoptosis, los fibroblastos se cultivaron en placas de 6 pozos a una concentración de  $3 \times 10^5$  en condiciones estándar con medio Ham's F-12 suplementado con 10% SFB; 24 horas después se sustituyó el medio por Ham's F-12 sin SFB y los fibroblastos se estimularon con rhRSPO2 (10 ng/ml) por 24 horas. La apoptosis se examinó con el ensayo de unión a Anexina V-Ioduro de Propidio (IP), seguido por un análisis en citometría de flujo (Annexin V-PE Apoptosis detection kit; BD Pharmingen, San Diego, CA) como se ha reportado previamente (50). Las células se adquirieron en un citómetro FACSAria (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Se determinó el porcentaje de células Anexina-positivas/IP-negativas en la población celular total. Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo 7.8 (Stanford University, Stanford, CA). Células epiteliales A549 (ATCC) se sembraron en placas de 12 pozos (Corning, inc. NY) con medio de cultivo F-12 con 2% de SFB, las células se estimularon con 100 ng/mL de RSPO2, 100 ng/ml de WNT3a y una combinación de RSPO2 y WNT3a (100ng/ml C/U). Además se indujo apoptosis incubando las células con TNFalfa (20 ng/ml) e IFN gama (50 ng/ml) por 72 hrs. (H). La apoptosis se evaluó mediante un ensayo de unión a Anexina V-Ioduro de Propidio (IP), como se describió seguido por un análisis en citometría de flujo (Annexin V-PE Apoptosis detection kit; BD Pharmingen, San Diego, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células se adquirieron en un citómetro FACSAria (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

### **Detección de Colágena**

La colágena soluble se cuantificó en medios condicionados de fibroblastos utilizando el ensayo de colágena Sircol (Biocolor Ltd. County Antrim, UK) (50).

Para estos experimentos, fibroblastos normales y de FPI se cultivaron con o sin rhRSPO2 (10 ng/ml) y después de 24 horas se colectó el medio condicionado (MC), se concentró mediante liofilización y se reconstituyó en agua destilada. Posteriormente, se agregó 1 ml de rojo de Sirio a 100  $\mu$ l de MC y se mezcló 30 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugo a 12,000 $\times$ g por 10 minutos y el colorante unido a la colágena se disolvió con 250  $\mu$ l de reactivo Alkali y se transfirieron 200  $\mu$ l a pozos individuales de una placa de 96 para medir la absorbancia a 555 nm en un lector de placas (Synergy HT, BioTek Instruments, Inc. VT, USA). Los resultados se expresaron como porcentaje de colágena por  $\mu$ g de proteína.

### **Transfección celular**

Fibroblastos pulmonares humanos se transfectaron con 2  $\mu$ g de plásmido shRNA (Sc-108060, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) que contiene RNA de horquilla corta (shRNA por sus siglas en ingles “Short hairpin”) que codifica para secuencias aleatorias de RNA como control negativo o 2  $\mu$ g de plásmido shRNA R-Spondina 2 (sc-76307-SH, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) utilizando el kit Amaxa Basic Nucleofector para fibroblastos primarios mamíferos (Lonza, Cologne, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, en una placa de 6 pozos se agregaron 1.5 ml de medio Ham’s F-12 10 %SFB y se colocaron en incubadora humidificada a 37 °C/5% CO<sub>2</sub> para equilibrar/preincubar; posteriormente se colectaron los fibroblastos con tripsina y se determinó su densidad celular. Se centrifugaron 400,000 células por muestra a 90xg durante 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente el botón



celular se resuspendió cuidadosamente en 100  $\mu$ l de solución de Nucleofector a temperatura ambiente, y se combinó con el plásmido de shRNA de secuencias aleatorias y el plásmido shRNA R-Spondina 2, respectivamente. Después se transfirieron las células/DNA en una cubeta certificada que se colocó en el nucleofector y a la cual se le aplicó el programa U-023; al terminar el programa se agregaron 500  $\mu$ l del medio de cultivo preequilibrado y la muestra se transfirió cuidadosamente a la placa de 6 pozos. Después de la nucleofección, las células se incubaron bajo condiciones estándar por 48 horas, y al terminar este periodo de tiempo se comenzó con la selección con puromicina para lo cual el medio se aspiró y se reemplazó con medio fresco que contenía puromicina (2  $\mu$ g/ml); este medio fue reemplazado con medio selectivo preparado en fresco durante 5 días.

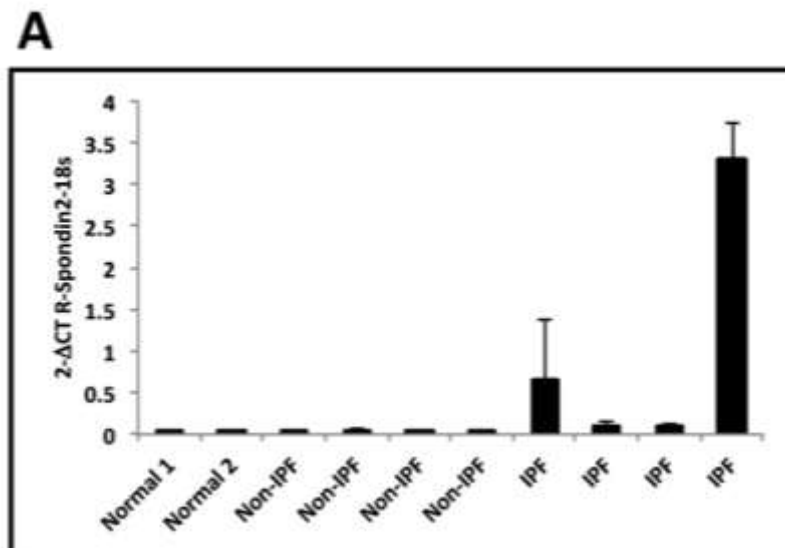
### **Análisis estadístico**

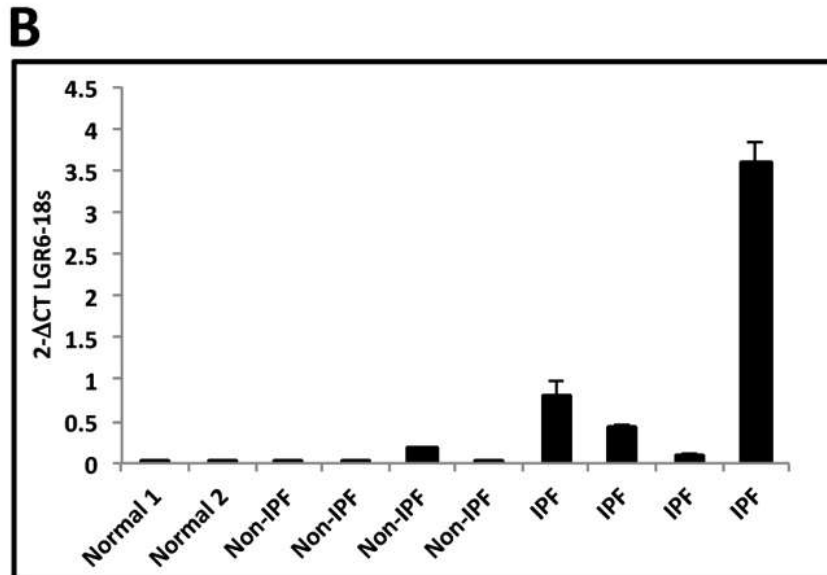
Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. Los valores de probabilidad  $<0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

### R-Spondina 2 y su receptor LGR6 se encuentran sobreexpresados en pulmones de FPI y se localizan en fibroblastos y células epiteliales

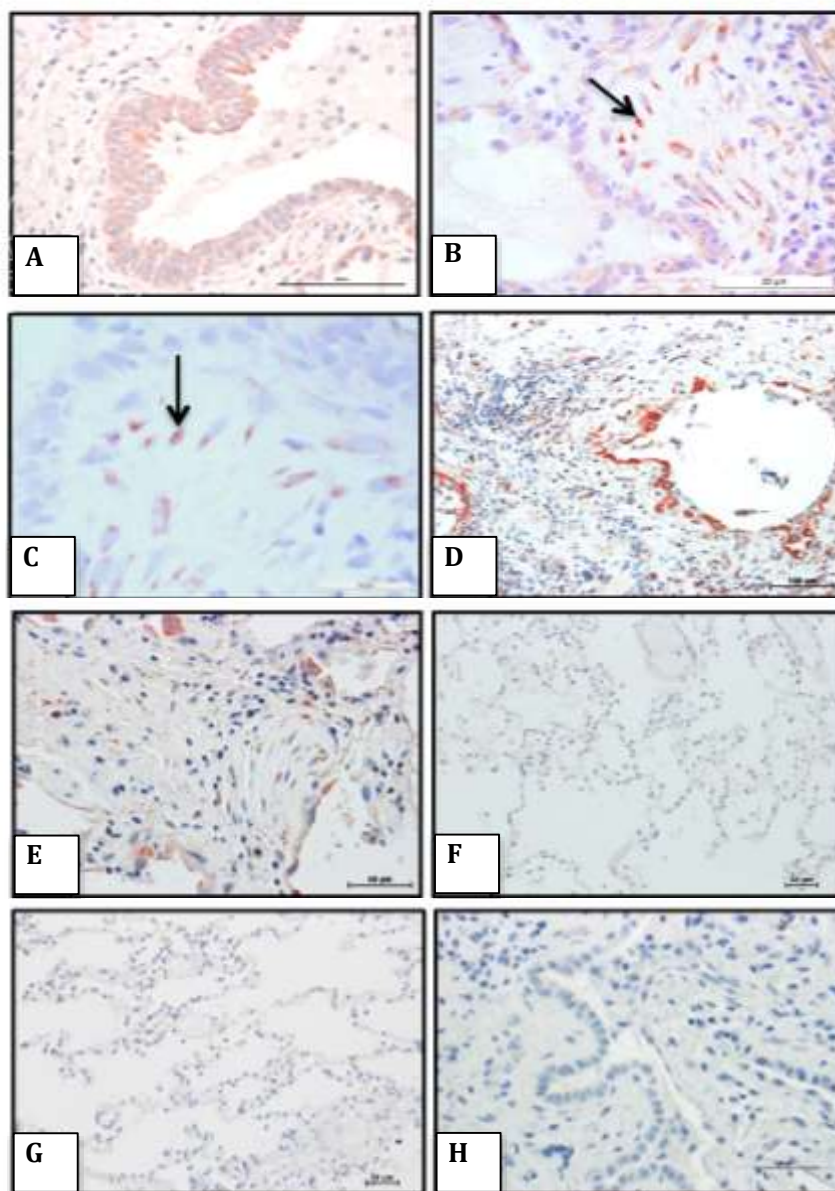
Lo primero que investigamos fue si existían diferencias en la expresión de R-Spondina 2 y su receptor LGR6 entre pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y controles. Para esto, ambos genes fueron cuantificados por PCR en tiempo real en tejidos de FPI (n=4) y no-FPI (n=4; dos con neumonitis crónica por hipersensibilidad y dos con fibrosis pulmonar asociada a enfermedades autoinmunes). Estos pulmones se utilizaron porque ambos padecimientos representan formas graves de fibrosis, pero asociadas a procesos inflamatorios crónicos y por lo tanto patogénicamente diferentes a FPI. Además se usaron como controles RNA de dos pulmones normales. Como se muestra en la **Figura 4A y 4B** ambos genes se encuentran altamente expresados en pulmones de FPI mientras que en pulmones normales o tejidos de enfermedades intersticiales pulmonares no-FPI prácticamente no se observó señal.





**Figura 4. Niveles de expresión de R-Spondina 2 y LGR6 en pulmones de FPI y controles.** La expresión génica de RSPO2 (panel A) y su receptor LGR6 (panel B) se cuantificó mediante PCR en tiempo real en RNA total de pulmones normales, enfermos con enfermedades fibrosantes diferentes a FPI, y con FPI. Los datos (promedio  $\pm$  D.E.) están expresados utilizando  $2^{-\Delta Ct}$  normalizados con 18s

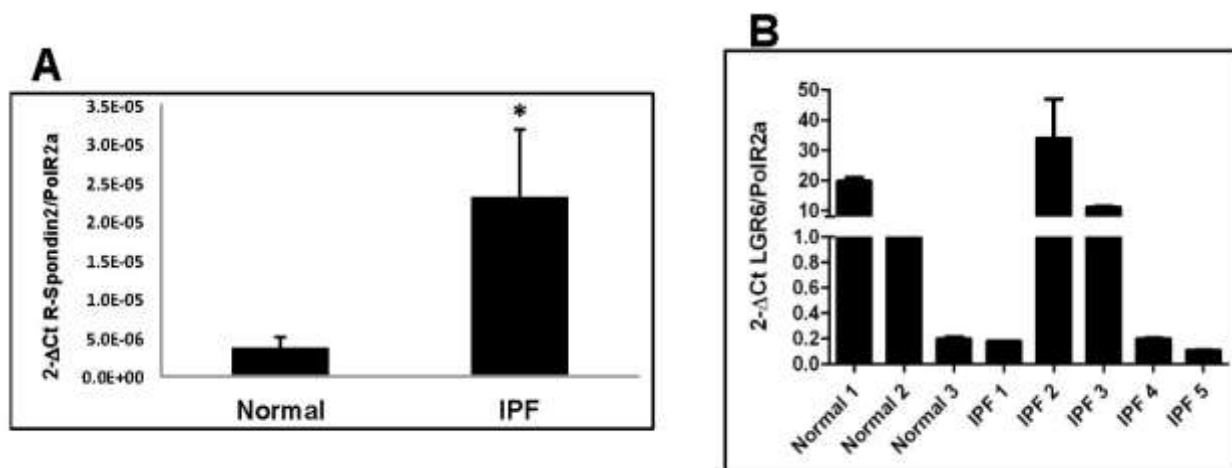
A continuación examinamos la localización celular de RSPO2 y LGR6 mediante tinción inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos para ambas proteínas. Como se ilustra en la **Figura 5**, tanto el ligando como el receptor se encontraron principalmente en focos de fibroblastos y células del epitelio bronquial y alveolar en pulmones de FPI. En cambio, ni RSPO2 o LGR6 fueron observadas en tejido pulmonar normal, lo que corrobora los datos encontrados de expresión.



**Figura 5. Localización celular de RSPO2 y LGR6 en tejido pulmonar.** Se muestran imágenes representativas de inmunolocalización de RSPO2 y LGR6 en pulmones normales y de FPI. Se observa una fuerte tinción de RSPO2 (paneles A, B y C) y LGR (paneles D y E) en células epiteliales y fibroblastos (flechas negras) en tejidos de FPI. No se observó tinción en pulmones normales para RSPO2 así como tampoco para LGR6 (paneles F, G). Suero no inmune se utilizó como control negativo (H). Esta figura ejemplifica los resultados obtenidos con 4 tejidos de FPI y 3 tejidos normales.

## La expresión del gen de RSPO2 se encuentra incrementada en fibroblastos de FPI

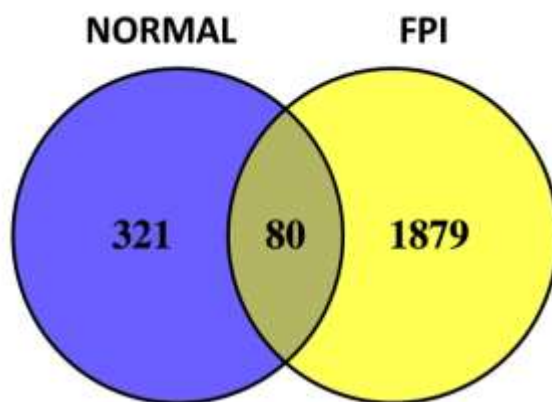
Los fibroblastos/miofibroblastos que se encuentran en los focos de fibroblastos tienen un papel crucial en el remodelamiento pulmonar anormal que se observa en FPI. Como nuestro análisis inmunohistoquímico demostró que RSPO2 es expresada por esas células *in vivo*, a continuación decidimos examinar su expresión *in vitro*. La expresión génica de RSPO2 se cuantificó mediante qPCR en fibroblastos derivados de FPI (n=5) y pulmones humanos normales (n=3). Como se ilustra en la **Figura 6A** RSPO2 se encuentra incrementada significativamente en fibroblastos de FPI cuando los comparamos con pulmones control ( $p < 0.05$ ). En contraste, la expresión del receptor LGR6 es heterogénea y no se encontraron diferencias significativas (**Figura 6B**).



**Figura 6. Niveles de expresión génica de RSPO2 y LGR6 en fibroblastos de FPI y de pulmones normales.** (A) La expresión génica de RSPO2 se cuantificó mediante PCR en tiempo real en RNA total de fibroblastos pulmonares de FPI (n=5) y normales (n=3). Los datos (promedio  $\pm$  D.E.) están expresados utilizando  $2^{-\Delta Ct}$  normalizados con PolR2a \* $p < 0.05$ . (B) No se observaron diferencias en la expresión del receptor LGR6.

## **R-Spondina 2 modifica el perfil de expresión general en fibroblastos pulmonares humanos normales y de FPI**

Para obtener una mejor visión acerca del posible papel de RSPO2 en esta enfermedad, fibroblastos pulmonares derivados de FPI y de pulmones normales, seleccionados por su alta expresión de LGR6, fueron estimulados con rhRSPO2 (10 ng/ml) durante 24 hrs y realizamos un análisis de perfil de expresión basado en secuencias de RNA mediante un protocolo extensamente utilizado (45). Manejando niveles de expresión  $\geq 1.5$  veces de cambio como un corte arbitrario, encontramos que rhRSPO2 modifica la expresión de al menos 1960 genes en fibroblastos de FPI (1540 sobrerregulados) y 400 en fibroblastos normales (214 sobrerregulados), observando también que la respuesta transcripcional fue esencialmente distinta (**Figura 7**).



**Figura 7. Diagrama de Venn.** Se muestra el número de genes diferencialmente expresados por la estimulación con rhRSPO2 en fibroblastos normales y de FPI.

Con el fin de determinar las vías de señalización enriquecidas, los genes

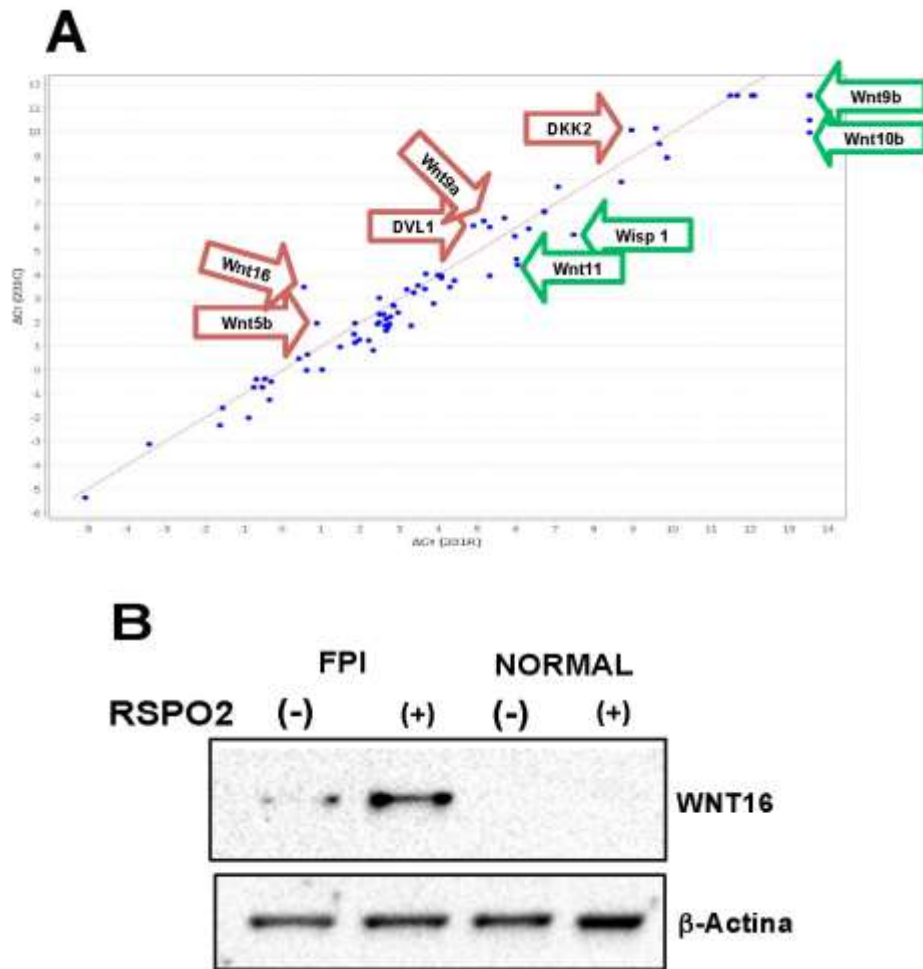
diferencialmente expresados (GDE) obtenidos de la secuenciación de RNA fueron utilizados como entrada para dos herramientas de análisis diferentes: IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) y GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*). A través de estos análisis encontramos que solamente en fibroblastos de FPI, el estímulo con rhRSPO2 modifica la expresión de genes involucrados en la señalización de WNT, principalmente de la vía no canónica, mientras que tanto en fibroblastos normales como de FPI, modifica la expresión de genes relacionados con el ciclo celular y apoptosis, entre otros (**Tabla 1**).

	Normal lung fibroblasts	IPF fibroblasts
<b>WNT</b>		WNT5B (1.6), WNT9A (1.6), WNT16 (2.15), DKK1 (1.81), FZD5 (1.68), FZD8 (2.22), WISP2 (2.03)
<b>Cell Cycle</b>	CDCA3 (1.6), CDC20(18.5), SPDYA (-24), CDCA7 (-2.36)	CDC20 (2.66), CDC25A (1.85), CDC25C (2.4), CDC34 (1.66), CDC37 (1.50), CDC45 (3.35), CDC6 (2.24), CDCA3 (1.78), CDCA4 (1.82), CDCA5 (2.39), CDCA7 (4.04), CDCA8 (2.18), SFN (64.5)
<b>Apoptosis</b>	APITD1-CORT (2.83), BCL2 (-2.17), BAG5 (-1.83)	SFN (64.5), AEN (1.52), AIFM2 (1.72), CASP5 (24.7), NAIF1 (1.56), SIVA1 (1.65), THAP3 (1.75)

**Tabla 1. R-Spondina 2 modifica la expresión de genes que pertenecen a la vía de señalización de WNT en fibroblastos derivados de FPI.** Entre paréntesis se muestran las veces de cambio comparadas con el control.

Es bien conocido que la unión entre los miembros de la familia R-Spondinas y la familia de receptores LGR facilita la activación de la ruta de WNT por la estabilización de sus coreceptores. Sin embargo, no se ha reportado que RSPO2 incremente la expresión de ligandos de WNT como encontramos con la secuenciación del RNA. Por lo tanto, para corroborar estos cambios cuantificamos la expresión génica de miembros y modificadores de esta ruta de señalización, incluyendo moléculas de las familias de *frizzled*, *disheveled* y antagonistas como elementos de la familia de *frizzled* secretados y de la familia de inhibidores de la vía de señalización WNT como *dickkopf* (DKK) mediante un “Arreglo de la vía WNT con sondas TaqMan®” utilizando el Software DataAssist v3.01 (Applied Biosystems). Nuestros resultados confirmaron que rhRSPO2 modifica la expresión de varios genes de la ruta de WNT en fibroblastos de FPI, principalmente aquellos involucrados en vías no canónicas incluyendo la sobre-expresión de WNT5B, WNT9A y WNT16 (**Figura 8A**). Además, la proteína de polaridad de segmento *Dishevelled* (DVL1) y DKK2 también se encontraron sobreexpresadas, mientras que WNT11 y WISP1 (*WNT-1 inducible signalling pathway protein 1*) están disminuidas. Asimismo, al igual que lo observado con RNAseq, rhRSPO2 no tuvo ningún efecto sobre los miembros de la vía de WNT en fibroblastos humanos normales. Para corroborar estos datos a nivel proteico, evaluamos la expresión de WNT16 por Western blot, y como se muestra en la **Figura 8B**, la estimulación de fibroblastos de FPI con rhRSPO2 incrementó la concentración de proteína. En contraste, y concordando con los datos previos de RNA-seq, no encontramos WNT16 en fibroblastos humanos normales.





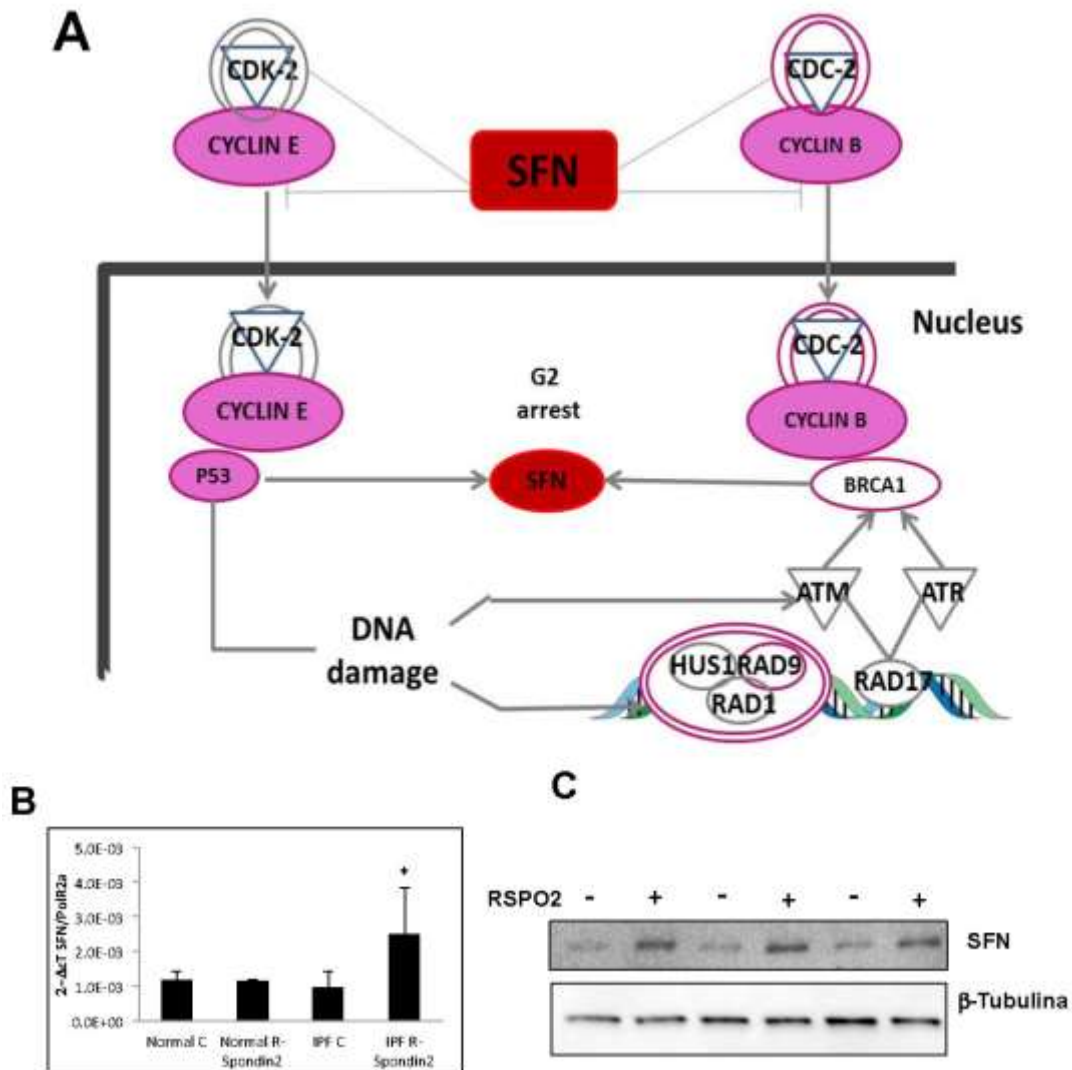
**Figura 8. rhRSPO2 modifica la expresión de genes de la vía de WTN.** (A) Fibroblastos de FPI fueron estimulados con rhRSPO2 y se midió la expresión de 92 genes de la vía de WNT mediante *TaqMan Array Human WNT Pathway*. Las flechas rojas señalan algunos genes sobregulados y las flechas verdes algunos sub-regulados. (B) Western Blot que confirma el incremento de la proteína WNT16 en fibroblastos de FPI.

### **R-Spondina 2 modifica la expresión de genes involucrados en ciclo celular**

Los resultados obtenidos mediante RNAseq mostraron que una gran cantidad de genes relacionados con el ciclo celular fueron desregulados por RSPO2, sugiriendo que puede modular la proliferación y muerte celular. Como se ilustra en la **Tabla 1** y en la **Figura 9A**, uno de los genes más altamente sobreexpresados

fue estratífina (SFN o proteína 14-3-3 sigma), que es un fuerte regulador negativo de la progresión del ciclo celular (52, 53). Este hallazgo se validó mediante qPCR, la cual demostró que RSPO2 incrementa la expresión de SFN en fibroblastos de FPI pero no en fibroblastos normales (**Figura 9B**). El incremento de ésta proteína fue corroborada posteriormente mediante Western Blot (**Figura 9C**).

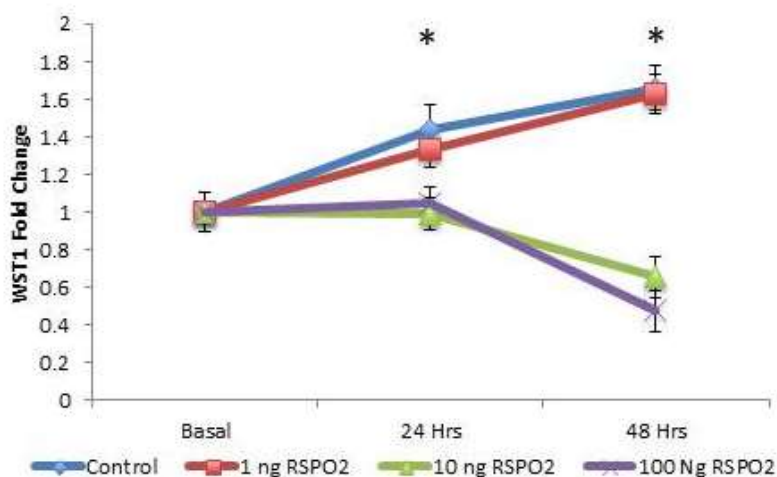
Igualmente, uno de los genes que se encontraron más disminuidos en fibroblastos normales de pulmón con el estímulo de RSPO2 fue el miembro A de la familia reguladora de ciclo celular Speedy/RINGO (SPDYA, **Tabla 1**). Se ha reportado previamente que la inhibición de este gen reduce la proliferación celular e induce apoptosis. (54, 55).



**Figura 9. R-Spondina 2 modifica la expresión de Stratifina (SFN) en fibroblastos pulmonares de FPI.** (A) Imagen obtenida del análisis de IPA con datos de RNAseq que muestra una fuerte sobrerregulación de SFN. SFN activa la vía de arresto de ciclo celular en G2 (B) Expresión génica de SFN cuantificada mediante qPCR corroborando el efecto de rhRSP02 observado en los datos de secuenciación. Se muestra el promedio  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes. Los datos están expresados mediante  $2\Delta Ct$  normalizados con PolR2a;  $*p < 0.05$ . (C) R-Spondin2 incrementa la concentración de estratifina. La proteína se analizó mediante Western Blot en 3 cultivos primarios de fibroblastos de FPI utilizando  $\beta$ -tubulina como control de carga.

## R-Spondina 2 disminuye la proliferación de fibroblastos

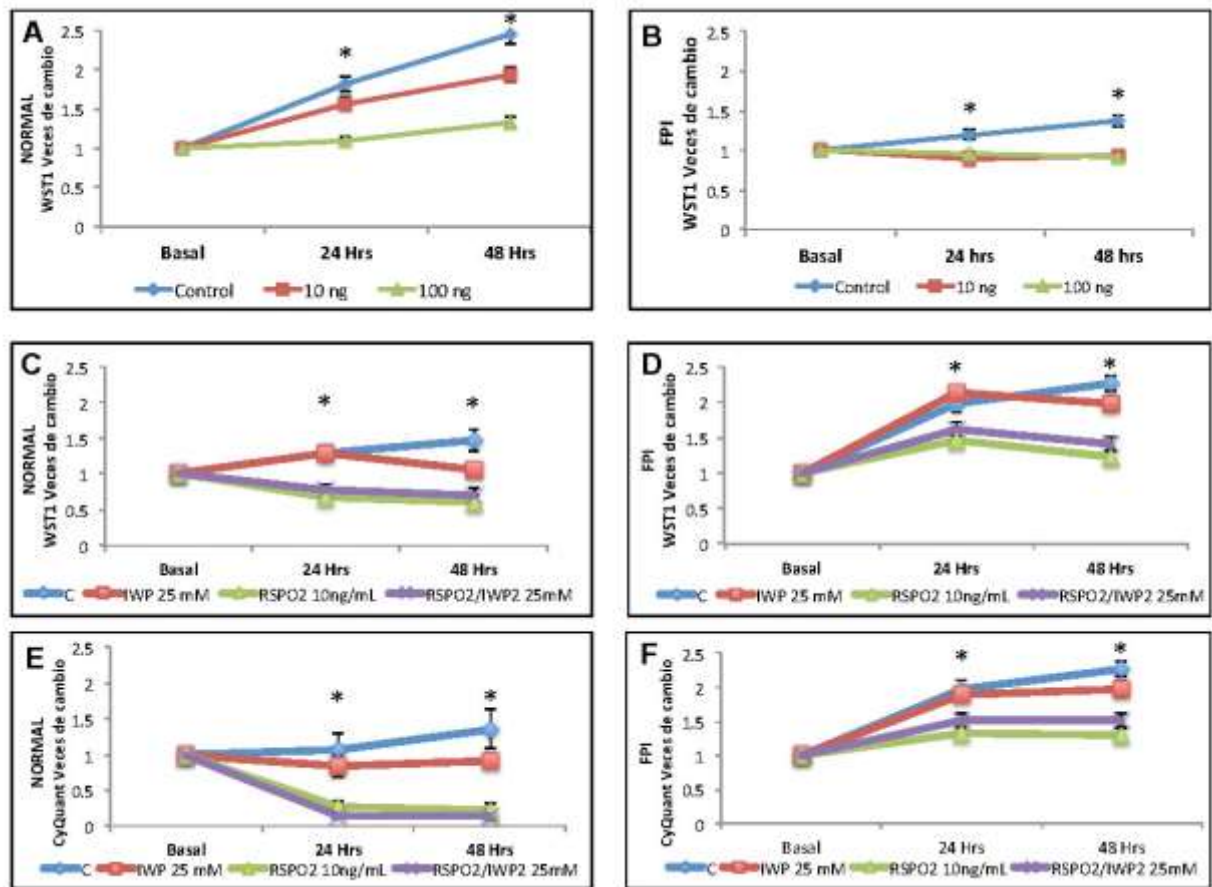
Los genes relacionados con el ciclo celular que encontramos ya sea sobre o subexpresados indican que RSPO2 posee actividad antiproliferativa en fibroblastos normales y de FPI. En este contexto, nos decidimos a determinar si RSPO2 tiene un efecto inhibitorio en la proliferación de fibroblastos *in vitro*. Lo primero que se hizo fue examinar el efecto de diferentes concentraciones de rhRSPO2 (1, 10 y 100 ng/ml, **Figura 10**), y encontramos que la mejor respuesta se obtiene con las últimas dos dosis.



**Figura 10.** Curva dosis-respuesta utilizando tres concentraciones de rhRSPO2 1, 10 y 100 ng/ml. La tasa de crecimiento se evaluó mediante el reactivo WST-1. \* $p < 0.01$

Por lo tanto, estimulamos fibroblastos normales y derivados de pacientes con FPI con rhRSPO2 con 10 y 100 ng/ml y examinamos la proliferación celular con el ensayo WST-1. Encontramos que la estimulación con rhRSPO2 en fibroblastos normales ( $n=3$ ) y de FPI ( $n=3$ ) reduce de manera significativa el crecimiento celular a 24 y 48 hrs (**Figuras 11A y 11B**). Para probar si este efecto era

dependiente o no de WNT, en experimentos paralelos los fibroblastos fueron tratados primero con IWP-2 el cual inhibe la activación de la vía de señalización WNT/ $\beta$ -catenina. Como se muestra en las **Figuras 11C y 11D**, IWP-2 disminuye de manera marginal el crecimiento celular a las 48 hrs, pero no afecta el efecto inhibitorio de RSPO2. Para corroborar si la estimulación con RSPO2 tiene efectos antiproliferativos, determinamos el rango de proliferación en fibroblastos normales y de FPI mediante CyQuant utilizando 10 ng/ml de rhRSPO2. Con este experimento también observamos una fuerte reducción en la proliferación de fibroblastos, tanto normales como de FPI, la cual no se modificó con el pretratamiento con del inhibidor de WNT (**Figuras 11E y 11F**).



**Figura 11. R-Spondin 2 reduce la tasa de crecimiento de fibroblastos.** En

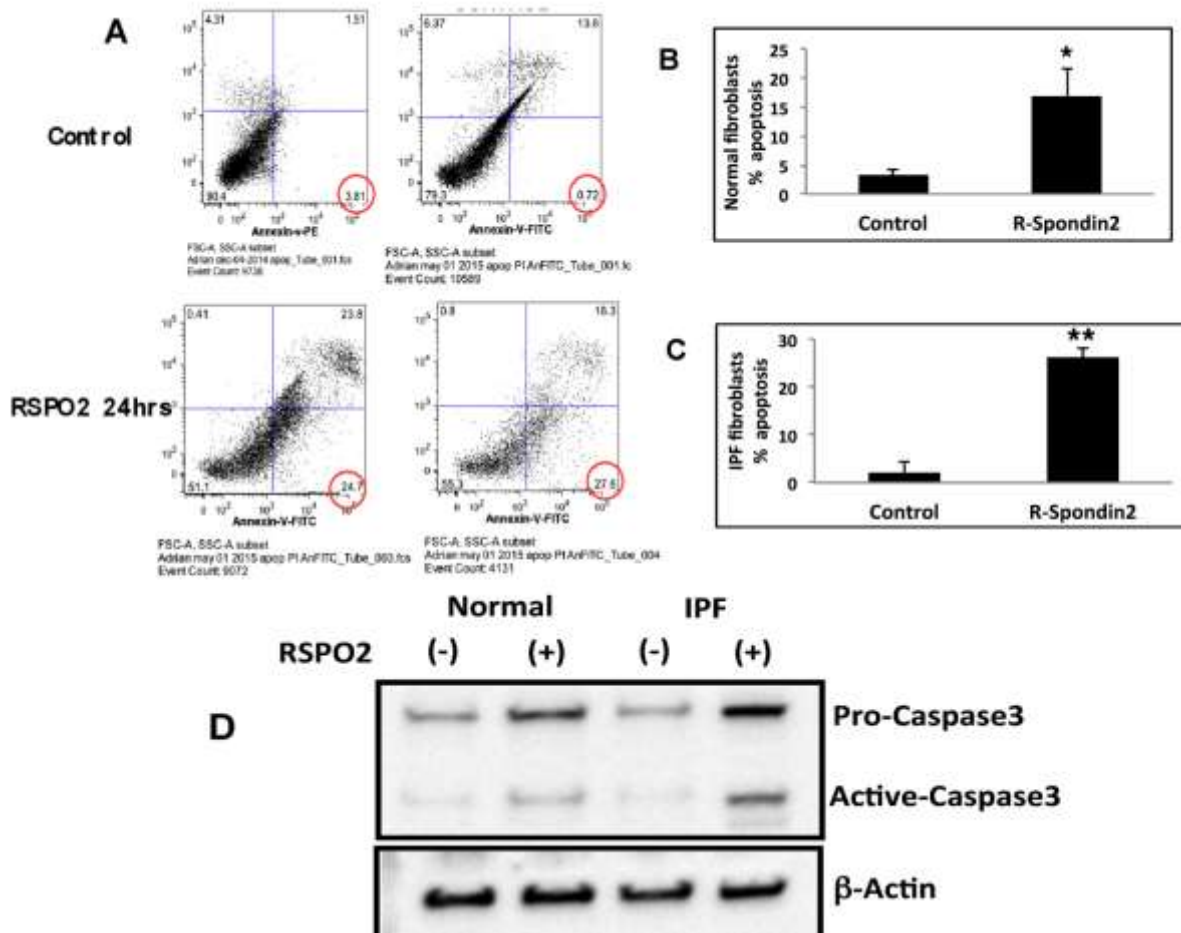
fibroblastos normales (A) y de FPI (B) se midió la tasa de crecimiento en células sin tratar o estimuladas con RSPO2 (10, 100 mg/ml) mediante el reactivo WST-1 a 24 y 48 hrs de cultivo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  D.E. de dos experimentos independientes. Los fibroblastos fueron pretratados 24 hrs con IWP-2, que es un inhibidor general de la vía de WNT (C, D) y posteriormente estimulados con rhRSPO2. La tasa de proliferación se cuantificó en fibroblastos normales y de FPI estimulados con RSPO2 mediante el reactivo CyQuant (E, F). Los datos se presentan como promedio  $\pm$  D.E. de dos experimentos independientes.

### **R-Spondina 2 induce apoptosis en fibroblastos pulmonares**

Los análisis de IPA mostraron que RSPO2 modifica diferentes genes relacionados con apoptosis (**Tabla 1**). Por ejemplo, en fibroblastos de FPI, además de SFN, esta molécula induce un incremento de otros genes proapoptóticos como caspasa 5 (CASP5). En fibroblastos normales disminuye la expresión de genes antiapoptóticos como BCL-2 (*B-cell lymphoma*) y BAG5 (*BCL2 Associated Athanogene 5*); Además induce la expresión de genes proapoptóticos APITD1-CORT (APITD1: *apoptosis-inducing, TAF9-like domain*; CORT: *cortistatin*).

Para probar si estos cambios resultan en actividad proapoptótica, medimos la muerte celular mediante un ensayo de Anexina V/IP en citometría de flujo en dos líneas de fibroblastos normales y dos de FPI. Como se muestra en la **Figura 12A**, RSPO2 incremento de manera significativa la apoptosis (anexina V positiva/IP negativa, cuadrante inferior derecho) tanto en fibroblastos normales como derivados de FPI (**Figura 12B y 12C**). Para fortalecer este hallazgo, la caspasa-3 activa se midió por Western Blot y como se muestra en la **Figura 12D**, el tratamiento con RSPO2 incrementa la expresión de procaspasa-3 y caspasa-3

activa en fibroblastos normales y de FPI.



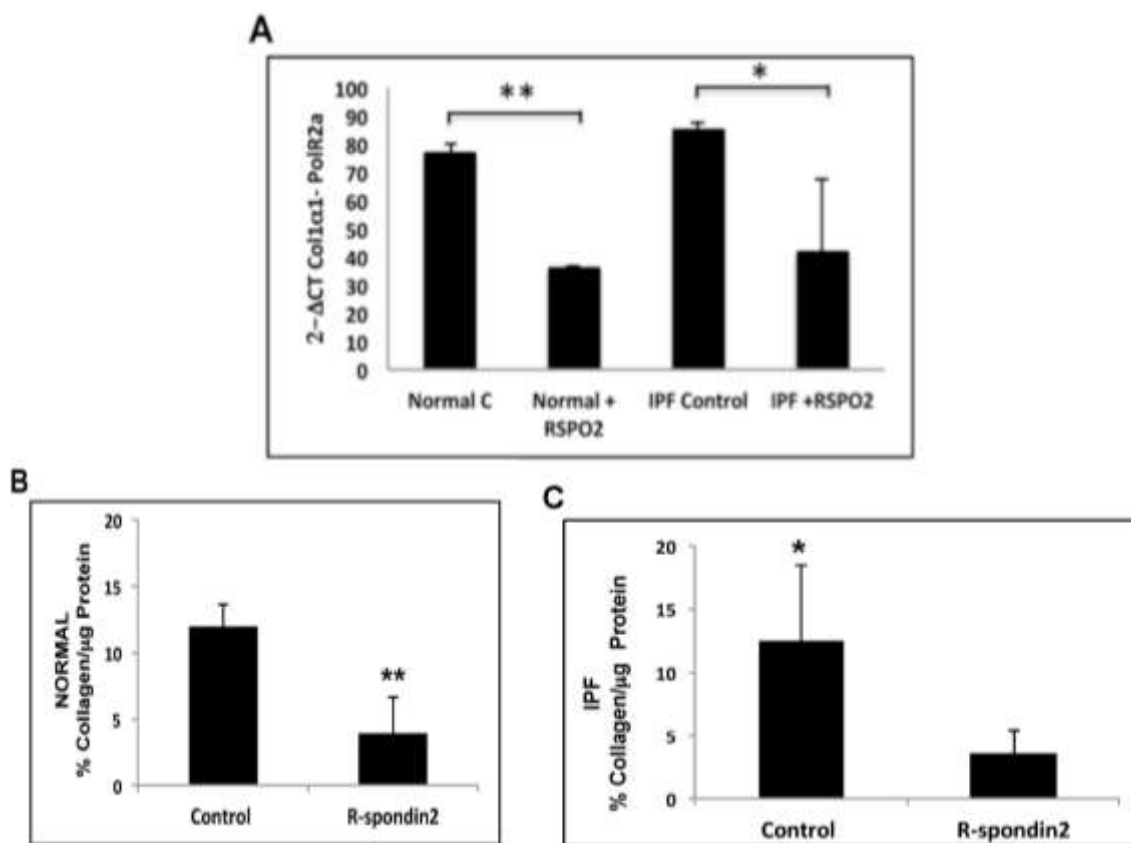
**Figura 12. R-Spondina 2 induce apoptosis en fibroblastos normales y de FPI.**

La muerte celular se midió en fibroblastos normales y de FPI estimulados con rhRSPO2 (10 ng/ml) por 24 hrs. La apoptosis se monitoreo mediante anexina V etiquetada con un fluorocromo/Ioduro de propidio. (A) Gráfico de dispersión del análisis de citometría de flujo mostrando el incremento de la tinción con Anexina V en fibroblastos normales y de FPI tratados con rhRSPO2. El promedio de dos experimentos independientes con fibroblastos normales se muestra en el panel B y el de tres experimentos independientes con fibroblastos de FPI en panel C. (D) Análisis de Western Blot para la detección de caspasa-3. Lisados totales de células de fibroblastos normales y de FPI fueron inmunocongugados con anticuerpos para detectar caspasa-3 y  $\beta$ -actina como control de carga. RSPO2 indujo un incremento en la expresión de la proteína de procaspasa-3 y caspasa-3.

## **R-Spondina 2 disminuye la producción de colágena e incrementa la expresión de metaloproteasa de matriz (MMP)-1**

Debido a que RSPO2 mostró posibles funciones antifibróticas al reducir la proliferación e inducir apoptosis de fibroblastos, decidimos investigar si esta molécula también tiene un efecto en la producción de colágena. Para esto, fibroblastos normales y de FPI fueron estimulados con rhRSPO2 (10 ng/ml) por 24 hrs, y la expresión de colágena tipo  $1\alpha 1$  se examinó mediante qPCR. Adicionalmente, medimos la producción de colágena utilizando el ensayo de Sircol en medios condicionados (M.C.). Como se muestra en la **Figura 13A**, RSPO2 disminuye de manera significativa la expresión de colágena tipo  $1\alpha 1$ , tanto en fibroblastos normales como de FPI. Igualmente, los fibroblastos estimulados con rhRSPO2 mostraron una disminución significativa en la cantidad de colágena detectada en M.C. de  $11.9 \pm 1.6$  a  $4.0 \pm 2.7\%$  por  $\mu\text{g}$  proteína en fibroblastos normales ( $p < 0.01$ ), y de  $12.4 \pm 6.0$  a  $3.6 \pm 1.8\%$  por  $\mu\text{g}$  proteína; en fibroblastos de FPI ( $p < 0.05$ ; **Figura 13B y 13C**).

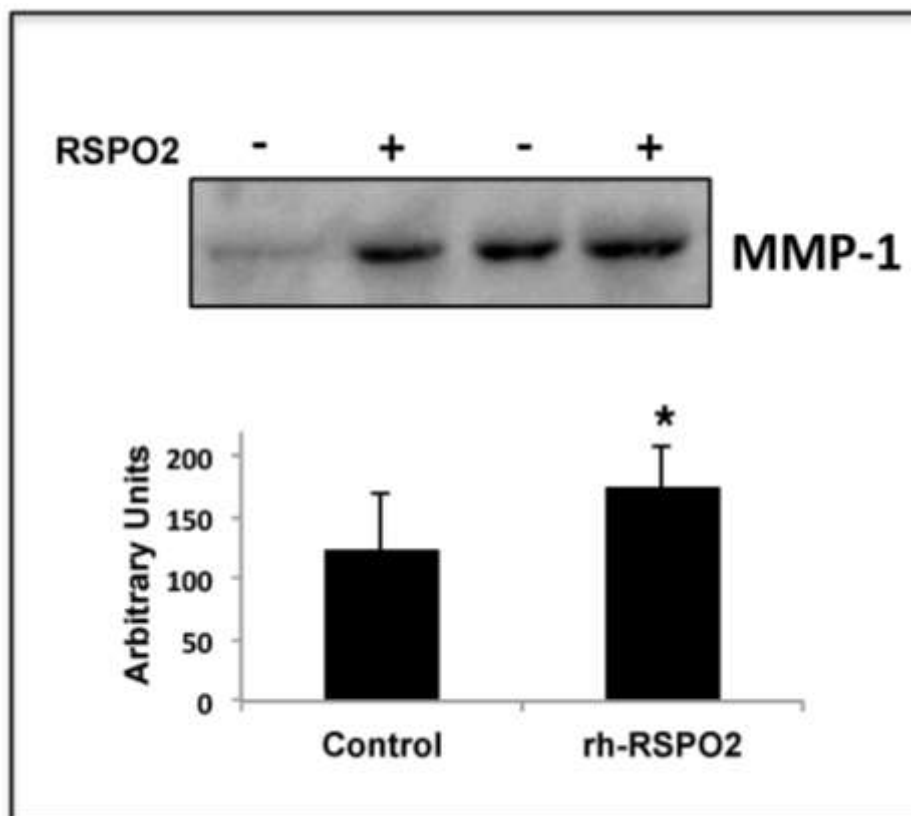




**Figura 13. R-Spondina2 disminuye la producción de colágena** (A) Fibroblastos normales y de FPI fueron estimulados con rhRSPO2 (10 ng/ml) y se determinó la expresión de colágena mediante qPCR normalizado con PolR2a. (B y C) La producción de colágena se midió en medios condicionados de células con el ensayo colorimétrico Sircol. Los resultados están expresados como porcentaje de colágena/μg de proteína de dos experimentos independientes \*p<0.05; \*\*p<0.01.

Por otro lado, se ha demostrado previamente que SFN, un gen altamente sobre-regulado en fibroblastos de FPI tratados con RSPO2, estimula la expresión de MMP-1, que es la mayor enzima degradadora de colágenas fibrilares (56). Con base en esta información, también examinamos el efecto de la estimulación con rhRSPO2 en la inducción de esta enzima en dos líneas de fibroblastos primarios obtenidos de FPI. Para este propósito, se usaron 12 μg de proteína total de los

M.C. y el análisis se hizo por Western blot. Como se muestra en la **Figura 14**, RSPO2 incrementa la secreción de MMP-1 en los M.C.

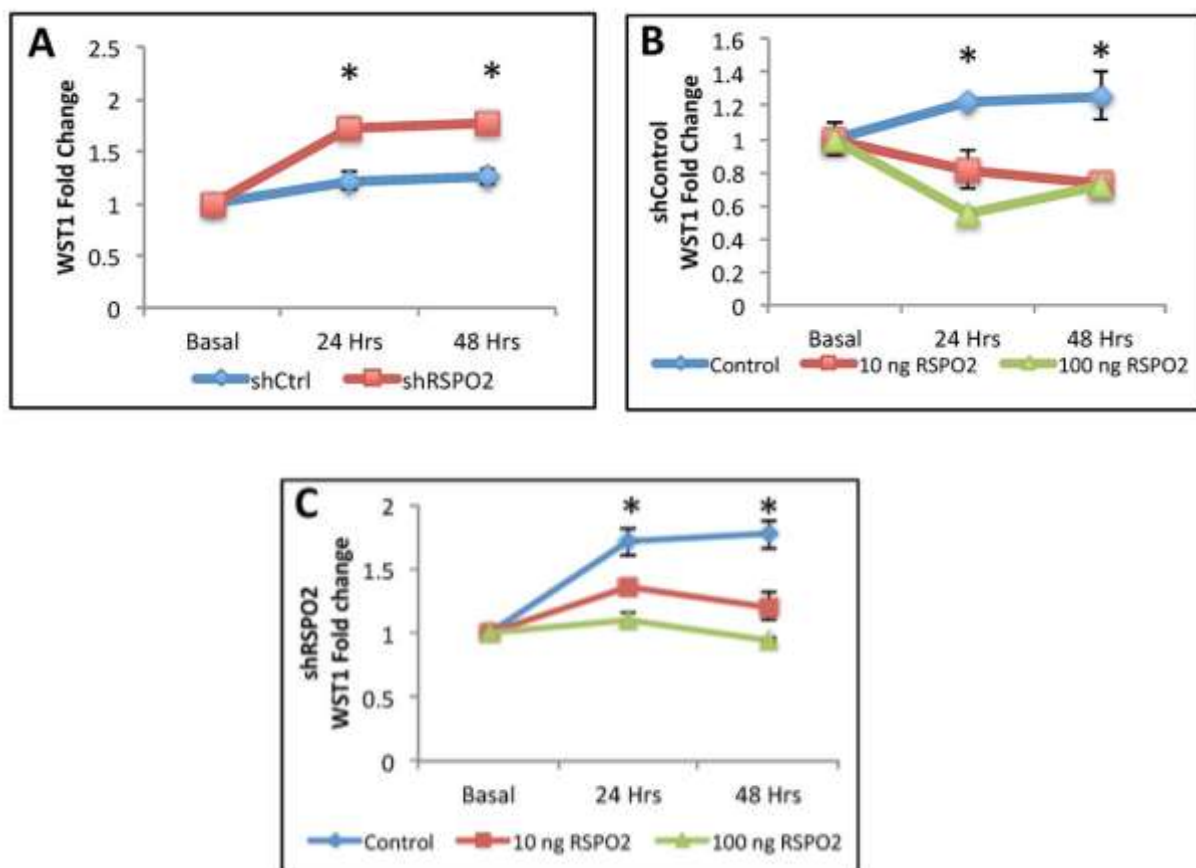


**Figura 14. R-Spondina2 incrementa la secreción de MMP-1.** La concentración de MMP-1 se midió por Western Blot de medios condicionados de fibroblastos de FPI estimulados con 10 ng/ml de rhRSPO2 por 24 horas. Se cargaron 20  $\mu$ g de proteína total en cada carril.

### **Efecto del silenciamiento de R-Spondina 2 en la proliferación y expresión de estratífina, colágena y MMP-1 por fibroblastos pulmonares humanos**

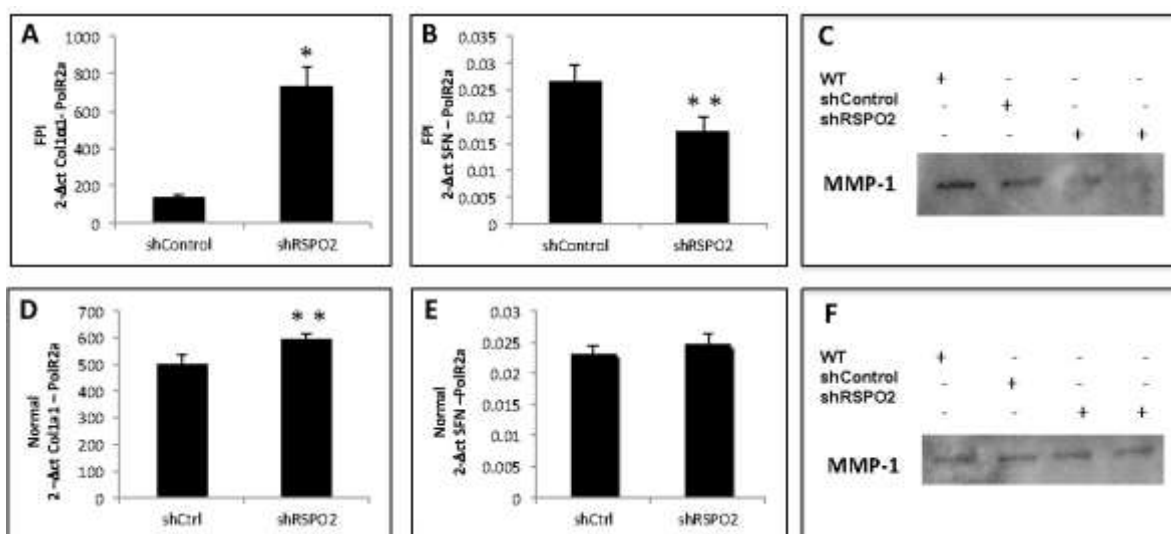
Para corroborar el efecto de RSPO2 en la regulación del comportamiento de los fibroblastos pulmonares, decidimos silenciar el gen transfectando un shRNA que apunta específicamente a RSPO2. Después, analizamos la proliferación de los fibroblastos, así como la expresión de SFN, colágena y MMP-1. Como se muestra

en la **Figura 15A**, la transfección de fibroblastos con shRNA R-Spondina 2 (shRSPO2) se asocia con un incremento en la proliferación comparada con los fibroblastos transfectados con shRNA aleatorio (shRNA control). Cuando las células silenciadas con shRSPO2 o shRNA control se trataron con 10 o 100 ng/ml de rhRSPO2 observamos nuevamente una disminución significativa en la tasa de crecimiento (**Figura 15B y 15C**).



**Figura 15. Efectos de silenciamiento de R-Spondina2 en proliferación de fibroblastos.** (A) Los fibroblastos transfectados con shRNA para RSPO2 (shRSPO2) mostraron un incremento en la tasa de crecimiento comparados con los transfectados con shRNA aleatorio (shCtrl). (B y C) El tratamiento con rhRSPO2 disminuyó significativamente la tasa de crecimiento tanto en fibroblastos transfectados con shCtrl (B) como en aquellos transfectados con shRSPO2 (C).

Finalmente, con relación a la expresión de las moléculas blanco seleccionadas, los fibroblastos con RSPO2 silenciada, tanto normales como de FPI mostraron efectos opuestos a aquellos observados con la estimulación con rhRSPO2. Así, los fibroblastos de FPI mostraron un incremento en la expresión de colágena (**Figura 16A**), y una disminución en la expresión de SFN y MMP1 (**Figura 16B y 16C**). En fibroblastos normales, encontramos incremento en la expresión de colágena, sin cambios en la expresión de SFN o MMP-1 (**Figura 16 D-F**).

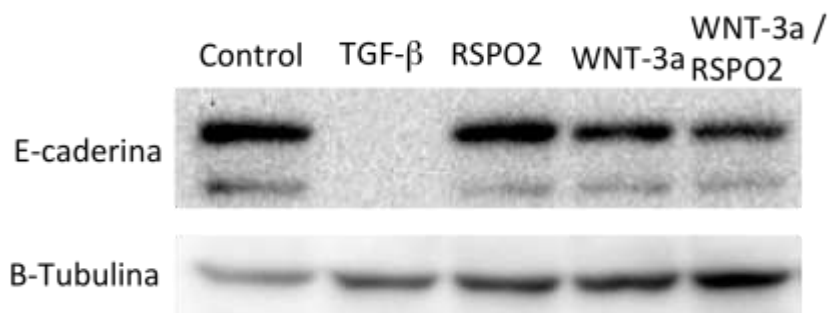


**Figura 16. Efectos de silenciamiento de R-Spondina2 en expresión de moléculas blanco.** (A y B) Expresión génica de colágena 1α1 y SFN en fibroblastos de FPI, datos normalizados con Polr2a. (C) Western Blot de MMP-1 en medios condicionados de fibroblastos de FPI. (D y E) Expresión génica de colágena 1α1 y SFN en fibroblastos normales transfectados, datos normalizados con Polr2a. (F) Western Blot de MMP-1 en medio condicionado de fibroblastos pulmonares normales. \*p<0.01; \*\*p<0.05

### Efecto de R-Spondina 2 en células epiteliales alveolares

Debido a que encontramos que RSPO2 y su receptor están presentes in vivo en el

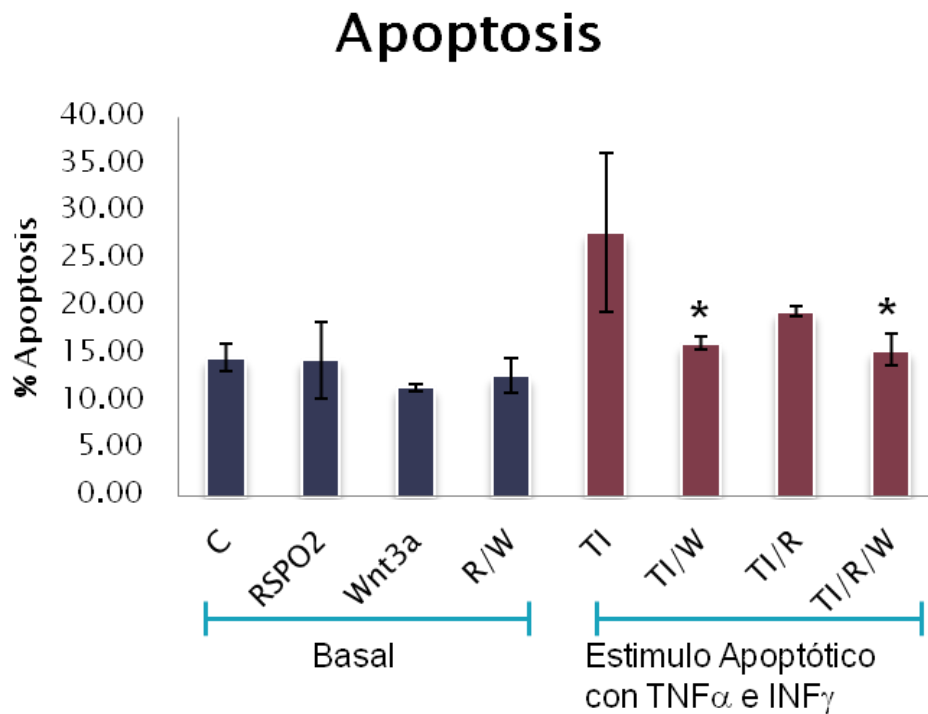
epitelio de pacientes con FPI decidimos investigar si está proteína modificaba el comportamiento de este tipo celular, en particular de la transición epitelio mesénquima (TEM). Para esto, se cultivaron células epiteliales A549 y se estimularon 72 hrs con 2 ng/ml de TGF- $\beta$  (un fuerte inductor de TEM), 10 ng/mL de rhRSPO2, 100 ng/mLWNT3a y una combinación de RSPO2 y WNT3a (10ng-100ng, respectivamente). El estímulo de TGF- $\beta$ , provocó disminución en la expresión de E-caderina que es un marcador fenotípico de células epiteliales mientras que el estímulo con RSPO2 y WNT3a no mostró ningún efecto en la expresión de esta proteína (**Figura 17**).



**Figura 17.** La concentración de E-caderina se determinó mediante Western Blot de extractos totales de células epiteliales A549 estimuladas con 2 ng/ml de TGF- $\beta$ , 10 ng/mL de rhRSPO2, 100 ng/mLWNT3a y una combinación de RSPO2 y WNT3a (10ng-100ng). Se utilizó  $\beta$ -tubulina como control de carga.

Finalmente, evaluamos si RSPO2 tiene un efecto en la apoptosis en células epiteliales mediante un ensayo de Anexina V/IP en citometría de flujo y encontramos que RSPO2, WNT3a o una combinación de ambas moléculas no tienen un efecto en la apoptosis basal de estas células (**Figura 18**). También examinamos el efecto de estas moléculas sobre la muerte celular inducida con un estímulo proapoptotico de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Como se muestra en la **Figura 18** el

estímulo de  $\text{TNF-}\alpha/\text{IFN-}\gamma$  incrementó la apoptosis. Este efecto se redujo significativamente con el tratamiento con WNT, que disminuyó la apoptosis a niveles cercanos al basal. El estímulo con RSPO2 mostró una tendencia que no alcanzó significancia estadística.



**Figura 18. R-Spondina 2 no modifica la apoptosis en células epiteliales A549.**

La muerte celular espontánea se midió en células epiteliales A549 estimulados con RSPO2 (10 ng/ml) WNT3a 100 ng/ml y una combinación de ambas moléculas (R/W) por 24 hrs. Además se trataron con un estímulo inductor de apoptosis con  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IFN-}\gamma$  (TI) y se observó que RSPO2 y WNT3a no modifican la apoptosis basal, pero protegen del estímulo inductor.

## Discusión

La fibrosis pulmonar idiopática continúa siendo una enfermedad progresiva e incurable, sin ningún tratamiento que tenga una influencia significativa en su pobre supervivencia y calidad de vida. A pesar de que nuestro conocimiento de los mecanismos involucrados en la patogénesis de esta enfermedad ha mejorado en las últimas dos décadas, la complejidad en las vías moleculares alteradas que participan en su patogénesis no han sido aclaradas. Nuestro grupo de investigación, junto con otros investigadores ha postulado que la recapitulación aberrante de diferentes vías embriológicas puede desempeñar un papel crítico y a la fecha, algunas de ellas se han encontrado desreguladas en FPI (10-18). Por ejemplo, varios ligandos de WNT así como la  $\beta$ -catenina están altamente expresados en las células epiteliales alveolares y fibroblastos (10,15-18). Asimismo, *Sonic hedgehog*, el cual controla la proliferación y supervivencia del mesénquima en el desarrollo embrionario del pulmón y es importante para la apropiada morfogénesis de las vías aéreas, está fuertemente sobreexpresada en el epitelio pulmonar, mientras que su factor de transcripción GLI1 ha sido detectado en el epitelio alveolar y fibroblastos en FPI (19,20). Otras moléculas de expresión embrionaria como por ejemplo, *grainyhead-like 2* (GRHL2), un factor de transcripción involucrado en morfogénesis epitelial, y *Wilms tumour-1* (WT1), un factor transcripción que regula muchas propiedades funcionales del mesotelio en desarrollo, se reactivan en los pulmones de FPI (57, 58).

Las R-Spondinas son una familia compuesta por 4 proteínas de secreción, que pertenecen a la superfamilia de proteínas que contienen repeticiones de trombospondina tipo 1 (TSR1) las cuales desempeñan un papel importante durante desarrollo embrionario. Se ha sugerido que las R-Spondinas se unen a proteínas

de matriz extracelular, como proteoglicanos de heparán-sulfato, lo que podría definirlos como proteínas de matriz extracelular (59). Nosotros enfocamos este estudio en RSPO2, debido a que durante el desarrollo, se expresa fuertemente en los pulmones (33). Además, se ha demostrado que la deficiencia de esta proteína en ratones resulta letal de manera postnatal, sugiriendo que RSPO2 tiene funciones que no son redundantes con otros miembros de la familia de R-Spondinas (60).

Primero exploramos la expresión pulmonar y la localización celular de RSPO2 y el receptor LGR6, al cual RSPO2 se une de manera específica y con una alta especificidad (61). Encontramos que la expresión génica de ambas moléculas está altamente incrementada en tejidos de FPI y que las proteínas se inmunolocalizaron en células epiteliales y fibroblastos. En contraste, RSPO2 y LGR6 estaban virtualmente ausentes en pulmones normales. Asimismo, encontramos que RSPO2 se sobreexpresa fibroblastos de FPI con respecto a fibroblastos de pulmón normal mientras que no se encontraron diferencias en relación al receptor.

Posteriormente evaluamos mediante análisis de secuenciación de RNA los cambios en los perfiles de transcripción inducidos por RSPO2, y encontramos que esta proteína provoca una profunda reprogramación en fibroblastos, principalmente en los fibroblastos de FPI. Identificamos a la vía de WNT, ciclo celular y apoptosis como las vías mayormente afectadas. Fue de nuestro interés particular, la desregulación de la vía de WNT, primero porque los genes diferencialmente expresados en esta vía se observaron únicamente en fibroblastos de FPI, y segundo porque es bien conocido que las R-Spondinas son activadores



para la señalización de WNT/ $\beta$ -catenina, al promover la estabilización de los receptores de WNT, como las proteínas relacionadas a LDL (LRPs) y *Frizzled* (62), pero no se había reportado que afectara su expresión génica. Sin embargo, de manera inesperada encontramos que los cambios se relacionaban principalmente con elementos de la vía no canónica (también llamada vía independiente de  $\beta$ -catenina). Así, observamos que la expresión de WNT5b está sobrerregulada mientras que la de WNT11 está disminuida. También el ligando no canónico WNT9A (63) está sobreexpresado, así como WNT16, que media la señalización vía canónica y no canónica, pero puede actuar como inhibidor de la vía canónica previniendo su activación excesiva (64). Además, la proteína 1 inducida por WNT (WISP1/CCN4), un miembro de la familia de proteínas CCN (CyR61, CTGF, NOV) que funciona como un factor río abajo en la vía WNT canónica también se encontró subexpresado. Es importante enfatizar, que la señalización no canónica de WNT se ha reportado como antagonista de la vía dependiente de  $\beta$ -catenina (65).

Considerados en conjunto, estos hallazgos sugieren que la estimulación de fibroblastos de FPI con RSPO2 induce cambios principalmente en la vía de señalización no canónica de WNT, mientras que no tiene este efecto en fibroblastos pulmonares humanos normales.

Por otro lado, la firma transcripcional inducida por RSPO2 indicó un efecto en el ciclo celular, sugiriendo que podía inhibir la proliferación e inducir la apoptosis tanto en fibroblastos normales como de FPI. En el caso de los fibroblastos de FPI, nos enfocamos en la estratifina (SFN, también llamada 14-3-3 sigma), una molécula que no ha sido previamente relacionada con R-spondinas, la cual

presentó un marcado incremento con la estimulación con RSPO2. SFN es un potente regulador de ciclo celular, que inhibe la actividad de Cdk2/ciclina E, induciendo arresto de ciclo en fase G1; además secuestra Cdc2/ciclina B en el citoplasma, induciendo arresto en fase G2 (66, 67).

Con respecto a los fibroblastos normales, uno de los genes más disminuidos con el tratamiento con RSPO2 fue SPDYA (también conocido como SPY1) que permite que las células evadan los puntos de control de ciclo celular y apoptosis, mejorando la proliferación y disminuyendo la muerte celular programada (55, 56). Por ejemplo, la disminución de la expresión de SPDYA, mediante el uso de siRNA, ha demostrado que esta proteína es un componente crítico en la señalización de proliferación celular (68).

En consistencia con estos hallazgos, nosotros encontramos mediante dos métodos diferentes, que RSPO2 disminuye de manera importante la proliferación celular tanto en fibroblastos de FPI como provenientes de pulmones normales. Este efecto parece ser independiente de la señalización de WNT debido a que los cambios en la expresión de WNT se observaron únicamente en fibroblastos de FPI, mientras que el efecto funcional se encontró en ambos tipos celulares. En apoyo de estos resultados observamos que la inhibición de WNT no tuvo efecto en la disminución de la proliferación inducida por RSPO2. Para reforzar estos hallazgos, fibroblastos silenciados para RSPO2 mostraron un incremento en la proliferación, la cual fue inhibida nuevamente por el estímulo con RSPO2. Resultados similares se han reportado recientemente en cáncer humano colorectal, donde RSPO2 mostró un fuerte efecto inhibitorio de la proliferación celular (69).

Por otro lado, encontramos muchos genes proapoptóticos sobreexpresados. Por

ejemplo, en fibroblastos de FPI, RSPO2 incrementó fuertemente la expresión de caspasa 5 (que también participa en la respuesta inflamatoria, 70), mientras que en fibroblastos normales, disminuyó BCL2, uno de los principales reguladores del proceso apoptótico e incrementó la expresión de APITD1-CORT. Este efecto de RSPO2 que parece ser proapoptótico se corroboró funcionalmente en fibroblastos normales y de FPI, dado que provocó un incremento significativo en la muerte celular, determinado en citometría de flujo por tinción con anexinaV/IP así como de la actividad de caspasa 3, la cual corta más de 1,300 sustratos celulares para ejecutar la muerte por apoptosis (71). Este efecto puede representar un significativo mecanismo antifibrótico debido a que se ha demostrado que los fibroblastos de FPI son resistentes a apoptosis, lo que resulta en su persistencia en las áreas dañadas (2). Este proceso mantiene su fenotipo de manera persistente, a pesar de un microambiente que favorece la inducción de apoptosis y en consecuencia refuerza la producción exagerada de matriz extracelular (72, 73). Debido a que la disminución en la proliferación de fibroblastos y el incremento de apoptosis pueden considerarse efectos antifibróticos de RSPO2, decidimos también investigar sus efectos en la producción de colágena. Nuestros resultados muestran una disminución en la expresión del gen de colágena y en la colágena liberada al medio de cultivo posterior a la administración de RSPO2 tanto en fibroblastos normales como en derivados de FPI. Además encontramos que RSPO2 incrementa la producción de MMP-1, que también se ha asociado a la sobrerregulación de estratifina (74). Actualmente, el papel de MMP-1 en la fibrosis pulmonar es incierto porque se encuentra sobreexpresada en pulmones de FPI, pero se expresa principalmente en células epiteliales y no en focos de fibroblastos, donde ocurre la acumulación de colágena (75, 76).

En contraste con nuestros hallazgos, Yin X y col. reportaron que en células estelares hepáticas (CEH) RSPO2 estimula la proliferación, así como la expresión de alfa actina de musculo liso ( $\alpha$ -AML) y colágena 1 (77). La razón para estas diferencias es incierta, pero las células CEH almacenadoras de vitamina A, tienen características únicas con respecto a su origen celular, morfología, expresión génica y funciones (78). En realidad, se han descrito muchas diferencias entre fibroblastos pulmonares y estelares hepáticas, por ejemplo, mientras que miR-34a protege a ratones contra fibrosis pulmonar al promover apoptosis de fibroblastos, en hígado promueve la activación de CEH y contribuye a fibrosis inducida por radiación (79,80).

El recambio coordinado de la matriz extracelular es crucial en el proceso de cicatrización de heridas, y los hallazgos de nuestro estudio sugieren que RSPO2 contribuye en el delicado balance entre la síntesis y degradación de colágenas fibrilares, disminuyendo la expresión de colágena e incrementando la secreción de MMP-1. Apoyando este concepto, se ha descrito previamente que SFN interactúa con SPARC (*Secreted protein acidic rich in cystein*) induciendo un efecto de inhibición colágena en fibroblastos de piel (81).

Finalmente, como una prueba de este concepto, examinamos el efecto del silenciamiento de RSPO2 mediante shRNA en la proliferación de fibroblastos y en la expresión de colágena y estratifina. Encontramos que la pérdida de función de RSPO2 lleva a resultados opuestos comparados con aquellos observados con la estimulación con RSPO2. Así, el silenciamiento de RSPO2 resultó en un incremento de la proliferación de fibroblastos que se inhibió nuevamente después de la estimulación de RSPO2. Igualmente, el silenciamiento de RSPO2 en fibroblastos de FPI resultó en un incremento en la expresión de colágena y una

disminución en la expresión de estratifina y MMP-1.

Finalmente, y con base en la observación de que RSPO2 y su receptor también se localizaron in células epiteliales de vías aéreas y alveolares en IPF, investigamos si esta molécula modificaba el comportamiento de este segundo tipo celular. Para esto cultivamos una línea comercial de células epiteliales (A549) y las estimulamos con rhRSPO2. Nuestros resultados fueron esencialmente negativos. Por ejemplo, RSPO2 no parece participar en el proceso de transición epitelio mesénquima (evaluado a través de la medición de E-caderina, la cual disminuye durante TEM), ni modifica los niveles de apoptosis basal ni después de inducción con TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , en este tipo celular.

En resumen, nuestros hallazgos demuestran que R-Spondina 2 está sobreexpresada en pulmones y fibroblastos de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática donde parece tener una función como mediador antifibrotico. En este contexto, no es inusual que moléculas antifibróticas pueden estar incrementadas en pulmones de FPI donde probablemente que sean superados por la producción de una vasta diversidad de factores pro-fibróticos; algunos ejemplos incluyen a la MMP-19, ciclooxigenasa 2, factor de crecimiento de fibroblastos-1 y sindecan-2 todos los cuales están aumentados en los pulmones con FPI probablemente como un mecanismo de defensa antifibrosante, pero su efecto se pierde en relación al que producen los numerosos mediadores profibróticos en el microambiente pulmonar (82-85).

En conjunto, nuestros resultados muestran que RSPO2, a través de una ruta independiente de WNT, promueve un fenotipo antifibrótico en fibroblastos, reduciendo la proliferación celular y producción de colágena, e induciendo

apoptosis y puede representar un objetivo potencial para el desarrollo de nuevas terapias anti-fibróticas.

## Referencias

1. Raghu G, Rochweg B, Zhang Y, Garcia CA, Azuma A, Behr J, Brozek JL, Collard HR, Cunningham W, Homma S, Johkoh T, Martinez FJ, Myers J, Protzko SL, Richeldi L, Rind D, Selman M, Theodore A, Wells AU, Hoogsteden H, Schünemann HJ. American Thoracic Society; European Respiratory society; Japanese Respiratory Society; Latin American Thoracic Association. An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline: treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. An update of the 2011 clinical practice guideline. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 192:e3-e19.
2. King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 2011; 378:1949-1961.
3. King, T.E. et al. (2014) A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 370, 2083–2092
4. Richeldi, L. et al. (2014) Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 370, 2071–2082
5. Selman, M. and Pardo, A. (2014) Revealing the Pathogenic and Aging-related Mechanisms of the Enigmatic Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Integral Model. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 1161–1172
6. Fingerlin TE, Murphy E, Zhang W, Peljto AL, Brown KK, Steele MP, Loyd JE, Cosgrove GP, Lynch D, Groshong S, Collard HR, Wolters PJ, Bradford WZ, Kossen K, Seiwert SD, du Bois RM, Garcia CK, Devine MS, Gudmundsson G, Isaksson HJ, Kaminski N, Zhang Y, Gibson KF, Lancaster LH, Cogan JD, Mason WR, Maher TM, Molyneaux PL, Wells AU, Moffatt MF, Selman M, Pardo A, Kim DS, Crapo JD, Make BJ, Regan EA, Walek DS, Daniel JJ, Kamatani Y, Zelenika D, Smith K, McKean D, Pedersen BS, Talbert J, Kidd RN, Markin CR, Beckman KB, Lathrop M, Schwarz MI, Schwartz DA. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nat Genet.* 2013 Jun;45(6):613-20.
7. K.B. Baumgartner, J.M. Samet, C.A. Stidley, T.V. Colby, J.A. Waldron. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 155 (1) (1997), pp. 242-248.
8. V. Taskar, D. Coultas. Exposures and idiopathic lung disease. *Semin Respir Crit Care Med*, 29 (6) (2008), pp. 670-679.
9. Nalysnyk, L. et al. (2012) Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *Eur. Respir. Rev.* 21, 355 LP-361.
10. Selman M, López-Otín C, Pardo A. Age-driven developmental drift in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2016; 48:538-552.
11. Armanios M. Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. *J Clin Invest.* 2013 Mar;123(3):996-1002.
12. Bueno M, Lai YC, Romero Y, Brands J, St Croix CM, Kamga C, Corey C, Herazo-Maya JD, Sembrat J, Lee JS, Duncan SR, Rojas M, Shiva S, Chu CT, Mora AL. PINK1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes lung fibrosis. *J Clin Invest.* 2015 Feb;125(2):521-38.
13. Mora AL, Rojas M, Pardo A, Selman M. Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2017 Nov;16(11):755-772.

14. Selman, M. et al. (2001) Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann. Intern. Med.* 134, 136–151.
15. Königshoff M, Balsara N, Pfaff EM, Kramer M, Chrobak I, Seeger W, Eickelberg O. Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* 2008; 3(5):e2142.
16. Königshoff M, Kramer M, Balsara N, Wilhelm J, Amarie OV, Jahn A, Rose F, Fink L, Seeger W, Schaefer L, Günther A, Eickelberg O. WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2009; 119:772-787.
17. Oda K, Yatera K, Izumi H, Ishimoto H, Yamada S, Nakao H, Hanaka T, Ogoshi T, Noguchi S, Mukae H. Profibrotic role of WNT10A via TGF- $\beta$  signaling in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2016; 17(1):39.
18. Vuga LJ, Ben-Yehudah A, Kovkarova-Naumovski E, Oriss T, Gibson KF, Feghali-Bostwick C, Kaminski N. WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 41:583-589.
19. Cigna N, FarrokhiMoshai E, Brayer S, Marchal-Somme J, Wémeau-Stervinou L, Fabre A, Mal H, Lesèche G, Dehoux M, Soler P, Crestani B, Mailleux AA. The hedgehog system machinery controls transforming growth factor- $\beta$ -dependent myofibroblastic differentiation in humans: involvement in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2012; 181:2126-2137.
20. Bolaños AL, Milla CM, Lira JC, Ramírez R, Checa M, Barrera L, García-Alvarez J, Carbajal V, Becerril C, Gaxiola M, Pardo A, Selman M. Role of sonic hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 303:L978-L990.
21. A J Mikels and R Nusse Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* (2006) 25, 7461–7468.
22. Clevers H. Wnt/b-Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* (2006) 127, November 3.
23. Tolwinski NS, Wehrli M, Rives A, Erdeniz N, DiNardo S, Wieschaus E. Wg/Wnt Signal Can Be Transmitted through Arrow/LRP5,6 and Axin Independently of Zw3/Gsk3 $\beta$  Activity. *Dev. Cell* (2003), March Vol. 4, 407–418.
24. Hao et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* (2012)Apr.
25. Kim et al. R-Spondin Family Members Regulate the Wnt Pathway by a Common Mechanism. *Mol Bio Cell* (2008) Vol. 19, 2588–2596, June.
26. Chen JZ, Wang S, Tang R, Yang QS, Zhao E, Chao Y, Ying K, Xie Y, Mao YM: Cloning and identification of a cDNA that encodes a novel human protein with thrombospondin type I repeat domain, hPWTSR. *Mol Biol Rep* (2002), 29:287-292.
27. Kamata T, Katsube K, Michikawa M, Yamada M, Takada S, Mizusawa H: R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants. *Biochim Biophys Acta* (2004), 1676:51-62.
28. Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, Stanek P, Niehrs C, Wu W: RSpondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis. *Dev Cell* (2004), 7:525-534.



29. Kim KA, Zhao J, Andarmani S, Kakitani M, Oshima T, Binnerts ME, Abo A, Tomizuka K, Funk WD: R-Spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation. *Cell Cycle* (2006), 5:23-26.
30. de Lau et al. The R-spondin protein family. *Genome Biology* (2012), 13:242.
31. Kim KA, Wagle M, Tran K, et al.: R-spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Mol Biol Cell* (2008), 19:2588–2596.
32. Bell SM, Schreiner CM, Wert SE, et al.: R-spondin 2 is required for normal laryngeal-tracheal, lung and limb morphogenesis. *Development* (2008), 135:1049–1058.
33. Nam JS, Turcotte TJ, Yoon JK Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development. *Gene Expression Patterns* (2007) 306–312.
34. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu RevCell Dev Biol* (2004), 20:781-810.
35. Bell SM, Schreiner CM, Wert SE, Mucenski ML, Scott WJ, Whitsett JA: R-spondin 2 is required for normal laryngeal-tracheal, lung and limb morphogenesis. *Development* (2008), 135:1049-1058.
36. Nam JS, Park E, Turcotte TJ, Palencia S, Zhan X, Lee J, Yun K, Funk WD, Yoon JK. Mouse R-spondin2 is required for apical ectodermal ridge maintenance in the hindlimb. *Dev Biol* (2007), 311:124-135.
37. DasGupta R, Fuchs E: Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development* (1999), 126:4557-4568.
38. Papapietro O1, Teatero S, Thanabalasuriar A, Yuki KE, Diez E, Zhu L, Kang E, Dhillon S, Muise AM, Durocher Y, Marcinkiewicz MM, Malo D, Gruenheid S. R-Spondin 2 signalling mediates susceptibility to fatal infectious diarrhea. *Nat Commun.* (2013),4:1898.
39. Wu C, Qiu S, Lu L, Zou J, Li WF, Wang O, Zhao H, Wang H, Tang J, Chen L, Xu T, sun Z, Liao W, Luo G, Lu X. RSPO2-LGR5 signaling has tumoursuppressive activity in colorectal cancer. *Nat Commun.* 2014;5:3149.
40. Shinmura K, Kahyo T, Kato H, Igarashi H, Matsuura S, Nakamura S, Kurachi K, Nakamura T, Ogawa H, Funai K, Tanahashi M, Niwa H, Sugimura H. RSPO fusion transcripts in colorectal cancer in Japanese population. *Mol Biol Rep* (2014) 41:5375–5384.
41. Chua AW, Ma D, Gan SU, Fu Z, Han HC, Song C, Sabapathy K, Phan TT  
The role of R-Spondin2 in keratinocyte proliferation and epidermal thickening in keloid scarring. *J Invest Dermatol.* (2011) Mar;131(3):644-54.
42. Dolmans GH1, Werker PM, Hennies HC, Furniss D, Festen EA, Franke L, Becker K, van der Vlies P, Wolffenbuttel BH, Tinschert S, Toliat MR, Nothnagel M, Franke A, Klopp N, Wichmann HE, Nürnberg P, Giele H, Ophoff RA, Wijmenga C; Dutch Dupuytren Study Group; German Dupuytren Study Group; LifeLines Cohort Study; BSSH-GODD Consortium. Wnt signaling and Dupuytren's disease. *N Engl J Med.* (2011) Jul 28;365(4):307-17.
43. Checa M, Hagood JS, Velazquez-Cruz R, Ruiz V, García-De-Alba C, Rangel-Escareño C, Urrea F, Becerril C, Montaña M, García-Trejo S, Cisneros Lira J, Aquino-Gálvez A, Pardo A, Selman M. Cigarette Smoke Enhances the Expression of Profibrotic Molecules in Alveolar Epithelial Cells. *PLoS One* 2016; 11(3):e0150383.
44. García de Alba C, Buendía-Roldán I, Salgado A, Becerril C, Ramírez R, González Y, Checa M, Navarro C, Ruiz V, Pardo A, Selman M. Fibrocytes contribute to inflammation

and fibrosis in chronic hypersensitivity pneumonitis through paracrine effects. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191:427-436.

45. Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 2012; 7:562-78.

46. Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* 2013; 14(4):R36.

47. Roberts A, Pimentel H, Trapnell C, Pachter L. Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq. *Bioinformatics* 2011; 27:2325-2329.

48. Chang JT, Nevins JR. GATHER: a systems approach to interpreting genomic signatures. *Bioinformatics* 2006; 22:2926-2933.

49. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:15545-15550.

50. Mendoza-Milla C, Valero Jiménez A, Rangel C, Lozano A, Morales V, Becerril C, Chavira R, Ruiz V, Barrera L, Montaña M, Pardo A, Selman M. Dehydroepiandrosterone has strong antifibrotic effects and is decreased in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2013 Nov;42(5):1309-21.

51. Ramírez G, Hagood JS, Sanders Y, Ramírez R, Becerril C, Segura L, Barrera L, Selman M, Pardo A. Absence of Thy-1 results in TGF- $\beta$  induced MMP-9 expression and confers a profibrotic phenotype to human lung fibroblasts. *Lab Invest*. 2011 Aug;91(8):1206-18

52. Li Z, Liu JY, Zhang JT. 14-3-3 $\sigma$ , the double-edged sword of human cancers. *Am J Transl Res* 2009; 1:326-340.

53. Hermeking H, Benzinger A. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin Cancer Biol* 2006; 16:183-192.

54. McAndrew CW1, Gastwirt RF, Donoghue DJ. The atypical CDK activator Spy1 regulates the intrinsic DNA damage response and is dependent upon p53 to inhibit apoptosis. *Cell Cycle* 2009; 8:66-75.

55. Lu S, Liu R, Su M, Wei Y, Yang S, He S, Wang X, Qiang F, Chen C, Zhao S, Zhang W, Xu P, Mao G. Spy1 participates in the proliferation and apoptosis of epithelial ovarian cancer. *J Mol Histol* 2016; 47:47-57.

56. Lam E, Kilani RT, Li Y, Tredget EE, Ghahary A. Stratifin-induced matrix metalloproteinase-1 in fibroblast is mediated by c-fos and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Invest Dermatol* 2005; 125:230-238.

57. Varma S, Mahavadi P, Sasikumar S, Cushing L, Hyland T, Rosser AE, Riccardi D, Lu J, Kalin TV, Kalinichenko VV, Guenther A, Ramirez MI, Pardo A, Selman M, Warburton D. Grainyhead-like 2 (GRHL2) distribution reveals novel pathophysiological differences between human idiopathic pulmonary fibrosis and mouse models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; 306: L405-L419.

58. Zolak JS, Jagirdar R, Surolia R, Karki S, Oliva O, Hock T, Guroji P, Ding Q, Liu RM, Bolisetty S, Agarwal A, Thannickal VJ, Antony VB. Pleural mesothelial cell differentiation and invasion in fibrogenic lung injury. *Am J Pathol* 2013; 182:1239-1247.

59. Knight MN, Hankenson KD. R-spondins: novel matricellular regulators of the skeleton. *Matrix Biol* 2014; 37:157-161.
60. Nam JS, Park E, Turcotte TJ, Palencia S, Zhan X, Lee J, Yun K, Funk WD, Yoon JK. Mouse R-spondin2 is required for apical ectodermal ridge maintenance in the hindlimb. *Dev Biol* 2007; 311:124-135.
61. Xing Gong, Kendra S. Carmon, Qiushi Lin, Anthony Thomas, Jing Yi, and Qingyun Liu. LGR6 is a high affinity receptor of R-Spondins and potentially functions as a tumor suppressor. *PLoS One* 2012; 7(5):e37137.
62. Hao HX, Xie Y, Zhang Y, Charlat O, Oster E, Avello M, Lei H, Mickanin C, Liu D, Ruffner H, Mao X, Ma Q, Zamponi R, Bouwmeester T, Finan PM, Kirschner MW, Porter JA, Serluca FC, Cong F. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* 2012; 485:195-200.
63. Ling IT, Rochard L, Liao EC. Distinct requirements of wls, wnt9a, wnt5b and gpc4 in regulating chondrocyte maturation and timing of endochondral ossification. *Dev Biol* 2016; 421:219-232.
64. Nalesso G, Thomas BL, Sherwood JC, Yu J, Addimanda O, Eldridge SE, Thorup AS, Dale L, Schett G, Zwerina J, Eltawil N, Pitzalis C, Dell'Accio. WNT16 antagonises excessive canonical WNT activation and protects cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2017; 76:218-226.
65. Onyido EK, Sweeney E, Nateri AS. Wnt-signalling pathways and microRNAs network in carcinogenesis: experimental and bioinformatics approaches. *Mol Cancer* 2016; 15(1):56.
66. Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH. Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *J BiolChem* 2000; 275:23106-23112.
67. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1997; 1:3-11.
68. Porter LA, Dellinger RW, Tynan JA, Barnes EA, Kong M, Lenormand JL, Donoghue DJ. Human Speedy: a novel cell cycle regulator that enhances proliferation through activation of Cdk2. *J Cell Biol* 2002; 157:357-366.
69. Wu C, Qiu S, Lu L, Zou J, Li WF, Wang O, Zhao H, Wang H, Tang J, Chen L, Xu T, Sun Z, Liao W, Luo G, Lu X. RSPO2-LGR5 signaling has tumour-suppressive activity in colorectal cancer. *Nat Commun* 2014; 5:3149.
70. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5(4):a008656.
71. Nagata S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu Rev Immunol*. 2018 Feb 5. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053010. [Epub ahead of print]
72. Romero Y, Bueno M, Ramirez R, Álvarez D, Sembrat JC, Goncharova EA, Rojas M, Selman M, Mora AL, Pardo A. mTORC1 activation decreases autophagy in aging and idiopathic pulmonary fibrosis and contributes to apoptosis resistance in IPF fibroblasts. *Aging Cell* 2016; 15:1103-1112.
73. Im J, Kim K, Hergert P, Nho RS. Idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts become resistant to Fas ligand-dependent apoptosis via the alteration of decoy receptor 3. *J Pathol* 2016; 240:25-37.

74. Ghaffari A, Li Y, Kilani RT, Ghahary A. 14-3-3 sigma associates with cell surface aminopeptidase N in the regulation of matrix metalloproteinase-1. *J Cell Sci* 2010; 123:2996-3005.
75. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramírez R, Barrios R, Pardo A. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 279:L562-L574.
76. Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, Lollini L, Morris D, Kim Y, DeLustro B, Sheppard D, Pardo A, Selman M, Heller RA. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:6292-6297.
77. Yin X, Yi H, Wu W, Shu J, Wu X, Yu L. R-spondin2 activates hepatic stellate cells and promotes liver fibrosis. *Dig Dis Sci* 2014; 59:2452-2461.
78. Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* 2003; 28:105-112.
79. Cui H, Ge J, Xie N, Banerjee S, Zhou Y, Antony VB, Thannickal VJ, Liu G. miR-34a Inhibits Lung Fibrosis by Inducing Lung Fibroblast Senescence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2017; 56:168-178.
80. Tian XF, Ji FJ, Zang HL, Cao H. Activation of the miR-34a/SIRT1/p53 signaling pathway contributes to the progress of liver fibrosis via inducing apoptosis in hepatocytes but not in HSCs. *PLoS One* 2016; 11(7):e0158657.
81. Chavez-Muñoz C, Hartwell R, Jalili RB, Jafarnejad SM, Lai A, Nabai L, Ghaffari A, Hojabrpour P, Kanaan N, Duronio V, Guns E, Cherkasov A, Ghahary A. SPARC/SFN interaction, suppresses type I collagen in dermal fibroblasts. *J Cell Biochem* 2012; 113:2622-2632.
82. Yu G, Kovkarova-Naumovski E, Jara P, Parwani A, Kass D, Ruiz V, Lopez-Otín C, Rosas IO, Gibson KF, Cabrera S, Ramírez R, Yousem SA, Richards TJ, Chensny LJ, Selman M, Kaminski N, Pardo A. Matrix metalloproteinase-19 is a key regulator of lung fibrosis in mice and humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186:752-762.
83. Horikiri T, Hara H, Saito N, Araya J, Takasaka N, Utsumi H, Yanagisawa H, Hashimoto M, Yoshii Y, Wakui H, Minagawa S, Ishikawa T, Shimizu K, Numata T, Arihiro S, Kaneko Y, Nakayama K, Matsuura T, Matsuura M, Fujiwara M, Okayasu I, Ito S, Kuwano K. Increased levels of prostaglandin E-major urinary metabolite (PGE-MUM) in chronic fibrosing interstitial pneumonia. *Respir Med* 2017; 122:43-50.
84. Shimbori C, Bellaye PS, Xia J, Gauldie J, Ask K, Ramos C, Becerril C, Pardo A, Selman M, Kolb M. Fibroblast growth factor-1 attenuates TGF- $\beta$ 1-induced lung fibrosis. *J Pathol* 2016; 240:197-210.
85. Shi Y, Gochuico BR, Yu G, Tang X, Osorio JC, Fernandez IE, Riquez CF, Patel AS, Shi Y, Wathelet MG, Goodwin AJ, Haspel JA, Ryter SW, Billings EM, Kaminski N, Morse D, Rosas IO. Syndecan-2 exerts antifibrotic effects by promoting caveolin-1-mediated transforming growth factor- $\beta$  receptor I internalization and inhibiting transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188:831-841.

## ORIGINAL RESEARCH

### DATA R-spondin-2 Is Upregulated in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Affects Fibroblast Behavior

Adrián Munguía-Reyes<sup>1</sup>, Yalbi I. Baldéras-Martínez<sup>1,2</sup>, Carina Becerril<sup>3</sup>, Marco Checa<sup>1</sup>, Remedios Ramírez<sup>3</sup>, Blanca Ortiz<sup>1</sup>, Jorge Meléndez-Zajgla<sup>4</sup>, Annie Pardo<sup>3</sup>, and Moisés Selman<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico; <sup>2</sup>Cátedra Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) INER; <sup>3</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; and <sup>4</sup>Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico

#### Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is characterized by the expansion of the myofibroblast population, excessive extracellular matrix accumulation, and destruction of the lung parenchyma. The R-spondin family (RSPO) comprises a group of proteins essential for development. Among them, RSPO2 is expressed primarily in the lungs, and its mutations cause severe defects in the respiratory tract. Interestingly, RSPO2 participates in the canonical *Wingless/int1* pathway, a critical route in the pathogenesis of IPF. Thus, the aim of this study was to examine the expression and putative role of RSPO2 in this disease. We found that RSPO2 and its receptor leucine-rich G protein-coupled receptor 6 were upregulated in IPF lungs, where they localized primarily in fibroblasts and epithelial cells. Stimulation of IPF and normal lung fibroblasts with recombinant human RSPO2 resulted in the deregulation of numerous genes, although the transcriptional response was essentially distinct. In IPF fibroblasts, RSPO2 stimulation induced the up- or downregulation of several genes involved in the *Wingless/int1* pathway (mainly from noncanonical signaling). In both normal and IPF fibroblasts, RSPO2

modifies the expression of genes implicated in several pathways, including the cell cycle and apoptosis. In accordance with gene expression, the stimulation of normal and IPF fibroblasts with RSPO2 significantly reduced cell proliferation and induced cell death. RSPO2 also inhibited collagen production and increased the expression of matrix metalloproteinase 1. Silencing RSPO2 with siRNA induced the opposite effects. Our findings demonstrate, for the first time to our knowledge, that RSPO2 is upregulated in IPF, where it appears to have an antifibrotic role.

**Keywords:** idiopathic pulmonary fibrosis; fibroblasts; R-spondin; Wnt pathway; cell cycle

#### Clinical Relevance

This research identifies R-spondin-2 as a novel putative antifibrotic molecule and opens a new therapeutic option for idiopathic pulmonary fibrosis.

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic and usually progressive lung disorder of unknown etiology characterized by epithelial and fibroblast activation, excessive extracellular matrix accumulation, and subsequent destruction of the lung

parenchyma (1, 2). The pathogenic mechanisms remain incompletely understood, but recent evidence suggests that the recapitulation of developmental pathways may play a role (3, 4). Actually, it has been shown that *Wingless/int1*

(WNT) and other embryological signaling pathways are upregulated in IPF lungs and expressed primarily by alveolar epithelial cells and fibroblasts (5–10).

The recently described R-spondin family (RSPO) consists of a group of four

(Received in original form March 24, 2017; accepted in final form January 12, 2018)

Scholarship and financial support was provided by Cátedra Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and Universidad Nacional Autónoma de México (A.M.-R.). Support was also provided by a grant from CONACYT (252624) and a grant from Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia alrededor de Mito y Neurobiología para Biología y Medicina, CONACYT (280317).

Author Contributions: Conception and design: A.M.-R., A.P., and M.S.; RNA sequencing and interpretation: A.M.-R., Y.I.B.-M., J.M.-Z., and M.S.; RT-PCR, Western blot analysis, immunohistochemistry, apoptosis, and analysis and interpretation: A.M.-R., C.B., M.C., R.R., B.O., A.P., and M.S.; and drafting of the manuscript for important intellectual content: A.M.-R., A.P., and M.S.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Moisés Selman, M.D., Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Telégrafos 4602, CP 14060, Mexico City, Mexico. E-mail: mselman@yahoo.com.mx.

This article has a data supplement, which is accessible from this issue's table of contents at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org).

Am J Respir Cell Mol Biol Vol ■■■, Iss ■■■, pp 1–12, ■■■ 2018

Copyright © 2018 by the American Thoracic Society

Originally Published in Press as DOI: 10.1165/ajrcmb.2017-01160C on January 18, 2018

Internet address: [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org)



proteins with essential activities in development (11). Three proteins of the G protein-coupled family (leucine-rich G protein-coupled receptors 4–6 [LGR4, LGR5, and LGR6, respectively]) have been identified as possible receptors. Importantly, the four RSPO family members can activate the canonical Wnt signaling by reducing Wnt receptor turnover and by binding to the LGRs, thereby increasing  $\beta$ -catenin stabilization (12). RSPO2 is expressed primarily in the lungs, and mutations of this protein cause severe defects in the respiratory tract (13). However, to our knowledge, no studies dealing with this molecule in adult lung diseases have been done.

Interestingly, RSPO2 was found to be upregulated in keratinocytes and fibroblasts obtained from keloid scar, a lesion characterized by extensive dermal fibroproliferative growth, suggesting that it might have a role in fibrogenesis (14). On the background of these findings, we hypothesized that RSPO2 could contribute to the fibrotic response in IPF. To prove this, we decided to examine the expression of RSPO2 and its receptor LGR6 in IPF lungs and fibroblasts, and to evaluate the effect of RSPO2 on human normal and IPF lung fibroblasts. Unexpectedly, we found that RSPO2 induces an antifibrotic phenotype in fibroblasts, inhibiting proliferation, inducing apoptosis and decreasing the expression of extracellular matrix molecules.

## Methods

Additional information on the methods of this study are provided in the data supplement.

### RT-PCR

Total RNA was extracted from tissues and fibroblasts using TRIzol reagent (Life Technologies). RNA from control lungs was obtained from Ambion (catalog number AM7968), Agilent Technologies (catalog number 540019), and OriGene Technologies (catalog number HT1009). Applied Biosystems TaqMan probes (Thermo Fisher Scientific) included Hs00179983\_m1 (RSPO2), Hs00663887\_m1 (LGR6), Hs00968567\_s1 ( $\alpha$ -tubulin), Hs00164004\_m1 (collagen, type I,  $\alpha 1$  [C101a]), Hs00172187\_m1 POLR2A, and 18S rRNA (4352930E).

### Immunohistochemistry

Lung localization of RSPO2 and LGR6 was examined by immunohistochemistry (15). Anti-RSPO2 (catalog number ab73761, 1:100 dilution; Abcam) and anti-LGR6 (catalog number ab126747, 1:50; Abcam) monoclonal antibodies were used.

### Next-Generation RNA Sequencing

IPF and normal fibroblasts were stimulated with recombinant human R-spondin-2 (rhRSPO2) (catalog number 3266-RS, 10 ng/ml; R&D Systems) in serum-free Ham's F-12 medium for 24 hours, and total RNA was extracted using TRIzol reagent. RNA-sequencing (RNA-seq) libraries were constructed using the TruSeq RNA Library Prep Kit (Illumina) for sample preparation (16). Massive RNA sequencing was performed using the NextSeq 500 System (Illumina). The data were analyzed with the TopHat2, Cufflinks, and Cuffdiff2 open code tools (17–19) to obtain the genes with significant differential expression ( $\geq 1.5$ -fold change; corrected  $P < 0.05$ ). These genes were ranked and analyzed by using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (QIAGEN Bioinformatics; www.ingenuity.com), GATHER genome analysis (<http://gathergenome.duke.edu/>), and gene set enrichment analysis (20, 21).

### WNT Array

WNT-related genes were measured using the TaqMan Array Human WNT Pathway (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions (22).

### Western Blot Analysis

Cell extracts and serum-free conditioned media were obtained from fibroblasts stimulated with rhRSPO2 (10 ng/ml). Twenty micrograms of protein from total extracts and 12  $\mu$ g from media were separated by electrophoresis on SDS-PAGE gels, transferred to nitrocellulose membranes, and incubated with anti-14-3-3 $\sigma$  (statin, 1:1000, catalog number ab14123; Abcam), anti-procaspase-3 (1:500 catalog number 622701; BioLegend), WNT16 (1:1000, catalog number ab109437; Abcam), and anti-matrix metalloproteinase (MMP)-1 (2  $\mu$ g/ml, catalog number ab8929; Abcam) antibodies. Secondary antimouse IgG or antirabbit IgG antibodies were used for detection (Life Technologies).  $\beta$ -Tubulin or  $\beta$ -actin (1:500; Santa Cruz

Biotechnology) was used to test equal loading.

### Growth Rate Assay

Fibroblasts ( $10 \times 10^5$ ) were seeded into 96-well culture plates. After 24 hours, the medium was replaced by medium supplemented with 2% FBS alone or with rhRSPO2 (10 or 100 ng/ml), and fibroblasts were maintained in culture for 24 or 48 hours. Cell growth was determined using WST-1 (Boehringer Mannheim) (10). In parallel experiments, fibroblasts were pretreated with the WNT inhibitor IWP-2 (Selleckchem) for 24 hours and stimulated with RSPO2 (10 or 100 ng/ml) for 24 or 48 hours. IWP-2 inactivates Porcn (porcupin O-acetyltransferase), a membrane-bound O-acetyltransferase, and selectively inhibits palmitoylation of Wnt. IWP-2 blocks Wnt-dependent phosphorylation of the Lrp6 (low-density lipoprotein-related protein 6) receptor and Dvl2 (dishevelled segment polarity protein 2), and  $\beta$ -catenin accumulation.

### Cell Proliferation Assay

Fibroblast proliferation was measured using the CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions (23).

### Apoptosis Assay

Fibroblasts were stimulated with 10 ng/ml rhRSPO2 for 24 hours and stained with Annexin V-FITC (BD Pharmingen) for flow cytometric analysis. Cells were acquired using a FACSAria flow cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo 7.8 software (FlowJo).

### Collagen Detection

Soluble collagen was quantified in cell-conditioned media using the Sircol assay (Biocolor Ltd.) (24).

### Cell Transfection

Fibroblasts were transfected with 2  $\mu$ g of RSPO2 shRNA plasmid (catalog number sc-76307-SH; Santa Cruz Biotechnology) or with 2  $\mu$ g of shRNA plasmid (catalog number Sc-108060; Santa Cruz Biotechnology) encoding a scrambled shRNA sequence as a negative control using the Amasa Basic Nucleofector Kit for Primary Mammalian Fibroblasts (Lonza) according to the manufacturer's instructions.



**Statistical Analysis**

Results are presented as mean  $\pm$  SD. Differences were analyzed by Mann-Whitney *U* test. Probability values less than 0.05 were considered statistically significant.

**Results****RSPO2 and Its Receptor LGR6 Are Overexpressed in IPF Lungs and Localize in Epithelial Cells and Fibroblasts**

We first investigated whether there were differences between IPF and control lungs in the gene expression of RSPO2 and its

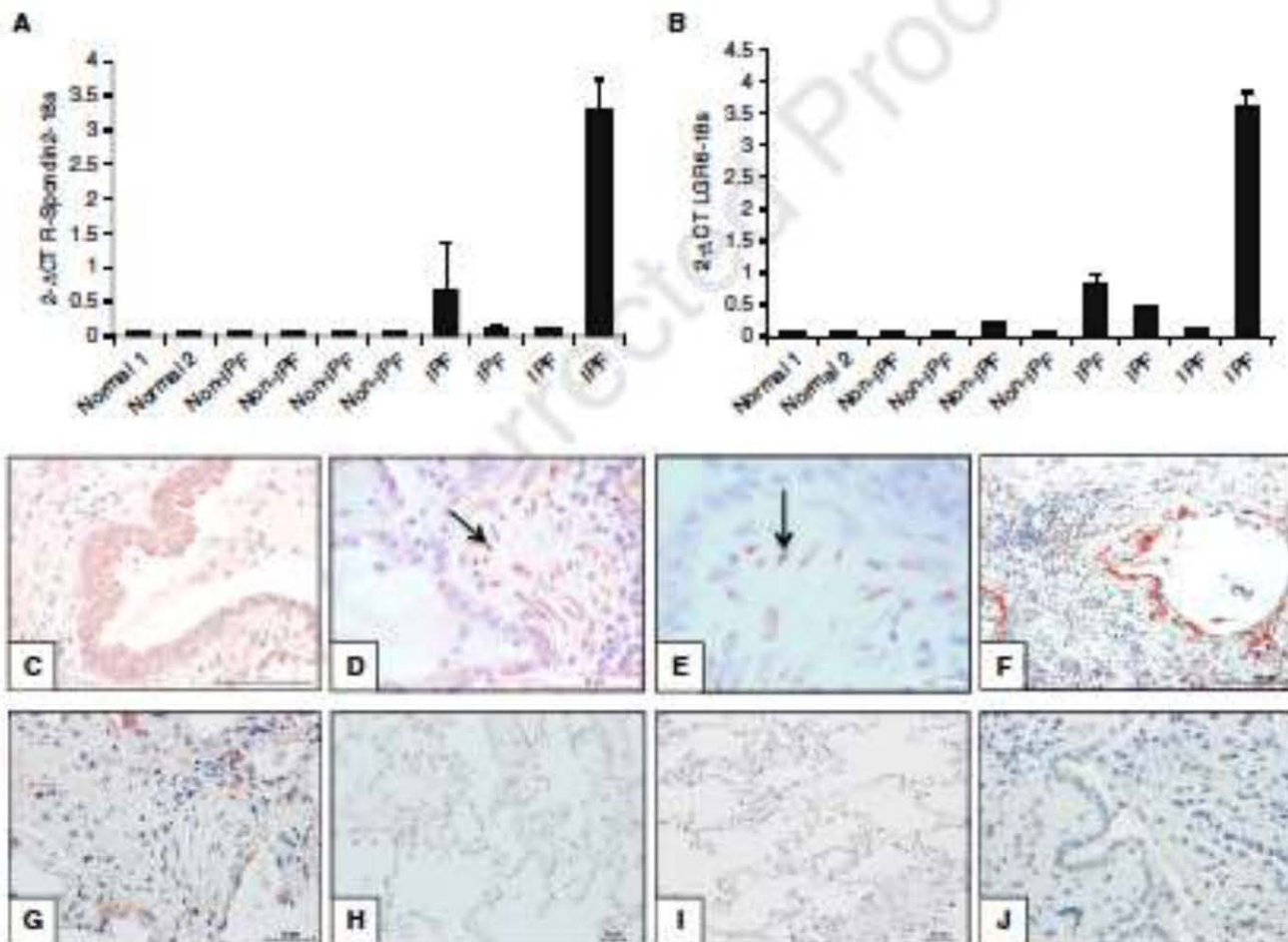
receptor LGR6. For this purpose, both genes were quantified by qRT-PCR in IPF ( $n = 4$ ) and non-IPF fibrotic tissues ( $n = 4$ ; two with chronic hypersensitivity pneumonitis and two with lung fibrosis associated with autoimmune diseases). RNA from two normal lungs was used as a control. As shown in Figures 1A and 1B, both genes were highly expressed in IPF lungs whereas virtually no signal was observed in normal human lungs or in tissues from non-IPF interstitial lung diseases.

We next examined the cell localization of RSPO2 and its receptor LGR6 by immunohistochemistry. As illustrated in Figure 1 (bottom panels), both immunoreactive proteins were

found mainly in fibroblast foci and bronchiolar and alveolar epithelial cells in the IPF lungs. Neither RSPO2 nor LGR6 was observed in normal lung tissues, corroborating the gene expression results.

**RSPO2 Gene Expression Is Upregulated in IPF Fibroblasts**

Fibroblasts/myofibroblasts from fibroblastic foci play a critical role in IPF lung remodeling. Because RSPO2 protein was expressed by these cells *in vivo*, we next decided to examine its expression *in vitro*. The gene expression of RSPO2 was quantified using qRT-PCR in fibroblasts derived from IPF ( $n = 5$ ) and normal ( $n = 3$ )



**Figure 1.** R-spondin-2 (RSPO2) and leucine-rich G protein-coupled receptor 6 (LGR6) are upregulated in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) lungs and localize in fibroblasts and epithelial cells. Gene expression of (A) RSPO2 and (B) its receptor LGR6 was quantified by RT-PCR in total RNA obtained from four IPF lungs, four non-IPF lungs, and two normal lungs. Data (mean  $\pm$  SD) are expressed using the comparative cycle threshold ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) method normalized with 18S. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . (C–J) RSPO2 and LGR6 immunolocalization in IPF and normal lungs. Strong cytoplasmic red staining of immunoreactive (C, D, and F) RSPO2 and (F and G) LGR6 is observed in epithelial cells and fibroblasts (black arrows) of IPF tissues. No staining was detected in normal lungs for either (H) RSPO2 or (I) LGR6. (J) Nonimmune serum was used as a negative control. The figure exemplify the results of four IPF and three normal tissues.

human lungs. As illustrated in Figure 2A, RSPO2 was significantly increased in IPF fibroblasts compared with control lungs ( $P < 0.05$ ). By contrast, the expression of the receptor LGR6 was heterogeneous, and no differences were found (Figure 2B). Together, these results reveal that during the development of IPF, RSPO2 is strongly upregulated in IPF lungs and fibroblasts.

#### RSPO2 Modifies the Whole-Genome Expression Profile in IPF and Normal Human Lung Fibroblasts

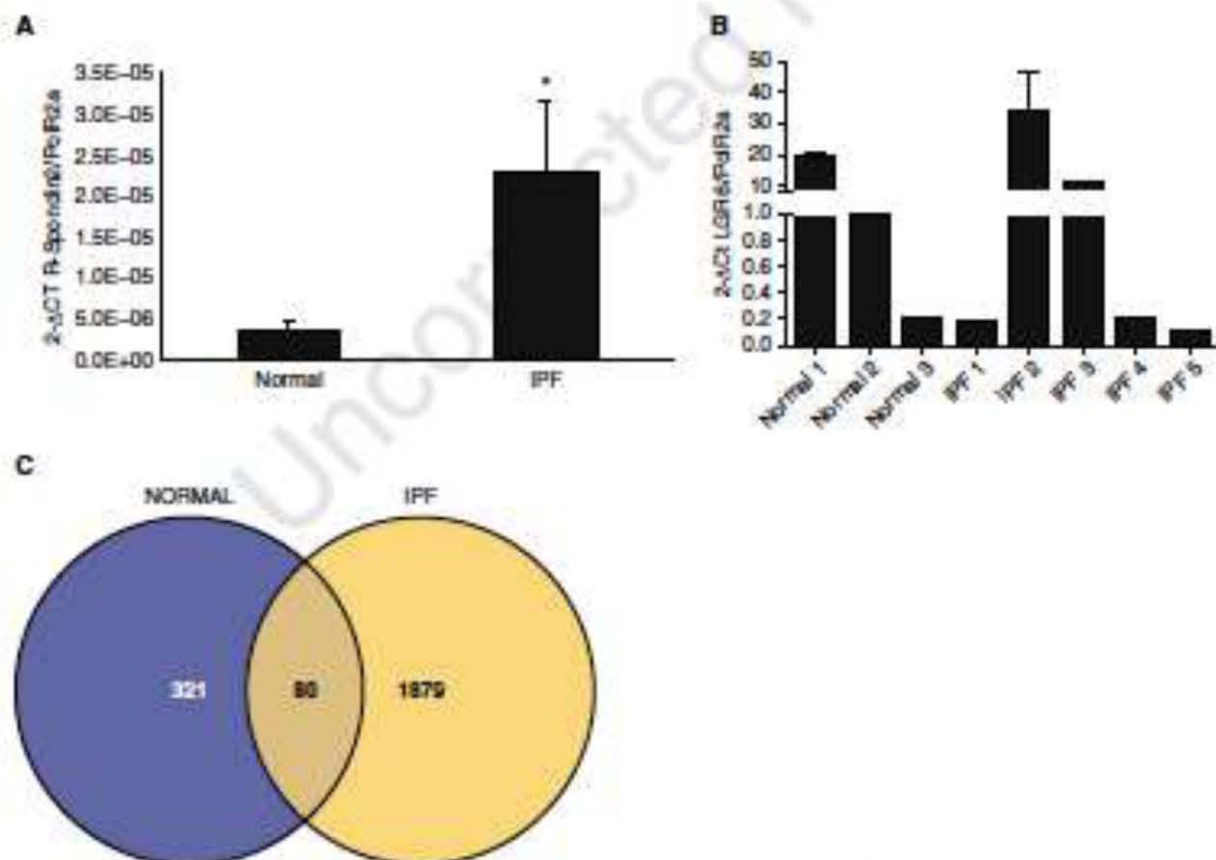
To obtain mechanistic insight into the putative role of RSPO2, fibroblasts derived from IPF and normal human lungs of similar age and passages, and selected by higher expression of the receptor LGR6, were stimulated with the recombinant protein (10 ng/ml) and evaluated by RNA-seq-based expression profiling analysis

using a widely used protocol (17). Using expression levels of greater than or equal to 1.5-fold change as an arbitrary cutoff, we found that rhRSPO2 modified the expression of almost 1,960 genes in IPF fibroblasts (1,540 upregulated) and 400 in normal lung fibroblasts (214 upregulated) (Figure 2C), as well as that the transcriptional response was essentially distinct.

A list of differentially expressed genes from RNA-seq analysis was used as the input for IPA and gene set enrichment analysis to determine enriched pathways. We found that, among others, rhRSPO2 modifies the expression of genes involved in WNT signaling (primarily from the non-canonical pathway) in IPF fibroblasts, as well as genes implicated in the cell cycle and apoptosis in both normal and IPF fibroblasts (Table 1).

#### RSPO2 Modifies Expression of Genes Belonging to WNT Pathway

It is well known that RSPO binding to LGR family receptors facilitates WNT pathway activation by stabilization of WNT (co)receptors. However, whether RSPO2 increases the expression of WNT ligands is unclear. Therefore, to corroborate the changes observed by RNA-seq, we quantified the gene expression of WNT family members and modifiers of WNT signaling, including members of the Frizzled G protein-coupled receptor family, the DV1 family, and the secreted frizzled-related family, by using the Applied Biosystems TaqMan Array Human WNT Pathway using DataAssist Software v3.01 (Thermo Fisher Scientific). Our results showed that rhRSPO2 modifies the expression of several genes from the WNT pathway only in IPF fibroblasts, mainly those involved in the noncanonical



**Figure 2.** RSPO2 is upregulated in IPF-derived fibroblasts. (A) Gene expression of RSPO2 was quantified by RT-qPCR in total RNA from five IPF and three normal fibroblasts. Data are expressed as mean  $\pm$  SD, calculated using the comparative cycle threshold ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) method normalized with RNA polymerase II subunit A (PoP2a). \* $P < 0.05$ . (B) No differences were observed in the expression of leucine-rich G protein-coupled receptor 6 (LGR6). (C) Representational overlap of the microarray profile of gene probes that were differentially expressed (up- or downregulated  $> 1.5$ -fold) after recombinant human RSPO2 stimulation of IPF and normal fibroblasts.



**Table 1.** Recombinant Human R-Spondin-2 Modifies Expression of Genes Involved in Wntless/Int1, Cell Cycle, and Apoptosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Normal Fibroblasts

	Normal Lung Fibroblasts	IPF Fibroblasts
WNT		WNT5B (1.6), WNT9A (1.6), WNT16 (2.15), DKK1 (1.81), FZD5 (1.68), FZD8 (2.22), WISP2 (2.03)
Cell cycle	CDC45 (1.9), CDC20 (18.9), SPDYA (-24), CDCA7 (-2.39)	CDC20 (2.68), CDC25A (1.85), CDC25C (2.4), CDC34 (1.66), CDC37 (1.59), CDC45 (3.35), CDC6 (2.24), CDCA3 (1.78), CDCA4 (1.82), CDCA5 (2.39), CDCA7 (4.04), CDCA8 (2.18), SPN (4.5)
Apoptosis	AFTD1-CORT (2.83), BCL2 (-2.17), BAG5 (-1.83)	SPN (64.5), AEN (1.52), AIFM2 (1.72), CASP5 (24.7), NAF1 (1.56), SIVA1 (1.65), THAP3 (1.79)

**Definition of abbreviations:** AEN=apoptosis-enhancing nuclease; AIFM2=apoptosis-inducing factor, mitochondria associated 2; AFTD1-CORT=apoptosis-inducing, TATA-box binding protein-associated factor 9-like domain and cortactin; BAG5=Bcl-2-associated athanogene family protein 5; BCL2=B-cell lymphoma 2; CASP5=caspase-5; CDC=cell division cycle; CDCA=cell division cycle-associated protein; DKK1=dishevelled/Wnt signaling pathway inhibitor 1; FZD=Frizzled; IPF=idiopathic pulmonary fibrosis; NAF1=nuclear apoptosis-inducing factor 1; SPN=stratiferin; SPDYA=Speedy/RINGO cell cycle regulator family member A; THAP3=THAP domain-containing protein 3; WISP2=Wnt1-inducible signaling pathway protein 2; WNT=Wntless/Int1.

Fold changes are shown in parentheses.

pathway (Figure 3A). Thus, confirming our RNA-seq results, WNT5b, WNT9A, and WNT16 were overexpressed. To further corroborate these data, we evaluated the protein expression of WNT16. As shown in Figure 3B, stimulation of IPF fibroblasts with RSPO2 increased the expression of WNT16 at the protein level. In contrast, WNT16 was not found in normal human lung fibroblasts. In addition, DVL1 and DKK2 (dishevelled Wnt signaling pathway inhibitor 2) were also upregulated, whereas WNT11 and WISP1 (Wnt1-inducible signaling pathway protein 1) were downregulated (Figure 3A). Together, these results reveal that rhRSPO2 deregulates the expression of several proteins involved in Wnt signaling in IPF fibroblasts but has no effect on normal human lung fibroblasts.

#### RSPO2 Modifies Expression of Genes Involved in the Cell Cycle

Several cell cycle-related genes were dysregulated by RSPO2 in both normal and IPF fibroblasts, suggesting that they may modulate proliferation and cell death. As illustrated in Table 1 and Figure E1 in the online supplement, one of the most highly upregulated genes found by RNA-seq in IPF fibroblasts was stratiferin (SPN-14-3-3 $\alpha$  protein), a strong negative regulator of cell cycle progression (25, 26). This finding was validated by qRT-PCR, which demonstrated that RSPO2 increases the expression of stratiferin in IPF fibroblasts but not in normal lung fibroblasts (Figure 3C). The upregulation of stratiferin was further confirmed at the protein level in three

different IPF fibroblasts by Western blot analysis (Figure 3D). Likewise, one of the most downregulated genes in normal lung fibroblasts was Speedy/RINGO cell cycle regulator family member A (SPDYA) (Table 1). Inhibition of this gene reduces cell proliferation and induces apoptosis (27, 28). These results show that RSPO2 affects several (although different) genes implicated in cell proliferation and death in both normal and IPF fibroblasts, indicating that it may inhibit proliferation and enhance apoptosis.

#### RSPO2 Reduces Cell Growth

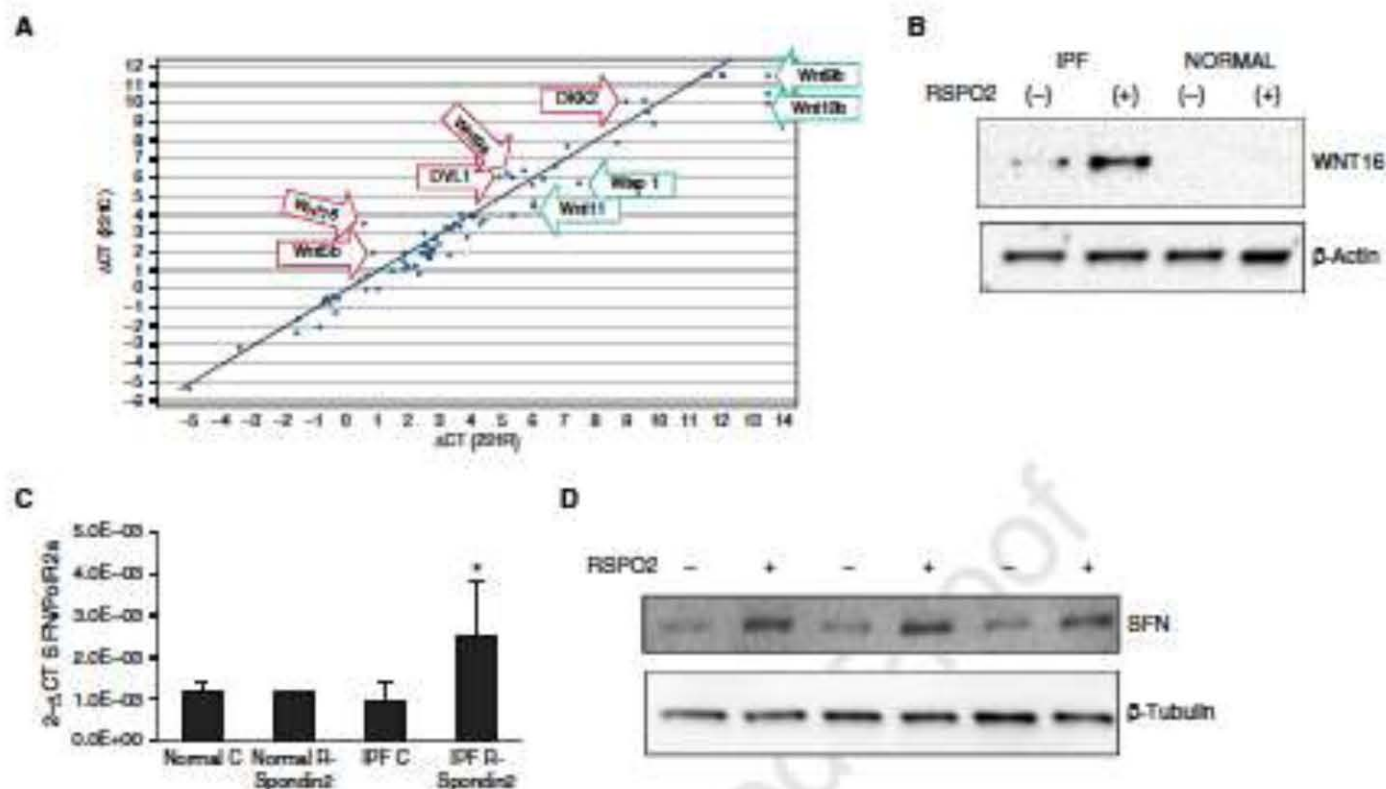
The cell cycle-related genes that were found to be either upregulated or downregulated in the network indicated that RSPO2 may have an antiproliferative activity on normal and IPF lung fibroblasts. Thus, we decided to determine whether RSPO2 has an inhibitory effect on fibroblast proliferation *in vitro*. We first examined several concentrations of RSPO2 (1, 10, and 100 ng/ml) (Figure E2) and found that the best response was obtained with the last two doses. Hence, we stimulated normal and IPF fibroblasts with recombinant RSPO2 (10 and 100 ng/ml) and examined cell growth by WST-1 assay. We found that stimulation with rhRSPO2 in three IPF and three normal human lung fibroblasts significantly reduced cell growth at 24 and 48 hours (Figures 4A and 4B). To test whether this effect was Wnt dependent, in parallel experiments fibroblasts were treated first with IWP-2 to inhibit activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. As

shown in Figures 4C and 4D, IWP-2 marginally decreased cell growth at 48 hours but did not affect the inhibitory effect of RSPO2. To further test whether RSPO2 stimulation has antiproliferative effects, the proliferation rate was also determined in normal and IPF fibroblasts by CyQUANT Cell Proliferation Assay using 10 ng/ml RSPO2. A strong reduction of fibroblast proliferation was also observed in both IPF and normal fibroblasts, which was not modified by the pretreatment with the Wnt inhibitor (Figures 4E and 4F).

#### RSPO2 Induces Lung Fibroblast Apoptosis

IPA showed that RSPO2 also modifies different genes involved in apoptosis. For example, in IPF fibroblasts, in addition to stratiferin, RSPO2 induced strong increases of other proapoptotic genes, such as the caspase-5 gene (CASP5). In normal lung fibroblasts, RSPO2 reduced the expression of the antiapoptotic genes BCL2 (B-cell lymphoma 2) and BAG5 (Bcl-2-associated athanogene family protein 5), whereas it induced the expression of the proapoptotic AFTD1 and CORT genes. To test whether these changes resulted in proapoptotic activity, we measured cell death in two IPF and two normal human lung fibroblast cell lines by annexin V/propidium iodide (PI) assay on a flow cytometer. As illustrated in Figure 5, RSPO2 significantly increased early (annexin V-positive/PI-negative, lower right quadrant) and late (upper right quadrant) fibroblast apoptosis in both normal and IPF fibroblasts. To further





**Figure 3.** Recombinant human RSPQ2 modifies the expression of several genes involved in the Wnt/PCP1 (WNT) signaling pathway and cell cycle. (A) IPF fibroblasts were stimulated with recombinant human RSPQ2, and the expression of 92 genes from the WNT pathway was measured by qPCR using the TaqMan Array Human WNT Pathway. Red arrows indicate some upregulated genes, and green arrows point to some downregulated genes. (B) Western blots confirm the increase of WNT16 in IPF fibroblasts at the protein level. (C) Gene expression of stratifin (SFN) quantified by RT-qPCR corroborated the effect of RSPQ2 on SFN gene expression observed by RNA sequencing in IPF fibroblasts. Mean  $\pm$  SD data of three independent experiments are shown. Data are expressed using the comparative cycle threshold ( $2^{-\Delta CT}$ ) method normalized with RNA polymerase II subunit A (PuR12a). \* $P < 0.05$ . (D) RSPQ2 increases the expression of SFN at the protein level. The protein was analyzed by Western blotting of three IPF fibroblast primary cultures using  $\beta$ -tubulin to test equal loading. The figures correspond to different parts of the same gel. Densitometric and image analyses were performed with Image Lab software (Bio-Rad Laboratories). \* $P < 0.01$ . DKO2 = dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2; DVL1 = dishevelled segment polarity protein 1; Wtp1 = WNT1-inducible signaling pathway protein 1.

corroborate this finding, we measured cleaved (active) caspase-3 by Western blotting. As shown in Figure 5D, RSPQ2 treatment increased the expression of procaspase-3 and active caspase-3 in both normal and IPF fibroblasts. Taken together, these results indicate that RSPQ2 has strong antiproliferative and proapoptotic effects on normal human lung and IPF fibroblasts.

#### RSPQ2 Reduces Collagen Production and Increases Expression of MMP-1

Because RSPQ2 displayed putative antifibrotic functions, reducing fibroblast proliferation and inducing cell death, we further investigated whether it also had an effect in collagen production. For this purpose, normal and IPF fibroblasts were stimulated with RSPQ2 for 24 hours; the expression of Col1a1 was examined by RT-PCR; and the production of collagens was

measured by Sircol assay in the conditioned medium. As illustrated in Figure 6A, RSPQ2 significantly decreased the expression of Col1a1 in both IPF and normal lung fibroblasts. Likewise, normal and IPF fibroblasts stimulated with RSPQ2 showed a significant reduction in the total amount of secreted soluble collagen from  $11.9 \pm 1.6\%$  to  $4.0 \pm 2.7\%$  per microgram of protein ( $P < 0.01$ ; normal fibroblasts) and from  $12.4 \pm 6.0\%$  to  $3.6 \pm 1.8\%$  per microgram of protein ( $P < 0.05$ ; IPF fibroblasts) (Figures 6B and 6C).

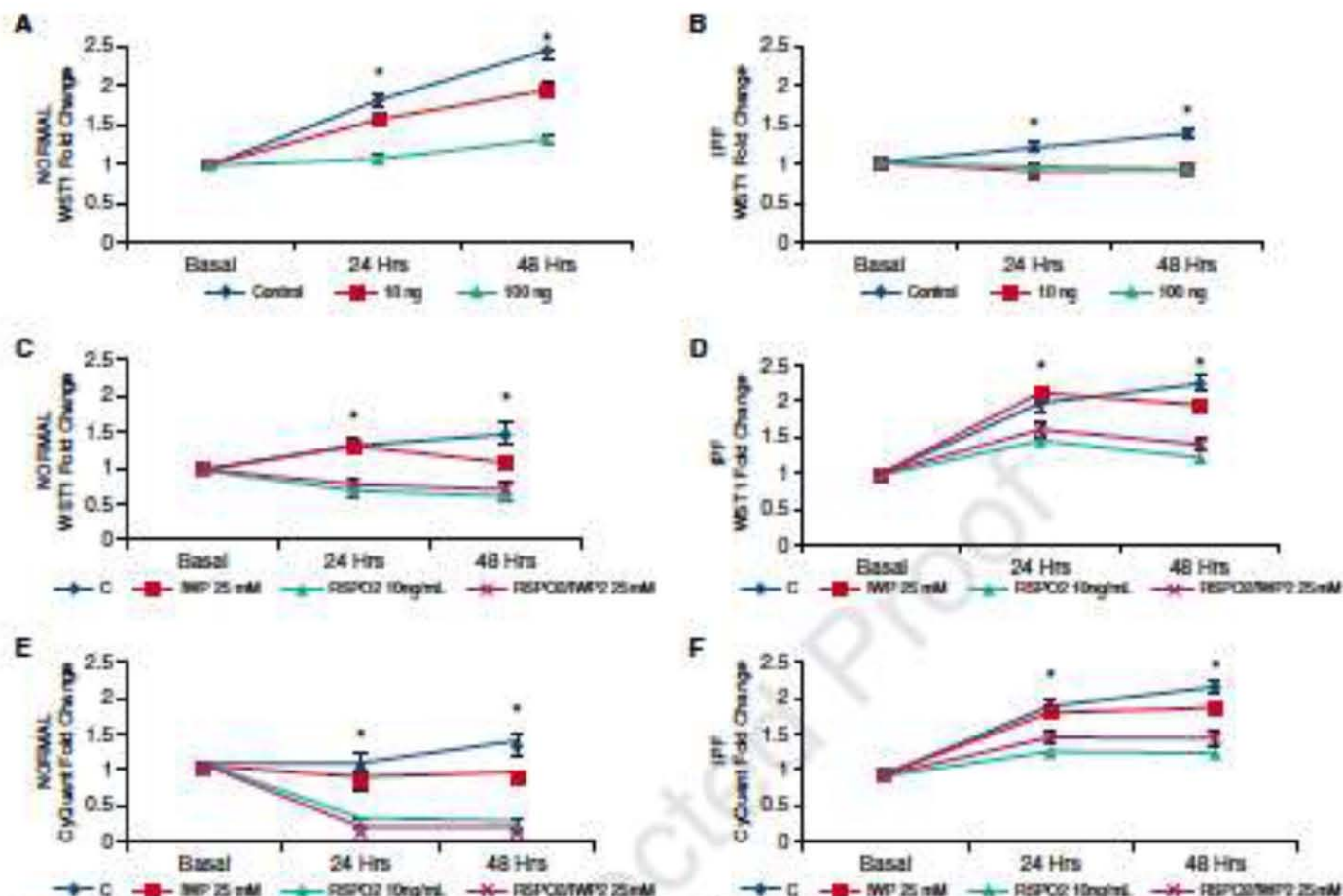
It has previously been shown that stratifin, a highly upregulated gene in RSPQ2-treated IPF fibroblasts, stimulates the expression of MMP-1, a major fibrillar collagen-degrading enzyme (29). Therefore, we also examined the effect of 10 ng/ml of purified recombinant RSPQ2 on induction of MMP-1 in IPF fibroblasts.

For this purpose, conditioned media adjusted to 12  $\mu$ g of protein concentration were evaluated by Western blot analysis. As shown in Figure 6D, RSPQ2 increased the secretion of MMP-1 into the conditioned media. Altogether, these results support an antifibrotic effect of RSPQ2 in decreasing collagen expression and increasing MMP-1 (fibrillar collagenase) production.

#### Effect of RSPQ2 Silencing on Fibroblast Behavior

To further evaluate the role of RSPQ2 in regulating human lung fibroblast behavior, we silenced the gene by transfecting shRNAs that specifically target the RSPQ2, then we analyzed fibroblast proliferation and the expression of stratifin, collagen, and MMP-1. As illustrated in Figure 7, transfection of fibroblasts with RSPQ2 shRNA was associated with a marked





**Figure 4.** RSPQ2 reduces fibroblast growth rate. In (A) normal and (B) IPF fibroblasts, the growth rate was measured in untreated or RSPQ2-stimulated (10 and 100 ng/ml) cells (passages 4 and 5) using a WST-1 assay at 24 and 48 hours of culture. The data are presented as mean  $\pm$  SD of two independent experiments. (C and D) Fibroblasts (passages 7 and 8) were pretreated with the WNT inhibitor WP-2 for 24 hours and then stimulated with RSPQ2 (10 ng/ml) for 24 or 48 hours. (E and F) The proliferation rate was measured in normal and IPF fibroblasts (passages 7 and 8) stimulated with RSPQ2 (10 and 100 ng/ml) using the CyQUANT reactive assay. Mean  $\pm$  SD data representative of two independent experiments are shown. \* $P < 0.05$ .

increment of fibroblast proliferation compared with fibroblasts transfected with scrambled shRNA (Figure 7A). When RSPQ2-silenced cells or those transfected with control shRNA were treated with 10 or 100 ng/ml RSPQ2, a significant decrease in the growth rate was observed again (Figures 7B and 7C). Finally, RSPQ2-silenced normal and IPF fibroblasts showed effects on gene expression that were opposite to those observed with RSPQ2 stimulation. In IPF fibroblasts, an increase in the expression of collagen (Figure 7D) and a decrease in the expression of stratifin and MMP-1 were observed (Figures 7E and 7F). In normal human lung fibroblasts, an increment of collagen expression without changes in the expression of stratifin or MMP-1 was found (Figures 7G–7I). Therefore, RSPQ2 knockdown enhances

fibroblast activity and proliferation, resulting in a more profibrotic phenotype.

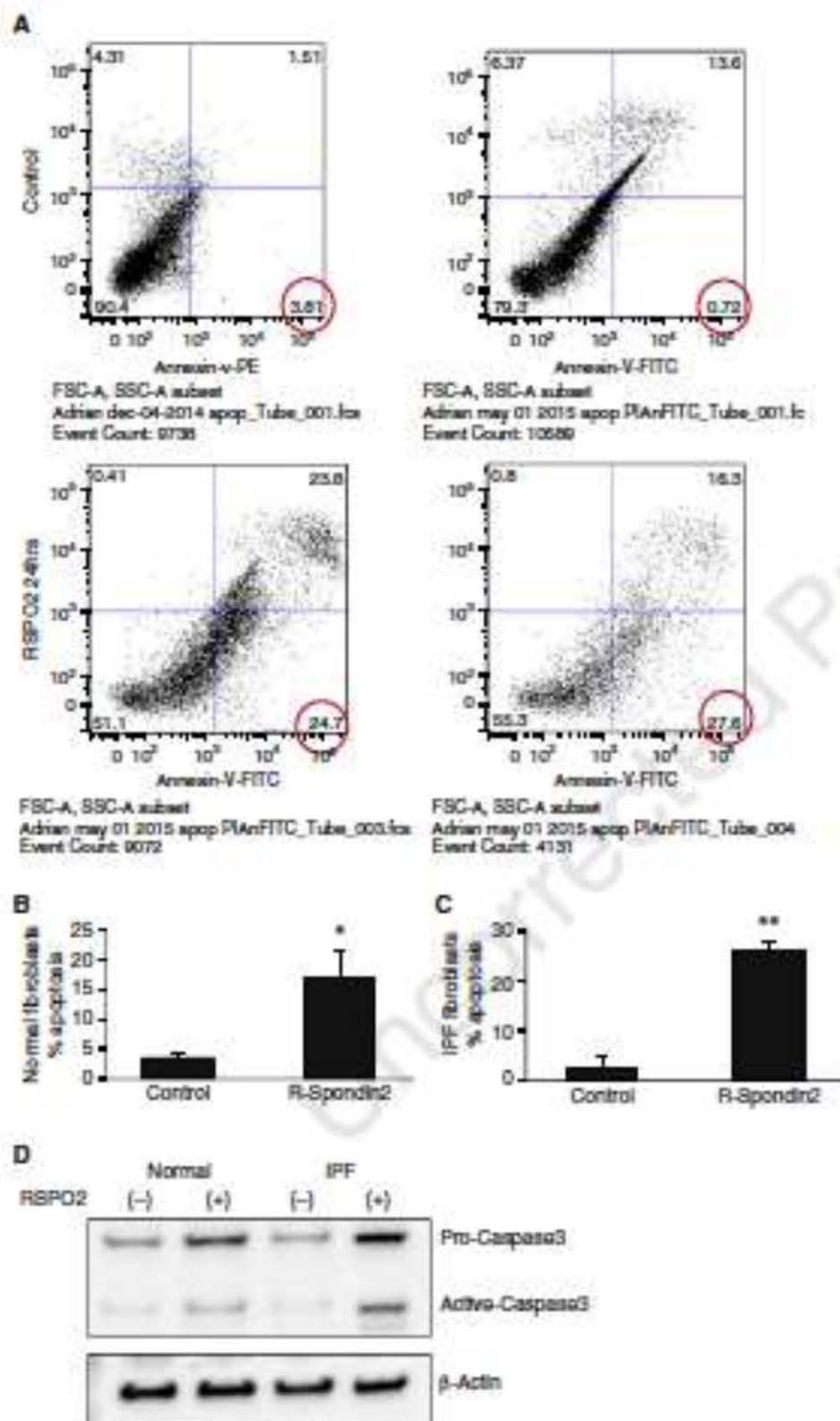
## Discussion

IPF remains a progressive and incurable disease without any treatment that significantly influences the poor survival and quality of life associated with it. Although understanding of the mechanisms involved in the pathogenesis of IPF has improved over the last two decades, the complex altered molecular pathways contributing to this disease have not been clarified. We and others have postulated that the aberrant recapitulation of embryological pathways may play a critical role, and to date a number of them have been found to be deregulated in IPF (3–10).

The RSPQs are a family of four secreted proteins in the thrombospondin type 1 repeat-containing protein superfamily that play an important role during development. It has been suggested that these proteins bind to structural extracellular matrix proteins such as heparan-sulfated proteoglycans, which may define them as matricellular proteins (11). We focused the present study on RSPQ2 because during development, it is strongly expressed in the lungs (13). Moreover, it has been shown that a deficiency of RSPQ2 in mice is lethal postnatally, suggesting that RSPQ2 has functions that are nonredundant from the other RSPQ family members (30).

In this study, we first explored the lung expression and cellular localization of RSPQ2 and the receptor LGR6, to which RSPQ2 binds specifically and with highest





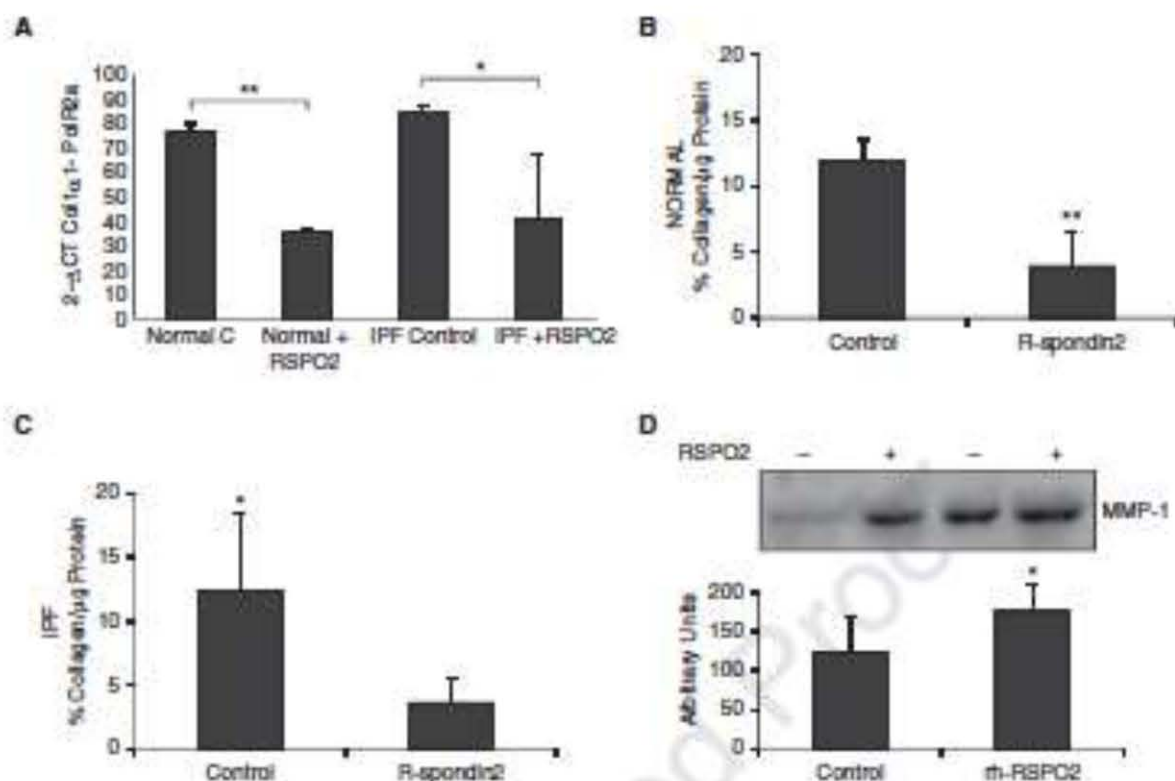
**Figure 5.** RSPO2 induces apoptosis in IPF and normal human lung fibroblasts. Cell death was measured in normal and IPF fibroblasts stimulated with recombinant human RSPO2 (10 ng/ml) for 24 hours. Apoptosis was monitored after labeling with fluorescently labeled annexin V and propidium iodide. (A) Scatterplot of flow cytometric analysis demonstrating increased annexin V staining in RSPO2-treated normal and IPF fibroblasts. (B) Average of two independent experiments with normal fibroblasts. \* $P < 0.05$ . (C) Average of three independent experiments with IPF fibroblasts.

affinity (31). We found that the gene expression of both molecules was strongly upregulated in IPF tissues and that the immunoreactive proteins localized to fibroblasts and epithelial cells. In contrast, RSPO2 and LGR6 were virtually absent from normal lungs. RSPO2 was also overexpressed in IPF fibroblasts.

Next, we evaluated, through RNA- analysis, the changes in the transcriptional profile induced by RSPO2 signaling, and we found that this protein provokes profound fibroblast reprogramming, mostly in IPF fibroblasts. The WNT signaling pathway, cell cycle, and apoptosis were identified as the most significantly deregulated pathways. Of particular interest was the dysregulation of WNT, first because it was observed only in IPF fibroblasts and second because it is well known that RSPOs are activators of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by promoting stability of WNT receptors, LRP6 (low-density lipoprotein-related protein), and Frizzled (32). Unexpectedly, however, we found that the changes were related mostly to noncanonical pathways (also referred to as  $\beta$ -catenin-independent pathways). Thus, WNT5b was upregulated while WNT11 was downregulated. Also, the putative noncanonical WNT9A (33), was overexpressed, as well as WNT16 that mediates signaling via canonical or noncanonical pathways, but may act as an inhibitor of the canonical WNT pathway preventing its excessive activation (34). Furthermore, WNT-induced secreted protein 1 (WISP1/CCN4), a member of the CCN (cysteine-rich angiogenic inducer 61, connective tissue growth factor, nephroblastoma overexpressed) protein family that functions as a downstream factor of the canonical WNT signaling pathway was also decreased.

Of note, noncanonical WNT signaling has been reported to antagonize the  $\beta$ -catenin-dependent WNT pathway (35). On one hand, taken together, these findings suggest that stimulation of IPF fibroblasts with RSPO2 induces changes mainly in noncanonical WNT signaling but have no effect on normal human lung fibroblasts. On the other hand, the transcriptional signature induced by RSPO2 indicated an effect on fibroblast growth, likely inducing cell cycle arrest and apoptosis in both IPF and normal lung fibroblasts. In the case of IPF fibroblasts, we focused on stratifin (also called 14-3-3 $\sigma$ ), a gene not previously





**Figure 6.** R-spondin-2 (RSPO2) reduces collagen production and increases MMP-1 secretion. (A) Normal and IPF fibroblasts were stimulated with 10 ng/ml RSPO2, and collagen expression was determined by qRT-PCR normalized with RNA polymerase II subunit A (PolR2A). (B and C) Collagen production was measured in cell-conditioned media with the colorimetric Sircol collagen assay. Results are expressed as the percentage of collagen per microgram of protein in two independent experiments. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ . Each independent experiment was performed with two IPF or two normal fibroblast lines. (D) The concentration of MMP-1 was measured by Western blotting in conditioned media from IPF fibroblasts stimulated with 10 ng/ml RSPO2 for 24 hours. Twelve micrograms of total protein was changed in each lane.  $2^{-\Delta CT}$  = comparative cycle threshold method.

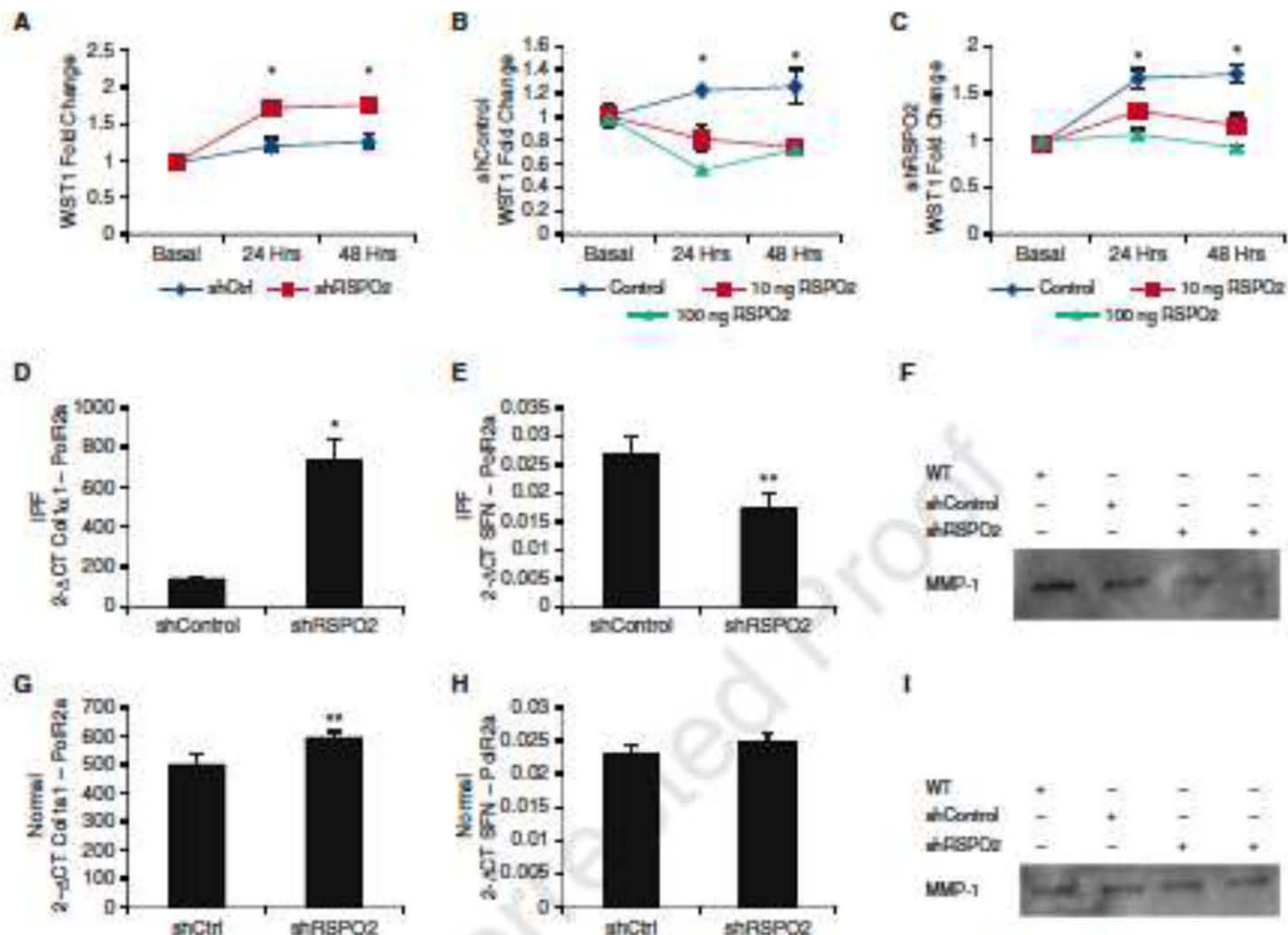
associated with RSPOs, and found that it exhibited a 64-fold increase after RSPO2 stimulation. Stratifin is a potent cell cycle regulator that inhibits the activity of Cdk2 (cyclin-dependent kinase 2)/cyclin E, inducing cell cycle arrest at the G<sub>1</sub> phase, and also sequesters Cdc2 (cell division cycle protein 2)/cyclin B to cytoplasm to induce G<sub>2</sub> arrest (36, 37).

Regarding normal human lung fibroblasts, one of the most down-regulated genes after RSPO2 stimulation was SPDYA (also known as SPY1), which allows cells to evade checkpoints and apoptosis, enhancing proliferation and decreasing programmed cell death (28, 29). Abrogation of SPDYA expression using siRNA supported the notion that this gene is a critical component of cell proliferation pathways (38).

Consistent with these findings, we found, using two different methods, that RSPO2 strongly decreases cell proliferation in both IPF and normal lung fibroblasts. This effect appeared to be independent of WNT signaling because the changes in WNT expression were observed only in IPF fibroblasts, whereas the functional effect was found in both IPF and normal fibroblasts. Moreover, a pan-inhibitor of WNT has no effect on the decreased proliferation induced by RSPO2. Further supporting these findings, RSPO2-silenced fibroblasts showed an increase in proliferation, which was again inhibited by RSPO2 treatment. Similar results have recently been reported in human colorectal cancers, where RSPO2 showed a strong inhibitory effect on cell proliferation (39).

Also, importantly, several proapoptotic genes were upregulated. For example, in IPF fibroblasts, RSPO2 strongly increased caspase-5, which also plays a role in inflammatory response (40), whereas in normal lung fibroblasts, it decreased BCL2, a major regulator of the apoptotic process. It also increased the expression of APITD1-CORT, which represents naturally occurring read-through transcription between the neighboring APITD1 (apoptosis-inducing TATA-box binding protein-associated factor 9-like domain) and CORT (cortistatin) genes. This likely proapoptotic effect of RSPO2 was corroborated in IPF and normal lung fibroblasts, where it induced a marked increase of cell death, as determined by annexin V/PI staining and caspase-3

**Figure 5 (Continued).** \*\* $P < 0.01$ . Each independent experiment was performed with two different fibroblast lines. (D) Western blot analysis for detection of caspase-3. Whole-cell lysates from normal and IPF fibroblasts were immunoblotted with caspase-3 and housekeeping gene  $\beta$ -actin antibodies. RSPO2 (10 ng/ml) induced an increase in protein expression of procaspase-3 and caspase-3. FSC-A = forward scatter area; PE = phycoerythrin; SSC-A = side scatter area.



**Figure 7.** Effects of shRNA-mediated RSPQ2 silencing. Normal and IPF fibroblasts were transfected with shRNA that specifically target RSPQ2, and the growth rate and expression of stratifin (SFN), collagen, type I,  $\alpha 1$  (Col1a1), and matrix metalloproteinase (MMP)-1 were examined. (A–C) Growth rate analysis. (A) Fibroblasts transfected with shRNA RSPQ2 showed a higher growth rate than those transfected with scrambled shRNA. (B and C) RSPQ2 treatment significantly decreased the growth rate in fibroblasts transfected with (B) a scrambled shRNA and (C) shRNA RSPQ2. (D and E) Gene expression of Col1a1 and SFN in IPF fibroblasts normalized with RNA polymerase II subunit A (PuR2a). (F) Western blot of MMP-1 in conditioned medium of IPF fibroblasts and decreased in fibroblasts transfected with shRNA RSPQ2. (G and H) Gene expression of Col1a1 and SFN in normal lung fibroblasts normalized with PuR2a. (I) Western blot of MMP-1 in conditioned medium of normal lung fibroblasts. \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.05$ .  $2^{-\Delta\Delta CT}$  = comparative cycle threshold method; WT = wild type.

activity. This effect may represent a significant antifibrotic mechanism because it has been demonstrated that IPF fibroblasts are resistant to apoptosis, which results in their persistence in the damaged areas (2). This process allows maintenance of their persistent phenotype despite apoptosis-inducing environments and in consequence enhancing the exaggerated production of extracellular matrix (41, 42).

Because decreased fibroblast proliferation and increased apoptosis can be considered antifibrotic effects of RSPQ2, we

decided to also investigate its effect on collagen production. Our results showed a decrease in collagen gene expression and in collagen release into the culture medium after the administration of RSPQ2 in both normal and IPF fibroblasts. In addition, we found that RSPQ2 increased MMP-1 production, likely associated with the upregulation of stratifin (43). Currently, the role of MMP-1 in lung fibrosis is uncertain. It is upregulated in IPF lungs, but it is expressed primarily by epithelial cells and not in the fibroblastic foci where collagen accumulation is occurring (44, 45).

In sharp contrast to our findings, Yin and colleagues reported that in hepatic stellate cells (HSCs), RSPQ2 stimulated the proliferation as well as the expression of ACTA2 and collagen type I (46). The reason for these differences is unclear, but HSCs, which are vitamin A-storing cells, have unique features with respect to their cellular origin, morphology, gene expression, and functions (47). Actually, several differences between HSCs and lung fibroblasts have previously been described. For example, whereas miR-34a protects mice from lung fibrosis by promoting fibroblast apoptosis



in the liver, promotes HSC activation, and contributes to radiation-induced fibrosis (48, 49).

Coordinated turnover of the extracellular matrix is crucial in wound healing, and our findings suggest that RSPO2 contributes to the delicate balance between synthesis and degradation of fibrillar collagens, decreasing collagen expression and increasing MMP-1 secretion. Supporting this notion, it has previously been shown that stratifin interacting with SPARC (secreted protein acidic rich in cysteine) induces a significant collagen-inhibiting effect in dermal fibroblasts (50).

Finally, as a proof of concept, we examined the effect of shRNA-mediated RSPO2 knockdown on fibroblast proliferation and on the expression of

collagen and stratifin. We found that loss of function of RSPO2 led to opposing results compared with those observed with RSPO2 stimulation. Thus, RSPO2 silencing resulted in an increase of fibroblast proliferation that was inhibited again after RSPO2 stimulation. Likewise, RSPO2-silenced IPF fibroblasts showed an increase in collagen expression and a decreased expression of stratifin and MMP-1.

In summary, our findings demonstrate that RSPO2 is upregulated in IPF lungs and fibroblasts but that it may function as an antifibrotic mediator. In this context, it is not unusual that antifibrotic molecules can be overexpressed in IPF lungs, where they are likely overwhelmed by the production of a vast diversity of profibrotic factors; some examples include MMP-19, cyclooxygenase 2, fibroblast growth factor 1,

and syndecan-2 (51–54). Together, these data reveal that RSPO2, through a WNT-independent pathway, promotes an antifibrotic fibroblast phenotype, reducing cell proliferation and collagen production and inducing apoptosis, and thus it may represent a potential target for the development of novel antifibrotic therapies ■

**Author disclosures** are available with the text of this article at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org).

**Acknowledgment:** This paper constitutes partial fulfillment of the Doctor en Ciencias del Pagarado en Ciencias Biológicas degree of Adrián Munguía-Freyes from the Universidad Nacional Autónoma de México. Yabli I. Balderras-Martínez gratefully acknowledges her research position within the Cátedra Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología program.

## References

- Raghu G, Rochberg B, Zhang Y, Garcia CA, Azuma A, Behr J, et al.; American Thoracic Society; European Respiratory Society; Japanese Respiratory Society; Latin American Thoracic Association; American Thoracic Society; European Respiratory Society; Japanese Respiratory Society; Latin American Thoracic Association. An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline: treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. An update of the 2011 clinical practice guideline. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192:e3–e19. [Published erratum appears in *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192:644.]
- King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 2011;378:1949–1961.
- Selman M, Pardo A, Kaminski N. Idiopathic pulmonary fibrosis: aberrant recapitulation of developmental programs? *PLoS Med* 2008;5:e82.
- Selman M, López-Otin C, Pardo A. Age-driven developmental drift in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2016;48:538–552.
- Königshoff M, Balsara N, Pfaff EM, Kramer M, Chrobák I, Seeger W, et al. Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* 2008;3:e2142.
- Königshoff M, Kramer M, Balsara N, Wilhelm J, Amels OV, Jahn A, et al. WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2008;118:772–787.
- Oda K, Yatera K, Izumi H, Ishimoto H, Yamada S, Nakao H, et al. Profibrotic role of WNT10A via TGF- $\beta$  signaling in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2016;17:39.
- Vuça LJ, Ben-Yehudah A, Kovarikova-Naumovski E, Orisa T, Gibson KF, Feghali-Bostwick C, et al. WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;41:583–589.
- Cigna N, Fierro M, Moshai E, Brayer S, Marchal-Somme J, Wilmanns-Stavitski L, Fabre A, et al. The hedgehog system machinery controls transforming growth factor- $\beta$ -dependent myofibroblastic differentiation in humans: involvement in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2012;181:2128–2137.
- Bolaños AI, Mills CM, Lira JC, Ramirez R, Checa M, Berra L, et al. Role of Sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;303:L978–L990.
- Knight MN, Hankenson KD. R-spondin: novel matricellular regulators of the skeleton. *Matrix Biol* 2014;37:157–161.
- Feng Q, Gao N. Keeping Wnt signaling in check by vesicular traffic. *J Cell Physiol* 2015;230:1170–1180.
- Bell SM, Schmeier CM, Wert SE, Muzenik ML, Scott WJ, Whitsett JA. R-spondin 2 is required for normal laryngeal-tracheal, lung and limb morphogenesis. *Development* 2008;135:1049–1058.
- Chua AW, Ma D, Qian SJ, Fu Z, Han HC, Song C, et al. The role of R-spondin2 in keratinocyte proliferation and epidermal thickening in keloid scarring. *J Invest Dermatol* 2011;131:844–854.
- García de Alba C, Buendía-Roldán I, Salgado A, Bocanil C, Ramirez R, González Y, et al. Fibrocytes contribute to inflammation and fibrosis in chronic hypersensitivity pneumonitis through paracrine effects. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191:427–438.
- Pruefer F, Vazquez-Santian K, Muñoz-Galindo L, Cruz-Cobin JL, Maldonado V, Meléndez-Zajgle J. TIMP4 modulates ER- $\alpha$  signaling in MCF7 breast cancer cells. *Folia Biol (Praha)* 2016;62:75–81.
- Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and cufflinks. *Nat Protoc* 2012;7:562–578.
- Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimental H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Bioinformatics* 2013;29:1836–1842.
- Roberts A, Pimental H, Trapnell C, Pachter L. Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq. *Bioinformatics* 2011;27:2325–2329.
- Cheng JT, Nevins JR Jr. GATHER: a systems approach to interpreting genomic signatures. *Bioinformatics* 2008;22:2926–2933.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:156–161.
- Barts D, Coangco V, Welch A, Kiss E, Barke S, Kovacs T, et al. Down-regulation of canonical and up-regulation of non-canonical Wnt signaling in the carcinogenic process of squamous cell lung carcinoma. *PLoS One* 2013;8:e67393.
- Narayanas DM, Nguyen MN, Wood SA. Deubiquitinating enzyme, USP9X, regulates proliferation of cells of head and neck cancer lines. *Cell Prolif* 2016;49:494–502.
- Vang A, Clements RT, Chidigar H, Kuo N, Alawzi A, O'Connell K, et al. Effect of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor activation on cardiac fibroblasts: a mechanism underlying RV fibrosis associated with cigarette smoke exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2017; 312:L748–L759.
- Li Z, Liu JY, Zhang JT. 14-3-3 $\alpha$ , the double-edged sword of human cancers. *Am J Transl Res* 2009;1:328–340.
- Harmeling H, Benzinger A. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin Cancer Biol* 2006;16:183–192.



27. McAndrew CW, Gaswirth RF, Donoghue DJ. The atypical CDK activator Spyl regulates the intrinsic DNA damage response and is dependent upon p53 to inhibit apoptosis. *Cell Cycle* 2009;8:66–75.
28. Lu S, Liu R, Su M, Wei Y, Yang S, He S, et al. Spyl participates in the proliferation and apoptosis of epithelial ovarian cancer. *J Mol Histol* 2018;47:47–57.
29. Lam E, Kiani RT, Li Y, Tredget EE, Ghahary A. Stressin-induced matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts is mediated by c-fos and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Invest Dermatol* 2005;125:230–238.
30. Nam JS, Park E, Turcotte TJ, Palencia S, Zhan X, Lee J, et al. Mouse R-spondin2 is required for apical ectodermal ridge maintenance in the hindlimb. *Dev Biol* 2007;311:134–138.
31. Gong X, Cannon KS, Lin Q, Thomas A, Yi J, Liu Q. LGR6 is a high affinity receptor of R-spondins and potentially functions as a tumor suppressor. *PLoS One* 2012;7:e37137.
32. Hao HX, Xia Y, Zhang Y, Charubé Q, Oster E, Avilto M, et al. ZNF73 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* 2012;485:195–200.
33. Ling H, Rochard L, Liao EC. Distinct requirements of wnt, wnt5a, wnt5b and goof in regulating chondrocyte maturation and timing of endochondral ossification. *Dev Biol* 2017;421:219–232.
34. Nakase G, Thomas BL, Sherwood JC, Yu J, Adhikari O, Ekbridge SE, et al. WNT18 antagonizes excessive canonical WNT activation and protects cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2017;76:218–228.
35. Onyiah EK, Sweeney E, Nateri AS. Wnt-signaling pathways and microRNA network in carcinogenesis: experimental and bioinformatics approaches. *Mol Cancer* 2018;15:58.
36. Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH. Association of the cyclin-dependent kinase and 14-3-3 $\sigma$  negatively regulates cell cycle progression. *J Biol Chem* 2000;275:23106–23112.
37. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, et al. 14-3-3 $\sigma$  is a p53-regulated inhibitor of G<sub>2</sub>M progression. *Mol Cell* 1997;1:3–11.
38. Porter LA, Dellinger RW, Tyan JA, Barnes EA, Kong M, Lecommand JL, et al. Human Speedy: a novel cell cycle regulator that enhances proliferation through activation of Cdk2. *J Cell Biol* 2002;157:357–368.
39. Wu C, Otsu S, Lu L, Zou J, Li WF, Wang Q, et al. RSP03-LGR6 signaling has tumour-suppressive activity in colorectal cancer. *Nat Commun* 2014;5:3149.
40. McIlwain DL, Berger T, Muk TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a008698.
41. Romero Y, Busano M, Ramirez R, Alvarez D, Sambroti JC, Gbncharova EA, et al. mTORC1 activation decreases autophagy in aging and idiopathic pulmonary fibrosis and contributes to apoptosis resistance in IPF fibroblasts. *Aging Cell* 2018;15:1103–1112.
42. Im J, Kim K, Hargart P, Nho RS. Idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts become resistant to Fas ligand-dependent apoptosis via the alteration of dccc receptor 3. *J Pathol* 2016;240:25–37.
43. Ghaffari A, Li Y, Kiani RT, Ghahary A. 14-3-3 $\sigma$  associates with cell surface aminopeptidase N in the regulation of matrix metalloproteinase-1. *J Cell Sci* 2010;123:3096–3005.
44. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios R, et al. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis: a prevailing nondegradable lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L562–L574.
45. Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Alard J, Yekhti Z, Ben-Dor A, et al. Gene expression analysis reveals mulliplin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:6292–6297.
46. Yin X, Yi H, Wu W, Shu J, Wu X, Yu L. R-spondin2 activates hepatic stellate cells and promotes liver fibrosis. *Dig Dis Sci* 2014;59:2462–2461.
47. Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* 2002;28:105–112.
48. Cui H, Ge J, Xie N, Banerjee S, Zhou Y, Antony VB, et al. miR-34a inhibits lung fibrosis by inducing lung fibroblast senescence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2017;56:168–178.
49. Tian XF, Ji FJ, Zang HL, Cao H. Activation of the miR-34a/SIRT1/p53 signaling pathway contributes to the progress of liver fibrosis via inducing apoptosis in hepatocytes but not in HSCs. *PLoS One* 2016;11:e0158857.
50. Chavez-Munoz C, Hartwell R, Jalli RB, Jalamejad SM, Lai A, Nattai L, et al. SPARC/SFN interaction, suppresses type I collagen in dermal fibroblasts. *J Cell Biochem* 2012;113:2622–2632.
51. Yu G, Kovlanova-Naumovska E, Jara P, Parwani A, Kasa D, Ruiz V, et al. Matrix metalloproteinase-19 is a key regulator of lung fibrosis in mice and humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:752–762.
52. Horikiri T, Hara H, Saito N, Anaya J, Takasaka N, Utsami H, et al. Increased levels of prostaglandin E-major urinary metabolite (PGE-MUM) in chronic fibrosing interstitial pneumonia. *Respir Med* 2017;122:43–50.
53. Shimbori C, Balayo PS, Xia J, Gaultier J, Ask K, Ramos C, et al. Fibroblast growth factor-1 attenuates TGF- $\beta$ 1-induced lung fibrosis. *J Pathol* 2016;240:197–210.
54. Shi Y, Gochuico BR, Yu G, Tang X, Osorio JC, Fernandez IE, et al. Syndecan-2 exerts antifibrotic effects by promoting caveolin-1-mediated transforming growth factor- $\beta$  receptor I internalization and inhibiting transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:831–841.



