



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Cuantificación de los niveles de la renina y su receptor soluble en suero y lavados bronquiolo-alveolares de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

PRESENTA:

**Daniel Ramírez Tenorio**



Director de Tesis: Dr. Eduardo Montes Martínez

Ciudad de México

Septiembre, 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.



A mi madre y a mi padre, quienes de su tiempo nació mi  
tiempo, de su trabajo nació mi fuerza y de sus arrugas  
nace mi coraje.

## Agradecimientos

Este trabajo no hubiera sido realizado de no ser por el entusiasmo, perseverancia y tolerancia del Dr. Eduardo Montes quien me estuvo apoyando académica y moralmente en el transcurso y termino de este proyecto. Le estoy profundamente agradecido por los buenos ratos y los consejos otorgados.

Al laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por incluirme en su equipo de trabajo y a las personas que conformaron el laboratorio durante mi estancia por cederme un poco de su tiempo para que pudieran enseñarme las técnicas empleadas por ellos y para el laboratorio, naturalmente, no se emplearon todas ellas en este trabajo. Por los buenos tiempos compartidos, a todos ellos, gracias.

Al Dr. Luis Sánchez, Dr. Benny Weiss, Dr. Jorge Hernández y al M. en C Misael Hernández por su apoyo brindado para la revisión y mejoramiento de este trabajo.

A mi familia y a las familias Ramírez y Tenorio, por el apoyo económico, académico y personal; por cuidarme y proteger mis intereses cuales eras seguir estudiando.

A Karla Diaz, quien conocí en un muy afortunado día y desde ese entonces ha mejorado mi vida. Para este trabajo le agradezco su paciencia, sus recomendaciones y su consuelo. Por toda la ayuda brindada en sus palabras y tu sosiego, gracias.

A Josué Cerecedo, por su apoyo incondicional, extraordinario e inigualable. Gracias.

A Susana Chavira, por el auxilio en diversas etapas de mi vida, por su valioso apoyo, sus consejos y por la mejor amistad que pude haber tenido jamás.

A todos mis compañeros y amigos de la facultad: Daniel Quero, Juan Méndez, Erick Hoyos y todos aquellos que hicieron de la carrera un mejor lugar para estudiar. Por las buenas prácticas de campo. Gracias.

A mis amigos, Jorge Castillo y Mario Moron, por su influencia y su compañía en un temprano e importante estadio de mi vida. Gracias.

*Mi más profundo respeto, admiración y cariño para la Universidad Nacional Autónoma de México y para la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por la educación otorgada.*

# ÍNDICE

Contenido	Página
1. Índice de figuras.....	7
2. Lista de abreviaturas .....	8
3. Resumen.....	10
I. MARCO TEÓRICO	
a. Neumonías intersticiales idiopáticas.....	11
b. Fibrosis y matriz extracelular.....	11
c. Fibrosis Pulmonar.....	13
d. Fibrosis Pulmonar Idiopática.....	15
e. Bases moleculares de la FPI.....	16
TGF- $\beta$ 1.....	19
Sistema Renina-Angiotensina.....	21
Renina.....	22
Receptores de la Renina.....	23
Receptor Soluble de la Renina.....	25
f. Diagnóstico de la FPI.....	26
g. Biomarcadores en la FPI.....	27
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
III. HIPÓTESIS.....	30
IV. OBJETIVO GENERAL.....	30
V. OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
a. Obtención de los lavados bronquiolo-alveolares.....	31
b. Obtención del suero.....	31
c. Cuantificación de proteínas.....	32

d. Inmunoblot.....	32
e. ELISA en sueros.....	32
f. Análisis estadístico.....	33
VII. RESULTADOS	
a. La renina y el receptor de la renina están incrementados en LBA de pacientes con FPI.....	34
b. La renina está incrementada en sueros de paciente con FPI.....	35
c. La expresión del receptor soluble de la renina en sueros de pacientes con FPI no está incrementado.....	36
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	38
IX. CONCLUSIONES.....	43
X. PERSPECTIVAS.....	43
XI. REFERENCIAS.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Fases de curación de una herida.

Fig. 2. Mecanismo propuesto que explica la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática.

Fig. 3. Visión general de la vía de señalización canónica TGF- $\beta$ /smad en el tejido fibrótico.

Fig. 4. Cascada de señalización para la conversión de angiotensinógeno en angiotensina II.

Fig. 5. Esquemmatización de la proteína PRR.

Fig. 6. Cortes de regiones basales de pulmón en TAC de UI.

Fig. 7. Densidad media óptica de la renina y su receptor.

Fig. 8. Comparación de los niveles séricos de renina entre pacientes del grupo control contra los pacientes con FPI.

Fig. 9. Los niveles del receptor soluble no muestran una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo fibrótico.

## Tablas

Tabla 1. Estudios que evalúan biomarcadores en suero en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ACE. Enzima convertidora de angiotensina**

**AEC. Células alveolares epiteliales**

**AGT. Angiotensinógeno**

**ALAT. Asociación Latinoamericana del Tórax**

**ANG. Angiotensina**

**ATS. Sociedad Torácica Americana**

**BR-EIP. Bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad intersticial pulmonar**

**CKD. Enfermedades renales crónicas**

**CTGF. Factor de crecimiento del tejido conectivo**

**DMO. Densidad media óptica**

**EMT. Transición epitelio-mesenquimal**

**EPID. Enfermedades pulmonares intersticiales difusas**

**ERS. Sociedad Respiratoria Europea**

**FPI. Fibrosis Pulmonar Idiopática**

**JRS. Sociedad Respiratoria Japonesa**

**kDa. kiloDalton**

**LBA. Lavado bronquiolo alveolar**

**MAPK. Proteína cinasa activada por mitógeno**

**MEC. Matriz extracelular**

**MMP. Metaloproteinasa de matriz**

**NAPDH. Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato**

**NO. Neumonía organizada**

**NIA. Neumonía intersticial aguda**

**NID. Neumonía intersticial descamativa**

**NII. Neumonía intersticial idiopática**

**NIL. Neumonía intersticial linfocítica**

**NINE. Neumonía intersticial no específica**

**NIU. Neumonía intersticial usual**

**PAI-1. Inhibidor del activador del plasminógeno-1**

**PDGF. Factor de crecimiento derivado de plaquetas**

**PRR. Receptor de prorenina**

**ROS. Especies reactivas de oxígeno**

**SRA. Sistema renina-angiotensina**

**[s]PRR. Receptor soluble de la prorenina**

**TGF- $\beta$ 1. Factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1**

**TIMP. Inhibidor tisular de metaloproteinasas**

**TNF- $\alpha$ . Factor de necrosis tumoral-alfa**

**$\alpha$ -SMA. Actina del musculo liso-alfa**

## RESUMEN

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar progresiva e irreversible, usualmente letal y de etiología desconocida catalogada como una enfermedad intersticial idiopática fibrosante crónica. De origen desconocido, y siendo una enfermedad no inflamatoria, la propuesta más aceptable es la vía epitelial, donde las células epiteliales alveolares activadas por los constantes daños promueven la formación de un foco de fibroblastos/miofibroblastos que contribuyen, junto con la expresión de moléculas profibróticas, a crear un medio hipercoagulable, desembocando en la disfunción pulmonar y distorsión arquitectónica de éste.

El sistema renina-angiotensina (SRA) es un sistema hormonal encargado de la regulación de la presión sanguínea, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la capacidad profibrótica de algunos de los elementos que conforman a este sistema. La Ang II es el efector principal del SRA y es la molécula más estudiada en el contexto de la fibrosis pulmonar; sin embargo, la renina junto con su receptor son dos elementos que se ha reportado pueden influir de manera significativa a activar diversas moléculas fibróticas independientemente de la Ang II.

En México la tasa de la FPI es desconocida, no se cuenta con una cura, y además el diagnóstico es difícil de realizar; por ello existe la necesidad de encontrar biomarcadores efectivos que contribuyan a su diagnóstico y/o pronóstico. Por lo anterior, con este trabajo se evaluaron los niveles de la renina y su receptor soluble ([s]PRR) en el suero y en lavados bronquiolo-alveolares de pacientes diagnosticados con FPI del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas". Se observó de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo que los niveles de la renina y de su receptor soluble están elevados tanto en el suero como en los lavados bronquiolo-alveolares de pacientes con FPI, comparados con el grupo control, pudiendo aprovechar a futuro la evaluación de la renina y de su receptor como posible biomarcador de la FPI. Además, los niveles del receptor soluble de la renina solo se encontraron elevados en el lavado bronquiolo-alveolar pero no en suero, sin descartar un posible uso de estas moléculas con otras enfermedades pulmonares.

## **Marco Teórico**

Las neumonías intersticiales idiopáticas (NII) son enfermedades pulmonares difusas caracterizadas por inflamación intersticial y fibrosis. Cada una de ellas representa una respuesta determinada a diversas agresiones pulmonares. Este grupo de enfermedades ha sido reclasificado en varias ocasiones. En 2001, la Sociedad Torácica Americana (del inglés ATS) y la Sociedad Respiratoria Europea (del inglés ERS), basándose en criterios clínicos, radiológicos y anatómico-patológicos, consensuaron una clasificación de las NII bajo el término general «neumonía intersticial idiopática».

En esta clasificación se incluye a la neumonía intersticial usual (NIU)/fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la neumonía intersticial no específica (NINE), la neumonía intersticial descamativa (NID), la bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad intersticial pulmonar (BR-EIP), la neumonía organizada (NO), la neumonía intersticial aguda (NIA) y la neumonía intersticial linfocítica (NIL).<sup>1</sup>

En el año 2015, la ATS y la ERS actualizaron la clasificación del 2001 antes mencionada. En esta clasificación las principales entidades se han preservado y se han agrupado en diversos conjuntos: a) NII fibrosantes crónicas (FPI Y NINE); b) NII relacionadas al cigarro (BREIP y NID) y; c) NII agudos o subagudos (NO, NIA). Además, la fibroelastosis pleuroparenquimal idiopática ha sido recientemente incluida y clasificada con las neumonías intersticiales linfáticas en un cuarto grupo, d) NII raras.<sup>2</sup>

## **Fibrosis y Matriz Extracelular**

La fibrosis es definida como el engrosamiento excesivo, el endurecimiento y la cicatrización de varios tejidos debido al excesivo depósito de componentes de la matriz extracelular (MEC), y de la disminuida degradación de la misma, o ambos.<sup>3,4</sup>

En este contexto la matriz extracelular se define como una red tridimensional, no celular, constituida fundamentalmente por agua, conjuntos de macromoléculas y polisacáridos que son producidas por las células residentes del tejido o provenientes de células del torrente sanguíneo. Estas moléculas son ensambladas en una red compleja con una

cercana asociación con la superficie celular; se localiza entre las células de todos los tejidos o en el lado externo de la membrana plasmática de cualquier célula. <sup>5,6,7</sup>

Las macromoléculas que constituyen la matriz extracelular son de cuatro grandes tipos: (1) el sistema colágeno (2) el sistema elástico (3) los proteoglicanos y (4) las glicoproteínas multifuncionales (la laminina, la fibronectina, la tenascina, la trombospondina, entre otras). <sup>5</sup>

La matriz extracelular provee funciones esenciales tales como: el soporte estructural, la adhesión celular y como barrera al movimiento de fluidos y partículas. Las funciones especializadas de los tejidos se deben en parte por las proteínas de la matriz extracelular, ejemplo de estas funciones son:

1) La flexibilidad al tejido que proporciona la elastina junto con la colágena, ya que estas proteínas proporcionan resistencia y capacidad de recuperación en regiones sometidas a estrés biomecánico.

2) Las propiedades físicas específicas elásticas y no elásticas de cada tejido son atribuidas a la fibrilina que incluyen: los vasos sanguíneos, los huesos y los ojos, etc.

3) La MEC contribuye a crear un sustrato de adhesión para resistir a las fuerzas de tensión en los tejidos por la unión de proteínas, esta acción es llevada a cabo por las lamininas. Además, la MEC es la zona donde ocurren la respuesta inmune, la angiogénesis, la fibrosis y la regeneración tisular, entre otras. <sup>5,6</sup>

En el pulmón humano la MEC está compuesta principalmente de: colágeno tipo I y III en una razón aproximada de 2:1, las cuales proveen resistencia a la tracción, la elastina que otorga un marco estructural y de elasticidad a la pared alveolar, la laminina y la colágena tipo IV constituyen la mayor parte de las membranas basales alveolares. En la fibrosis pulmonar se ha observado un incremento en la producción y depósito de las colágena del tipo I y III. Se ha localizado más colágeno del tipo I en áreas de cicatrización bien definidas y es predominante el tipo III en los septos alveolares engrosados. Además, se hallan sobreexpresados otras moléculas de la MEC como son los colágenos tipo V, VI y VII, fibronectina, elastina, ácido hialurónico y los glicosaminoglicanos. <sup>7</sup>

El proceso de curación de una herida es a menudo dividido de manera general en 3 distintas fases, tales como: lesión, inflamación y reparación (Fig. 1). A pesar de que no todas las condiciones fibrótico-pulmonares siguen este simple paradigma, ha sido un modelo útil para elucidar los mecanismos comunes y divergentes de la fibrosis pulmonar.

8

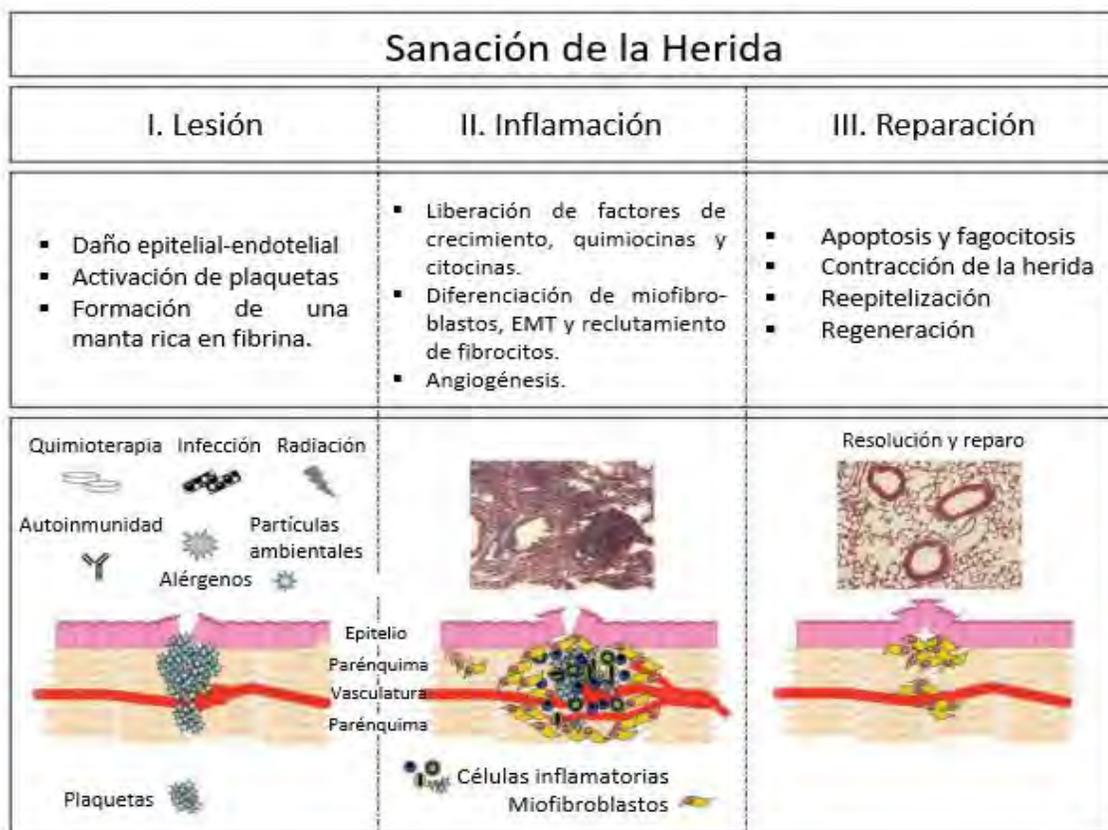


Figura 1- Fases de la curación de una herida. Extraído y modificado de Wilson & Wynn (2006)

## Fibrosis Pulmonar

La fibrosis pulmonar es el estadio final de un numeroso y heterogéneo grupo de enfermedades conocidas como Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas (EPID), las cuales son consecuencia de reacciones inflamatorias crónicas inducidas por una variedad de estímulos (infecciones persistentes, reacciones autoinmunes, respuestas

alérgicas, inhalación de partículas orgánicas e inorgánicas, entre otros). La fibrosis pulmonar constituye un complejo proceso fisiológico que inicia con repetidos daños hacia el pulmón, resultando en un indebido proceso de reparación, que incluye el depósito de proteínas de la matriz extracelular debido a la alta acumulación de células que promueven su producción excesiva.

Derivado del proceso anteriormente descrito, el resultado es la distorsión de la arquitectura pulmonar por la deformación de la estructura alveolar debido a la destrucción del parénquima pulmonar y por el engrosamiento de las paredes alveolares. Todo lo anterior culmina en la reducción de la distensibilidad pulmonar que a su vez disminuye la capacidad de difusión de oxígeno y finalmente deteriora la función pulmonar.<sup>9, 10, 11, 12</sup>

El desarrollo de la fibrosis pulmonar provoca cambios drásticos e irreversibles en la arquitectura pulmonar, resultando en una progresiva deficiencia respiratoria y un desenlace terminal en un periodo de tiempo relativamente corto, con una sobrevida media de 3-5 años posterior al diagnóstico.<sup>10, 13</sup>

Por mucho tiempo se consideró que la fibrosis pulmonar era el resultado de una respuesta inflamatoria no tratada debido a un daño exógeno que conducía a una activación y proliferación de los fibroblastos, que eventualmente culminaba en fibrosis progresiva. Sin embargo, agentes antiinflamatorios, solos o en combinación con fármacos citotóxicos, han sido usados en regímenes terapéuticos estándar y clínicos para el tratamiento de la FPI, pero poca evidencia indica que esos agentes alteran la historia natural de la enfermedad o que mejore la sobrevida de los pacientes, sugiriendo que la inflamación no posee un papel importante en el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática. Así, se ha postulado la existencia de al menos 2 vías diferentes para el desarrollo de fibrosis pulmonar: a) la vía inflamatoria, que participa de manera general en las enfermedades pulmonares intersticiales difusas, en las cuales se puede identificar claramente una fase inicial de inflamación seguida de una fase fibrótica, y b) la vía epitelial, que participa sólo en la patogenia de la FPI.<sup>4, 14</sup>

## **Fibrosis Pulmonar Idiopática**

La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) es la forma más común de las neumonías intersticiales idiopáticas; es una enfermedad pulmonar crónica, progresiva, irreversible y usualmente letal de causa desconocida que expresa un patrón característico llamado de neumonía intersticial usual. <sup>15, 16</sup>

La FPI se caracteriza por: exhibir escasa inflamación, alternando zonas de cicatrización con zonas no cicatrizadas, por el cambio en el fenotipo de las células alveolares epiteliales, por la expansión de la población de fibroblastos y su posterior diferenciación a miofibroblastos y la excesiva acumulación de proteínas de la matriz extracelular (principalmente las colágenas tipo I y III). Todo lo anterior resulta en una severa distorsión de la arquitectura pulmonar, y en todos los casos, la enfermedad progresa hasta la muerte del paciente <sup>14, 17, 18</sup>.

Se ha propuesto que el proceso de la enfermedad comienza en la base y la periferia del pulmón con una distribución subpleural, que progresa de manera ascendente y al interior por una extensión contigua hasta formar un retículo fibrótico imparabile que disminuye la función pulmonar y el intercambio gaseoso <sup>19</sup>.

Entre los factores de riesgo ambientales asociados a la FPI más importantes se encuentran: el tabaquismo, la exposición al polvo de metal, de madera, de piedra, de vegetales o animales, las actividades agrícolas y la exposición al ganado. También se han estudiado agentes microbianos especialmente infecciones virales crónicas, como son: el virus de Epstein Barr y hepatitis C, pero con resultados contradictorios <sup>15,16</sup>.

Los datos epidemiológicos a nivel mundial son muy variados y geográficamente la mayoría de estos estudios provienen de Estados Unidos y Europa. En Estados Unidos la incidencia oscila entre 0.6 a 17.4 casos por cada 100,000 habitantes por año, mientras que la prevalencia varia de 0.7 a 63 casos por cada 100,000 habitantes. En México los datos para la incidencia y la prevalencia son inexistentes; sin embargo, debido a su alta tasa de mortalidad (61.2 por cada millón en hombres) representa una problemática, tanto para el paciente como para su médico tratante. <sup>13, 20</sup>

## **Bases Moleculares de la FPI**

En la actualidad, los mecanismos exactos de cómo se produce la enfermedad siguen siendo poco claros, sin embargo, se han asociado factores de riesgo tales como: la exposición ambiental, enfermedades virales crónicas, genéticos (Fibrosis Pulmonar Familiar), la susceptibilidad por la edad y la actividad desregulada de las células epiteliales, mesenquimales y de la matriz extracelular. Como consecuencia de lo anteriormente enunciado, la FPI es el resultado de la múltiple y compleja interacción que existe entre los factores de riesgo asociados reportados hasta la fecha. <sup>21</sup>

Históricamente la FPI era considerada como una enfermedad inflamatoria donde gradualmente se establecía la fibrosis, pero quedó descartada como tal después de que no mejoraban los pacientes con las terapias antiinflamatorias ni con las terapias inmunosupresivas; estas últimas solamente incrementaban la mortalidad de los pacientes. Hoy en día se sabe que la enfermedad es producto de la interacción de diversos agentes y de acuerdo con distintas líneas de investigación independientes, las lesiones y la disfunción del epitelio alveolar son relevantes en la patogénesis de la enfermedad. <sup>22, 23</sup>

El epitelio alveolar pulmonar está conformado principalmente de células alveolares epiteliales (por sus siglas en inglés, AEC) tipo 1 y 2, además de las células dendríticas y macrófagos residentes encargados de remover partículas sólidas, líquidas, alérgenos y microbios. Las AEC2 son células dentro del pulmón que contribuyen a renovar a las AEC1 durante la homeostasis y después de cualquier daño pulmonar; además, son las responsables de sintetizar, guardar y secretar las proteínas surfactantes pulmonares (PS), importantes para la reducción de la tensión superficial del alveolo pulmonar y la prevención contra un posible colapso debido a la distensión o estiramiento del tejido por los procesos de respiración. <sup>21, 24, 25</sup>

El epitelio alveolar que constantemente está sufriendo lesiones por diversos agentes, se caracteriza por la continua proliferación y muerte celular por apoptosis. Además, como parte del proceso de reparación de la herida se presenta en el epitelio alveolar el

mecanismo de transición epitelio-mesénquima, activada solamente en condiciones de daño tisular o remodelamiento; dos procesos continuos durante la FPI. <sup>26</sup>

La patogénesis de la enfermedad inicia con repetidas microlesiones locales al epitelio alveolar, el cual tiene la capacidad de regenerarse por medio de un proceso biológico finamente sincronizado donde las AEC2 proliferan y posteriormente se diferencian en AEC1 para restablecer un epitelio alveolar funcional. En el caso del tejido pulmonar de pacientes con FPI se ha reportado que las AEC2 empiezan a sufrir muerte celular por apoptosis que resulta en la disminución de este tipo de células y a su vez la cantidad de PS baja lo que contribuye al colapso de los alveolos. Lo anterior deriva en la aposición de las paredes alveolares, reducción o pérdida del espacio alveolar y de la superficie de contacto, ligada directamente a la pérdida de AEC1. <sup>21, 25, 27</sup>

A su vez, con la muerte de las AEC2, la integridad de la membrana basal se ve comprometida debido a que estas células son las responsables de producir los componentes que mantienen la totalidad de ella. Algunos de estos componentes que producen las AEC2 son la fibronectina, laminina, y colágeno tipo IV. Los fibroblastos y miofibroblastos pueden migrar dentro del espacio alveolar a través de la abertura provocada por la desintegración de la membrana y promover el desarrollo de la fibrosis. <sup>25</sup>

Una vez establecida la ruptura de la membrana basal junto con la infiltración de los fibroblastos, el pulmón se ve afectado porque el epitelio dañado comienza a producir de manera exagerada moléculas profibrosantes que contribuirán a expandir la población de los fibroblastos y miofibroblastos. Estos componentes incluyen al TGF- $\beta$ 1, PDGF, CTGF, TNF, osteoponina, angiotensinógeno, metalo-proteasas de matriz 1, 7 y 9, incluyendo varias quimiocinas más en un intento por sanar la herida. <sup>21</sup>

En tejido pulmonar de pacientes con FPI, a través de inmunohistoquímicas, se comprobó el marcado incremento del factor de crecimiento transformante- $\beta$  (por sus siglas en inglés, TGF- $\beta$ 1) que juega un papel central en el desarrollo de la FPI y en los procesos de remodelación. Esta molécula tiene diversos efectos dentro del tejido pulmonar, tales como 1) efectuar la adquisición del fenotipo de las células endoteliales y epiteliales hacia las mesenquimales (EMT); 2) el reclutamiento de fibrocitos circulantes y células

progenitoras derivadas de la médula ósea dentro del pulmón; 3) activación, migración y proliferación de los fibroblastos residentes y su diferenciación en miofibroblastos activos que promueven el depósito excesivo de los componentes de la MEC tales como la fibronectina, colágena tipo I y los proteoglicanos; 4) inhibición de la expresión de los inhibidores de metaloproteasas de matriz (TIMPs) y el inhibidor de plasminógeno. <sup>28, 29, 30</sup>

La Transición epitelio-mesenquimal (por sus siglas en inglés, EMT) es un proceso biológico que permite la diferenciación de una célula epitelial que normalmente interactúa con la membrana basal a una célula tipo mesenquimal. En este proceso las células epiteliales adquieren marcadores como son:  $\alpha$ -actina de músculo liso, FSP1, N-caderina, Vimentina,  $\beta$ -catenina, OB-caderina, entre otros, aunado a la pérdida de marcadores característicos de células epiteliales como la E-caderina, citoqueratina, Laminina-1, Entactina, MUC 1; además de incrementar su capacidad migratoria, resistencia a la apoptosis y su capacidad para fabricar componentes de la MEC. <sup>31, 32,</sup>

Los focos de fibroblastos/miofibroblastos son importantes en el contexto de la FPI porque se les ha relacionado con la progresión de la enfermedad y el pronóstico del paciente. Los miofibroblastos influyen en la remodelación estructural del pulmón ya que son la fuente principal de colágena tipo I y III, contribuyendo activamente en el depósito de proteínas de la MEC, además de diversas citocinas, como el TGF- $\beta$ 1; con todo esto son considerados el efector principal en el desarrollo de la fibrosis. <sup>29, 32, 33</sup>

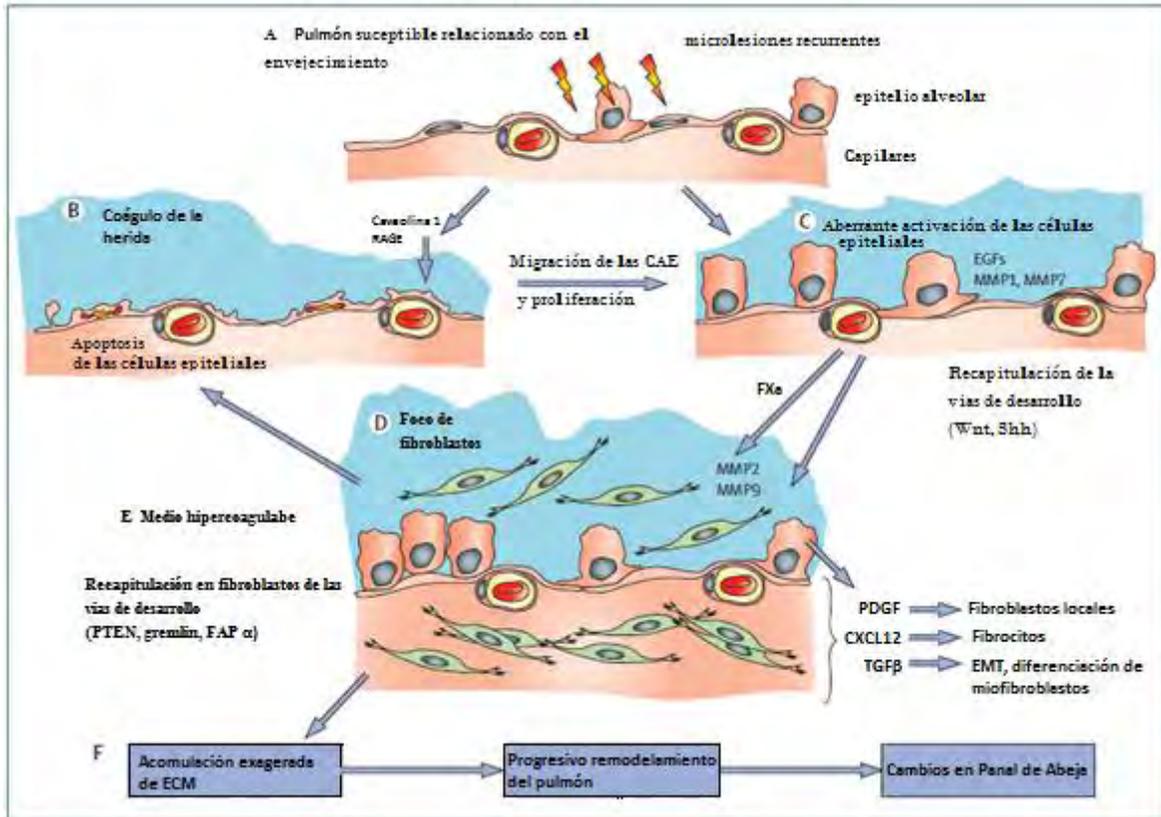


Figura 2. Mecanismos propuestos que explican la patogénesis de la Fibrosis Pulmonar Idiopática. Extraído y modificado de Talmadge y Cols. (2011)

Una vez dañado el pulmón y habiendo la infiltración de los fibroblastos, el TGF- $\beta$ 1 secretado por las células epiteliales junto con otros factores comenzará a activar a los fibroblastos y diferenciándolos a miofibroblastos, desencadenando la producción excesiva de componentes de la MEC. Como fuentes de los fibroblastos están los fibroblastos residentes, los que provienen de zonas cercanas, los que se originan de fibrocitos circulantes y los que proceden de la transición epitelio-mesénquima (Fig.2).

## TGF- $\beta$ 1

El papel del TGF- $\beta$ 1 en los procesos fibróticos es relevante, ya que es la molécula profibrosante capaz de causar la producción excesiva de la colágena tipo I y III, de inducir la proliferación de los fibroblastos, promover la EMT, etc. La vía canónica de señalización

es por las proteínas Smads que involucra la fosforilación y activación de las Smad/2 y 3 por medio del receptor 1 del TGF- $\beta$ 1, que junto con la Smad 4 puede dirigirse al núcleo y regular la transcripción de genes específicos (Fig.3).<sup>30</sup>

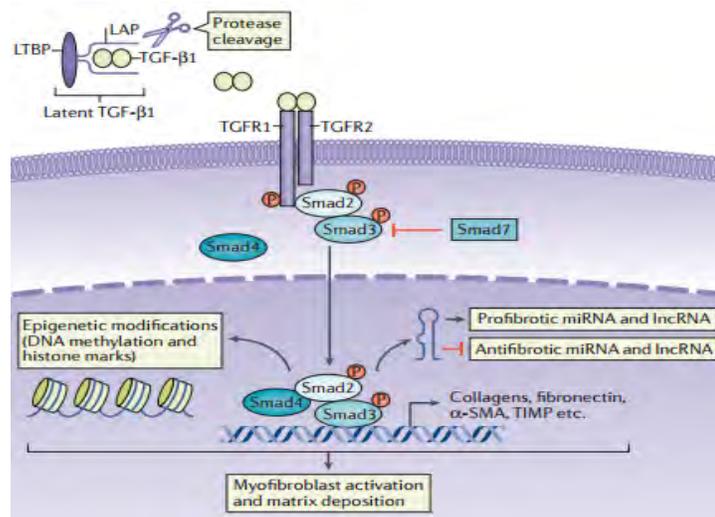


Figura 3. Visión general de la vía de señalización canónica de TGF- $\beta$ / Smad en tejido fibrótico.

Extraído de Meng y Cols. (2016)

Dicho lo anterior, en situaciones de lesión tisular, TGF- $\beta$ 1 puede ser activado, ya sea por proteasas de serina, ROS (especies reactivas de oxígeno), o metaloproteasas de matriz. El TGF- $\beta$ 1 es producido por neutrófilos, macrófagos, células epiteliales y fibroblastos para poder sanar la herida. Dentro de la diversidad de moléculas que pueden inducir su sobreexpresión destaca la Ang II; se ha reportado que la Ang II mantiene un incremento autocrino del TGF- $\beta$ 1 activo y de la colágena tipo I<sup>34</sup>, además de inducir apoptosis de las AEC<sup>35</sup>, e inducir la expresión del inhibidor del activador de plasminógeno-1 (del inglés PAI-1)<sup>36</sup>, que se encargan de inhibir la degradación de la fibrina favoreciendo su acumulación. La Ang II forma parte del Sistema Renina-Angiotensina, del cual hablaremos a continuación.

## Sistema Renina-Angiotensina

A la fecha se conocen dos tipos de sistemas renina-angiotensina (SRA), el primero y el más estudiado es el SRA sistémico, este es un sistema hormonal conocido por regular la presión sanguínea debido a que influencia el tono vascular, concentración de sales y la retención de fluidos. El segundo es el SRA tisular, involucrado en la generación local de angiotensina II en diversos órganos, tales como el cardíaco, vascular, renal, adrenal, pulmonar, esquelético, entre otros.<sup>37, 38, 39</sup>

El sistema clásico de SRA (Fig. 4) consiste en una serie de cortes enzimáticos comenzando con el angiotensinógeno (AGT), que es cortado por una aspartil proteasa llamada renina que produce un péptido de 10 aminoácidos llamado angiotensina I (Ang I), que posteriormente es hidrolizado por otra enzima soluble o asociada a las células endoteliales conocida como enzima convertidora de angiotensina (ACE por sus siglas en inglés) generando péptidos biológicamente activos, tales como Ang II, III y IV. La Ang II es el efector principal del SRA por medio de sus receptores (AT<sub>1</sub>R y AT<sub>2</sub>R).<sup>38, 40</sup>

En el contexto de la FPI, la Ang II estimula la producción de TGF-β1 y el factor de crecimiento del tejido conectivo (por sus siglas en inglés, CTGF), dos potentes factores profibróticos que conducen a la proliferación de fibroblastos/miofibroblastos y a la producción de proteínas de la ECM. Todos estos efectos son mediados principalmente por el receptor AT<sub>1</sub>R.<sup>12</sup>

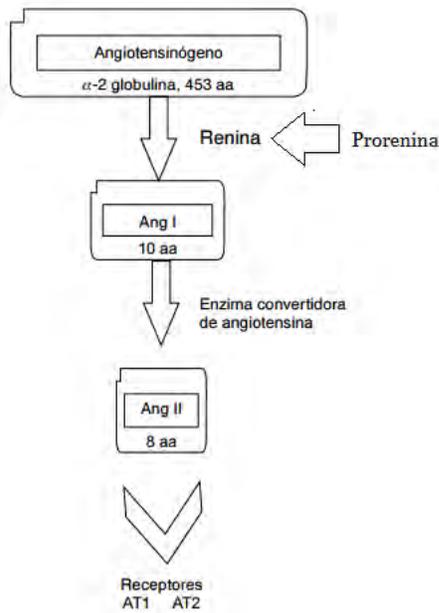


Figura 4. Cascada de señalización para la conversión del angiotensinógeno en angiotensina II. Extraído y Modificado de Montes (2010).

## La Renina

La renina es un miembro de la familia de las proteasas aspárticas. La renina es producida principalmente pero no exclusivamente en las células yuxtaglomerulares; ésta se sintetiza como una preproteína (prorenina), molécula enzimáticamente inactiva, debido a que contiene un prosegmento de 43 aminoácidos que cubre el sitio activo, inhabilitándola para procesar el AGT. El prosegmento es removido en estructuras parecidas a lisosomas que subsecuentemente guardan a la renina en densas vesículas; ésta es liberada de las células yuxtaglomerulares en respuesta a un estímulo de hipotensión y bajo  $\text{Na}^+$ . La prorenina también es secretada directamente hacia el flujo sanguíneo.

Se ha descrito que la renina y la prorenina por medio de su receptor ejercen efectos profibrosantes de manera independiente a la Ang II como son: el aumento de los niveles de expresión de PAI-1, TGF- $\beta$ 1 y del colágeno tipo I en células mesangiales y cardiomiocitos. <sup>40, 39</sup>

## Receptores de la (Pro) Renina

A partir del descubrimiento de la generación local/tisular de Ang II en tejido cardiaco y vascular, se postuló la existencia de receptores “locales” que captan a la renina y prorrenina y así continuar con la transformación enzimática del Ang I hasta convertirse en Ang II. A la fecha se han descubierto los siguientes receptores, dos de ellos inespecíficos y uno específico para la renina y prorrenina:

El primer receptor es una proteína de unión a la renina intracelular ( del inglés, RnBP) que reduce la generación de Ang I por parte de la renina en una proporción >80%. Este receptor posee similitudes con la enzima *N*-acyl-D-glucosamina 2-epimerasa, lo cual contribuyó a su descubrimiento. Este receptor no se colocaliza con la renina y los ratones ausentes de RnBP muestran una presión sanguínea y actividad de la renina normal. <sup>41</sup>

Los receptores de manosa-6-fosfato (M6PR), son glicoproteínas transmembranales que se encuentran en los lisosomas y que ligan a oligosacáridos específicos con el marcador M6P y al factor de crecimiento tipo-2 similar a la insulina (IGF-II). En células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) y en células cardiacas se ha demostrado que, tanto la renina como la prorrenina, son capaces de unirse a la superficie de este receptor, involucrando una internalización y activación proteolítica de la prorrenina. Sin embargo, no se observa la generación de Ang I, considerándolo como un “receptor de aclaramiento” de la prorrenina. <sup>42, 43, 44</sup>

El receptor prorrenina/renina (PRR) es considerando el único receptor hasta la fecha descrito para la renina y la prorrenina, ya que se acopla a ambas formas; en humanos existe un único gen que codifica para el PRR localizado en el cromosoma X, locus p11.4. El ARN<sub>m</sub> posee una longitud de 2034 pares de bases sin ningún producto de empalme alternativo.

El PRR es una proteína transmembranal de 350 aminoácidos expresada de manera ubicua que es capaz de unir a la prorrenina al dominio extracelular N-terminal (Fig. 5). Este dominio de unión está únicamente conservado en vertebrados, que probablemente significa que la función del PRR fue adquirida durante la evolución de los vertebrados. El grado de homología entre humano, ratón y rata del PRR es cerca de 95%

para la secuencia del gen y cerca del 80% de los aminoácidos de la proteína. Posee un dominio transmembranal simple como los receptores de factores de crecimiento. No posee ninguna homología con alguna proteína conocida, basado en su secuencia nucleotídica o de aminoácidos.<sup>39, 45, 46</sup>

Figura 5. Esquematación de la proteína PRR. a) Porción del péptido señal; b) Dominio citoplas-mático.



Obtenido y modificado de Nguyen & Muller. (2010).

A partir de algunos experimentos se ha teorizado que el PRR se une específicamente a la renina y la prorenina con importantes consecuencias: 1) la unión con el receptor sin ninguna internalización de la prorenina; 2) incremento de la capacidad enzimática de la renina en comparación de la renina en el medio extracelular; 3) activación de Ang I por medio de la prorenina sin la escisión del prosegmento (cambio conformacional); 4) señalización al interior de la célula por medio de la activación de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), a las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK, por sus siglas en inglés).<sup>46</sup>

De las anteriores interacciones mencionadas, la señalización de la prorenina y la renina con su receptor es la más estudiada ya que resulta en la sobreexpresión de TGF- $\beta$ 1 con la subsecuente producción de moléculas pro-fibróticas, tales como PAI-1, fibronectinas y colágena tipo I; asimismo, estimula la proliferación de las células mesangiales.<sup>47, 48</sup>

## Receptor Soluble de la Prorenina

En 2009, Cousin y Cols. identificaron una forma soluble del receptor de la prorenina (por sus siglas en inglés, sPRR) a través de analizar el medio condicionado de varios tipos celulares. Esta forma del receptor está compuesta por los dominios de transmembrana (TM), dominio citoplasmático o intracelular (IC) y una porción corta del dominio extracelular (EC) que está escindido en las proximidades del sitio de unión de la furina (denominado RKTR) sugiriendo que el resto del ectodominio fue liberado, quedando un PRR con bajo peso molecular de 28 kDa (figura 5).<sup>49, 38</sup>

La inhibición de la furina en cultivos celulares, así como mutaciones en el sitio de unión para la furina inhibe la generación de esta forma soluble del receptor, confirmando que la furina es la enzima responsable de esa escisión. Esta forma soluble del PRR ha sido hallada tanto en cultivo celular, orina y plasma y se sugiere que aún es capaz de unir a la renina y a la prorenina.<sup>50</sup>

Hasta ahora, varios estudios se han realizado en torno a este receptor en relación con varias enfermedades pero cabe mencionar el trabajo de Ohashi y col., donde a través de estudios histológicos de pacientes con daño renal pudieron observar la lesión fibrótica tubulointersticial, argumentando que esta lesión se deba, en parte, porque el receptor se une a la prorenina y media su activación; una vez activada empieza la producción de Ang II y esta molécula estimula la inflamación y la fibrosis debido al estrés oxidativo por la actividad de la NADPH, el incremento en los niveles de TGF- $\beta$ 1 y por incrementar la infiltración de macrófagos en el sitio de la lesión.<sup>51</sup>

La función del sPRR no ha sido elucidada y no se sabe si sPRR puede incrementar la actividad de la prorenina, así como el receptor de membrana o si se comporta como un antagonista capturando a la renina libre impidiendo que ésta se una a su receptor de membrana, evitando un incremento de la expresión de las moléculas profibróticas antes mencionadas; es por esto que en el presente trabajo se pretende medir los niveles del receptor soluble de la renina en pacientes con FPI en comparación a los pacientes controles y así ampliar el conocimiento acerca de este receptor y de la misma enfermedad.

## Diagnóstico de la FPI

El diagnóstico de la FPI requiere de un enfoque multidisciplinario integral que involucre la experiencia de neumólogos, radiólogos y patólogos en el área. Por lo tanto, establecer un diagnóstico preciso para la FPI es un proceso complicado. Su diagnóstico está basado por la ausencia de alguna causa conocida de fibrosis pulmonar intersticial, además, el tórax debe presentar los patrones radiológicos característicos de una NIU en la tomografía axial computarizada de alta resolución.<sup>15, 52</sup>

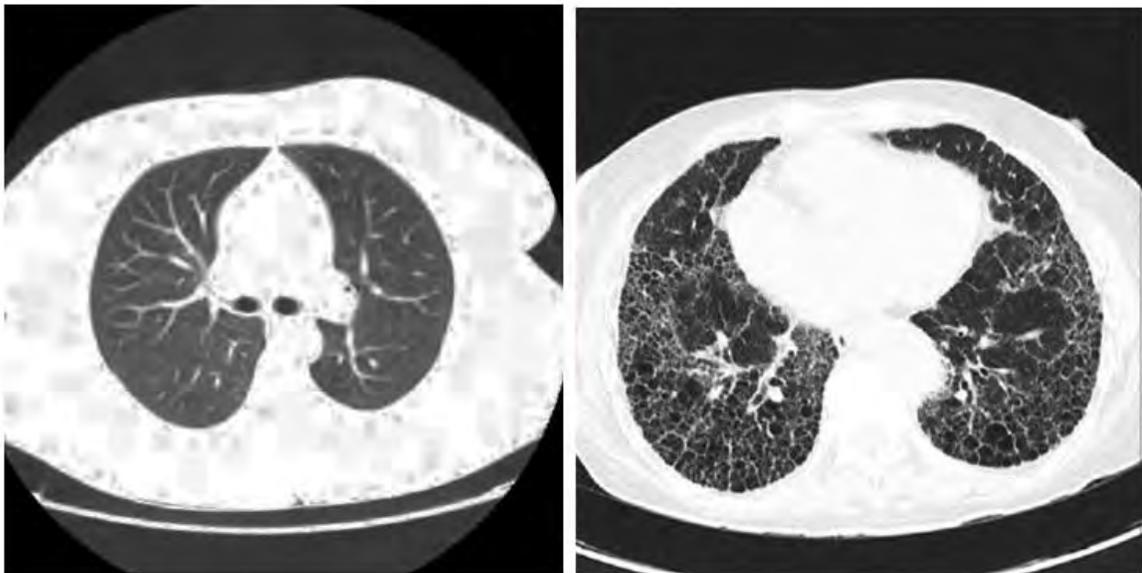


Figura 6. Cortes con ventana de regiones basales pulmonares mediante tomografía axial computarizada de a) un paciente sano contra b) un paciente con FPI que muestra el patrón característico de “panel de abeja”.

Extraído de Muñis & Casanovas (2006), y de Undurraga (2015).

Los criterios para diagnosticar a los pacientes con FPI, de acuerdo al consenso de ATS/ERS/JRS/ALAT 2015<sup>52</sup> son los siguientes:

- 1- Que los pacientes tuvieran exclusión de otras enfermedades pulmonares intersticiales de causa desconocida tales como: neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades colágeno-vasculares (artritis reumatoide, silicosis) secundarias al uso de fármacos.

- 2- Que los pacientes tuvieran el patrón de NIU en una tomografía de alta resolución en el cual se aprecie:
  - a. Predominio subpleural basal
  - b. Patrón reticular
  - c. Panal de abeja con o sin bronquiectasia por tracción
  - d. Ausencia de características enlistadas en el patrón de incompatibilidad con una NIU como son: predominio peribronco vascular, vidrio deslustrado extenso, micronódulos, quistes, mosaico y/o consolidación.
- 3- Estudios de función pulmonar anormales que incluyen evidencia de restricción e intercambio deficiente de gases.
- 4- La biopsia pulmonar debe estar caracterizada por una marcada fibrosis, debe estar distorsionada la arquitectura pulmonar (tipo panal de abeja), presentar focos de fibroblastos y depósitos de MEC.

### **Biomarcadores en la FPI**

Los biomarcadores son parámetros biológicos medibles y cuantificables que se utilizan como un indicador del estado de una enfermedad o de cualquier otro estado biológico de un organismo. En medicina se utilizan los biomarcadores en el establecimiento del diagnóstico y pronóstico de alguna enfermedad, además de ser usado para desarrollar terapias dirigidas, para predecir la respuesta del paciente a un medicamento, así como en el campo de la investigación.<sup>53, 54</sup>

El epitelio pulmonar produce secreciones complejas tales como: el moco, las proteínas surfactantes y varias proteínas importantes para la defensa propia del sitio (mucinas). Anteriormente los lavados bronquiolo-alveolares representaban el medio común para estudiar las proteínas que secreta el epitelio pulmonar y así continuar las investigaciones de las alteraciones pulmonares, esto hasta que se realizaron estudios pioneros en muestras de sangre de las mismas proteínas usando ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (por sus siglas en inglés, ELISA), que inclusive, teniendo pequeñas

cantidades de proteínas, se podría demostrar variaciones significativas de esos niveles de proteína en el suero de los pacientes con diferentes EPID.<sup>55</sup>

A continuación, se muestra un resumen de las proteínas evaluadas en el suero de los pacientes con FPI.

<i>Biomarcador</i>	<i>Precisión en el diagnóstico Especificidad-sensibilidad</i>	<i>Limitaciones</i>
KL-6: marcador de suero para neumonía intersticial	95-95%	Sin potencial para marcar específicamente a la FPI, influenciado por tumores malignos y por una pequeña muestra de pacientes
SP-A y SP-D en suero como factor pronóstico para FPI y su relación con el grado de la enfermedad.	SP-A: 79-94% SP-D: 85-95%	Débil correlación con las características de la tomografía computarizada/ análisis incompleto de la mortalidad de la enfermedad/ problemas de reproducibilidad/ pequeño número de pacientes.
KL-6 circulante: predice el sobrevenir de una rápida progresión del FPI	No estimado	Pequeño número de pacientes/predicción del porvenir con niveles de pretratamiento. Sin un marcador específico para EPID
Alta concentración de SP-A en suero de pacientes con NIU comparado con NINE	No estimado	Pequeño número de pacientes/superposición de los niveles de SP-A en NIU y NINE/ Sin curvas de análisis ROC.
Niveles de suero de Ca 19-9 como marcadores de actividad de la enfermedad en pacientes con EPID	No estimado	Pequeño número de pacientes con FPI/sin mediciones seriadas/ Sin curvas de análisis ROC.

Niveles elevados de Ca 19-9 bien correlacionados con la actividad de la enfermedad.	No estimado	Pequeño número de pacientes con FPI/ sin mediciones seriadas/ Sin curvas de análisis ROC.
Superioridad de los niveles en suero de KL-6 como marcador diagnóstico para NI.	KL-6: 74-91-99% Ca:19-9: 43-77-94% SLX: 20-71-96%	Pequeño número de pacientes con FPI/sin marcadores específicos para EPID/sin niveles de corte definitivos.
Western blot de proteínas SXL de suero puede servir como diferenciador entre adenocarcinoma pulmonar y FPI.	SLX: 93-83%	Pequeño número de pacientes/bajo poder estadístico/deficiencias técnicas
Significado clínico de los niveles de MCP-1 en LBA y sueros en pacientes con EPID.	No estimado	Si una relación definitiva con la gravedad de la enfermedad/ influenciado por tratamientos esteroideos/potencial influencia de otras enfermedades pulmonares
Efectos de IFN- Y-Ib en la expresión de biomarcadores en pacientes con FPI.	No estimado	Existencia de Fluctuaciones antes y después del tratamiento/ Sin resultados definitivos.

Tabla 1- Estudios que midieron biomarcadores en suero en pacientes con FPI. Extraído y modificado de Tzouveleakis y Cols. (2005)

## **Planteamiento del problema**

La fibrosis pulmonar idiopática es un padecimiento crónico, sin cura y letal, las causas y los mecanismos de la enfermedad son desconocidos hasta el día de hoy. Encontrar marcadores que puedan ayudarnos a diagnosticar la enfermedad o que pueda diferenciarla de otras enfermedades pulmonares es importante para desarrollar blancos terapéuticos y contribuir a su evaluación.

## **Hipótesis**

Los niveles de la renina y su receptor soluble estarán elevados en los sueros y LBA de los pacientes con FPI en comparación con los sujetos control.

## **Objetivos**

Objetivo general:

Determinar los niveles de la renina y su receptor soluble en lavados bronquiolo-alveolares y suero de pacientes con FPI.

Objetivos particulares:

- Colectar, concentrar y cuantificar los lavados bronquiolo-alveolares de pacientes con FPI y control.
- Evaluar los niveles de la renina y su receptor en el lavado bronquiolo-alveolar procedente de pacientes con FPI y control.
- Medir los niveles de la renina y su receptor soluble en el suero de pacientes procedentes de FPI y control.

## **Materiales**

Se usaron dos anticuerpos para la detección del receptor de la renina y la renina (Santa Cruz, CA, USA), inhibidor de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail set IV, MerckMillipore, USA); marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standars, Bio-rad, USA); Luminol (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific, USA).

## **Metodología**

- Obtención de los lavados bronquiolo-alveolares

El departamento de Broncoscopia del INER realizó los lavados bronquiolo-alveolares como parte del proceso de diagnóstico de los pacientes de los cuales para fines de investigación solamente se utilizaron una alícuota de 13 ml del lavado bronquiolo-alveolar.

Una vez obtenidas las muestras se concentraron por medio de columnas de centrifugación de 30 kDa (Amicon, Millipore), de acuerdo con las instrucciones del fabricante; brevemente, el LBA se adicionó al interior de las columnas, posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm hasta reducir el volumen a 200 µl. Después se colocaron en tubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 12000 rpm por 15 minutos para eliminar los restos celulares insolubles. Se realizaron alícuotas en tubos de 1.5 ml y posteriormente se adicionó el inhibidor de proteasas para evitar la degradación de las proteínas. Se almacenaron debidamente etiquetadas hasta su uso.

- Obtención de Suero

Para la medición de la renina y su receptor soluble en pacientes y controles, los sueros fueron colectados por la clínica de enfermedades intersticiales del INER. Las muestras colectadas en tubos vacutainer para suero BD SST fueron procesadas en el laboratorio como se describe a continuación: se centrifugaron a 3000 rpm x 10 minutos, después el suero se colectó en tubos debidamente etiquetados y se almacena a hasta su uso.

-

- Cuantificación de proteínas

Las proteínas de los LBA se cuantificaron por medio del reactivo de Bradford (Bio-Rad), se usó albúmina sérica bovina (por sus siglas en inglés, BSA) para construir la curva patrón. La determinación se realizó de la siguiente manera: de cada muestra se tomaron 2µl, posteriormente, se aforaron con 98 µl de agua desionizada y se adicionaron 25 µl del reactivo de Bradford; se mezclaron y finalmente se leyeron las absorbancias en un lector de placas a una longitud de onda de 595 nm.

- Inmunoblot

Cuantificados los LBA, se cargaron 25 µg de proteína total y se separaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes reductoras con el equipo PROTEAN II xi Cell (BIO-RAD), siendo 11 carriles para los controles y 11 carriles para los LBA procedentes de pacientes con FPI, un carril para el marcador de peso molecular.

Al término de la electroforesis se transfirieron los geles a membranas de nitro-celulosa con el equipo Trans-blot SD semi-Dry Tranfer Cell (Bio-Rad) y al finalizar se bloquearon los sitios inespecíficos con una solución de PBS-Tween 20 al 5% de leche libre de grasa (SCB) durante 24h a 4°C. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo antireceptor de la renina y con el antirenina por una hora a temperatura ambiente, al término de la hora se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente y posteriormente fueron revelados mediante quimio-luminisencia, la captura de imágenes se realizó en el equipo ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad), y subsecuentemente se hizo la densitometría de las bandas con el programa ImageLab™ (Bio-Rad).

- ELISA

Se cuantificó la renina (Cloud-clone Corp., USA) y su receptor soluble (IBL, Japan) por medio de ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, para ambos estuches se agregaron la muestra de suero y estándar, posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa, después se adicionó la solución sustrato (TMB) y finalmente se agregó la solución de paro y se leyó la placa a una longitud de onda de 450 nm y una corrección de 549nm.

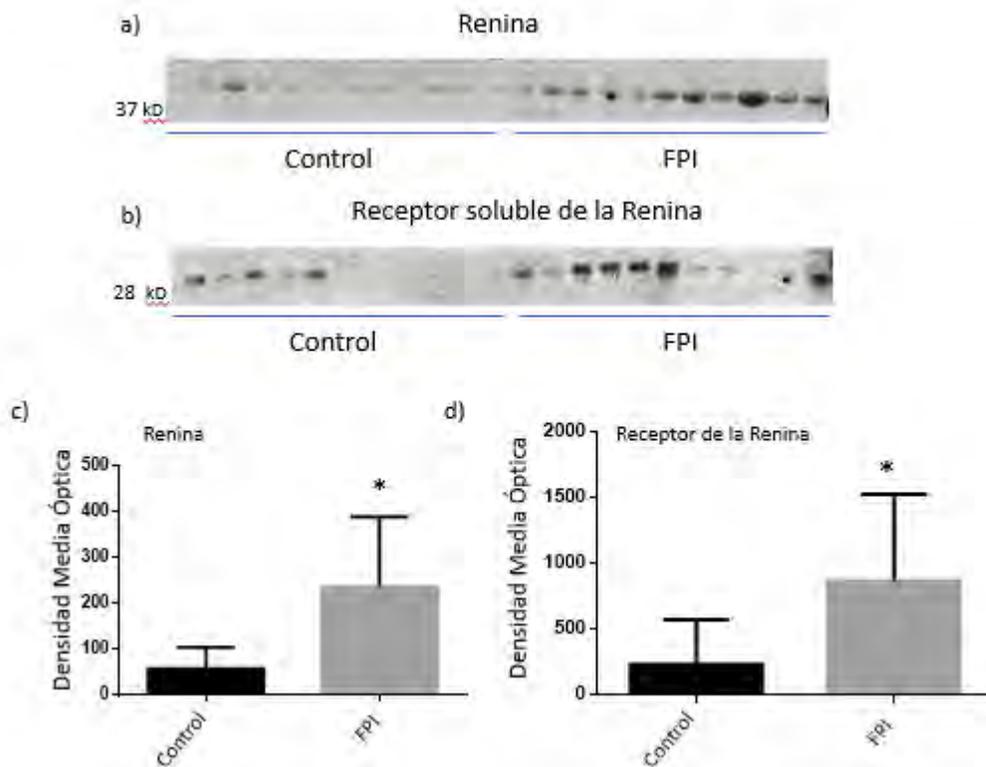
- Análisis estadístico

Las gráficas y el análisis estadístico se realizaron por medio del programa Graphpad Prism 7.0 y las diferencias entre los grupos se calcularon empleando una prueba t de student, considerando una  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

### **La renina y el receptor de la renina están incrementados en LBA de pacientes con FPI**

Se evaluó en los LBA procedentes de pacientes con FPI y control la cantidad de renina y el receptor de la renina soluble por Western Blot, las imágenes fueron analizadas con el software Image Lab para obtener la densidad media de pixeles de las bandas (densitometría) (Fig. 1a). Con los datos obtenidos se compararon con una prueba t de student y para ambos casos se observó una mayor cantidad de renina y de su receptor soluble en las muestras de los pacientes con FPI en comparación con el grupo control (Fig.1C) (Fig.1b) (Fig. 1d). Con estos resultados se demuestra que la renina y su receptor se encuentran incrementados en los lavados bronquiolo-alveolares de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática lo cual sugiere que ambos son generados localmente en el pulmón y podrían estar influenciado los procesos fibróticos de los pacientes.

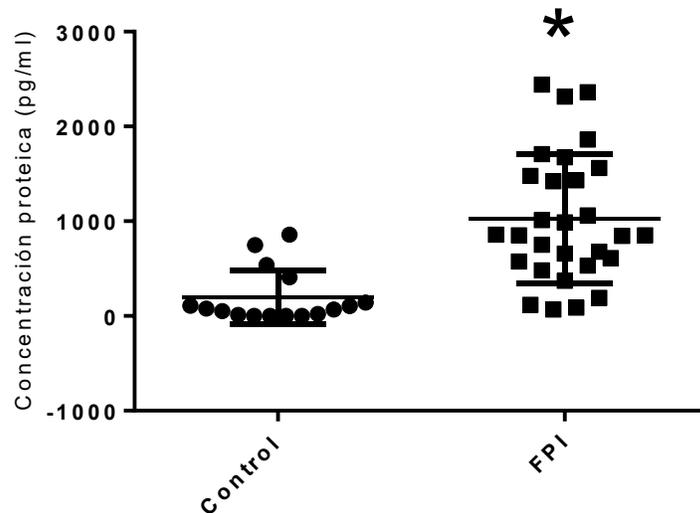


**Figura 7. Densidad media óptica de la renina y su receptor. (a) y (b).** Fotografía representativa de las membranas de los gels de la renina y su receptor soluble de la renina; **(c) y (d)** Análisis estadístico de la DMO de las bandas observadas de la renina y su receptor en las muestras con FPI y control. La renina está incrementada en lavados bronquiolo-alveolares de pacientes con FPI (n=11) vs control (n=11) \*  $P < 0.0015$  y  $P < 0.05$  respectivamente utilizando una prueba t de student.

### La renina está incrementada en sueros de pacientes con FPI

A través de una ELISA se evaluaron las muestras de suero de 17 sujetos control contra 29 muestras de pacientes con FPI. La comparación entre ambos grupos por medio de una prueba estadística (*t* de student,  $p < 0.05$ ) arroja que existe un incremento significativo en los valores de renina de los pacientes con FPI en comparación del grupo control (Fig. 8).

## ELISA para la renina en suero

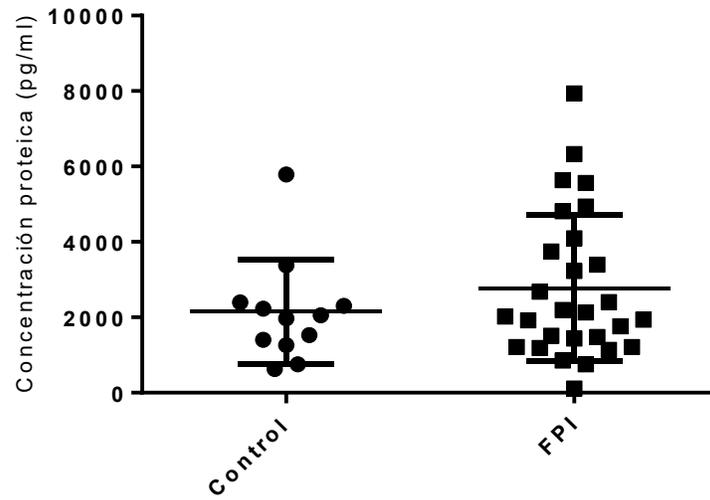


**Figura 8.** Comparación de los niveles séricos de renina entre pacientes del grupo control (n:17) contra los pacientes de fibrosis pulmonar idiopática (n:29). \* ( $p > 0.05$ )

### La expresión del receptor soluble de la renina en sueros pacientes con FPI no está incrementado

A través de una ELISA se cuantificaron los niveles séricos del receptor soluble de la renina en 12 pacientes control contra 28 pacientes con FPI (Fig.9). El análisis estadístico no muestra una diferencia significativa entre los niveles del receptor soluble de la renina, éstos se mantienen prácticamente iguales en el grupo control y el FPI.

### ELISA para el receptor soluble de la renina en suero



**Figura 9.** Los niveles del receptor soluble no muestran una diferencia significativa entre el grupo control (n:11) y el grupo fibrótico (n:27).

## Análisis de resultados

Los mecanismos moleculares que subyacen a la fibrosis pulmonar idiopática siguen siendo inciertos, pudiendo resultar de una compleja interacción celular y molecular entre los factores de crecimiento, las quimiocinas y las citocinas. Para tratar de esclarecer los mecanismos patogénicos de la enfermedad se ha analizado al sistema de renina-angiotensina, mediante su efector principal, la Ang II, y su efecto en la estimulación de factores de crecimiento como PDGF, CTGF y TGF- $\beta$ 1 por medio de su receptor AT<sub>1</sub><sup>56</sup>; sin embargo, dentro del conjunto de proteínas que conforman al sistema renina-angiotensina, la Ang II no es la única que puede incrementar al TGF- $\beta$ 1, principal promotor de la fibrosis, ya que a través de estudios *in vitro* en fibroblastos pulmonares se sugiere que la renina por medio de la activación del receptor de renina/prorenina sea un mediador profibrótico independiente a Ang II<sup>18</sup>.

Los trabajos que evalúan los componentes de sistema renina-angiotensina en FPI son escasos; en este trabajo por primera vez se están reportando los niveles de la renina y de su receptor soluble en lavados bronquiolo-alveolares de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. Como se observaron mayores niveles de ambas proteínas se sugiere que existe una generación local de éstos; lo anterior se ha reportado con los otros componentes del SRA como son: el angiotensinógeno, el receptor tipo 1 y 2 de la angiotensina II en ratón y en tejido pulmonar humano.<sup>57</sup>

En este contexto, se ha reportado en lavados bronquiolo-alveolares que el angiotensinógeno se encuentra disminuido<sup>58</sup>, pero en otros estudios señalan una elevada expresión de esta proteína en células epiteliales pulmonares lesionadas con la consecuente producción de Ang II y activación de los miofibroblastos, que a su vez sintetizan más proteínas de la matriz extracelular<sup>59</sup>. También se ha reportado el incremento de la expresión de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) en lavados, responsable de la mayor cantidad de Ang II disponible circulante<sup>60, 61</sup>.

Aunque hasta ahora no ha sido particularmente investigada la presencia de la renina en LBA, sí se ha descubierto la sobreexpresión de otra molécula análoga a la renina en lavados bronquioloalveolares, la catepsina D, esta molécula puede aceptar directamente

al angiotensinógeno y producir Ang I o Ang II. La catepsina D se ha visto involucrada en procesos de remodelación que ocurren durante la fibrinogénesis, y a la renina como factor que estimula la producción de TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos pulmonares a través de una vía independiente a la Ang II. <sup>18, 62, 63</sup>

En este trabajo además reportamos que en el suero de pacientes con FPI la renina está sobreexpresada y debido a los diferentes hallazgos en varios tejidos acerca de los efectos profibróticos de la renina es relevante tratar de esclarecer su función en la progresión de la fibrosis; por esto, Krebs y col., descubrieron en un modelo de hipertensión de ratones Goldblatt a la renina y su ARNm elevados en plasma, además de estar colocalizado junto con su receptor de membrana en los túbulos de los riñones de las ratas, argumentando que los daños túbulo-intersticiales debido a la fibrosis puede ser causado por la unión de la renina junto con el PRR ya que refuerza la formación de Ang II, principal promotor de SRA, que puede activar varias rutas fibróticas <sup>64</sup>.

Por otro lado, este incremento en suero puede demostrar la participación directa de la renina en la progresión de la fibrosis ya que Wang y col. demostraron que la inhibición de la renina por medio del fármaco Aliskiren en un modelo *in vivo* con ratones transgénicos que segregan continuamente renina activa desde el hígado anula la inducción de factores profibróticos (TGF- $\beta$ 1 y CTGF), marcadores de miofibroblastos ( $\alpha$ -SMA) y proteínas del ECM (fibronectina, colágeno I y III) <sup>12</sup>, mejorando así la estructura pulmonar del ratón.

En contraste, para determinar que los efectos de la renina no eran solamente por su capacidad enzimática sino por la unión con su receptor, Huang y Cols, en un modelo *in vivo* en células mesangiales de ratón transfectadas con siRNA para el PRR, observaron un decremento en los niveles de TGF- $\beta$ 1 que a su vez disminuyó la expresión de otras moléculas pro-fibróticas (PAI-1, FN y colágeno tipo-1), indicando que en las células mesangiales, el PRR media el incremento inducido por la renina de la expresión de TGF- $\beta$ 1 <sup>65</sup>.

Como se mencionó, en este trabajo se muestra por primera vez que la concentración proteica del receptor de prorrenina en lavados bronquiolo alveolares de pacientes con

FPI está aumentada. Estos resultados pueden sorprender debido a que existe un contraste en la literatura respecto al incremento y la actividad del PRR; por una parte, en un modelo *in vivo* de ratones transgénicos que sobre expresan PRR, apuntan que no existe algún daño histológico significativo en el riñón, también que no se sobreexpresan marcadores fibróticos tales como CCL2 y PAI-1, además de la renina, a comparación de la cepa silvestre, debido tal vez a la desregulación efectuada por la prorrenina <sup>66</sup>; y por otra parte, en otro experimento, en un modelo *in vitro* se utilizó la línea celular del conducto colector renal de ratón M-1, donde a través de la estimulación con prorrenina recombinante, pudo incrementar los niveles proteicos y del ARNm de algunos factores profibróticos (CTGF, TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA y PAI-1, fibronectina y colágeno 1) a través de la activación de la vía de señalización ROS dependiente de MAPK <sup>67</sup>.

Podríamos suponer que la sobreexpresión singular del PRR puede ser, además de la renina, un marcador para indicar que se está iniciando o ha comenzado un proceso fibrótico, pero si sumamos la evaluación de la renina con su receptor se puede acentuar la importancia de la unión renina-PRR para poder desencadenar la producción de moléculas profibróticas a través de diversas rutas moleculares independientes a Ang II.

Clavreul y col; observaron que la renina y la prorrenina por medio de la unión con su receptor podían producir estrés oxidativo en células embrionarias de riñón humano y como consecuencia generaban la expresión de genes profibróticos (TGF- $\beta$ 1, fibronectina y PAI-1) a través de la vía de señalización PRR/Nox4, una vía dependiente de ROS, siendo Nox4 la isoforma predominante del complejo enzimático NADPH y la forma más expresada en células mesangiales y epiteliales <sup>68</sup>. Lo anterior sugiere un papel importante de la unión renina/PRR en la activación de ROS para la producción de moléculas profibrosantes y el desarrollo de la fibrosis; sugerencia que fue llevada a cabo experimentalmente en lavados pulmonares de ratón por Manoury y col., y ellos apuntaron que en ausencia de las especies reactivas de oxígeno en ratones (p47<sup>phox</sup> -/- KO, subunidad del complejo NADPH oxidasa) en un modelo de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina no desarrollaban fibrosis pulmonar <sup>69</sup>. Así mismo, la ingesta de antioxidantes previo a la instilación de bleomicina es efectivo en la reducción de daño pulmonar, la reducción de los niveles de hidroxiprolina (un marcador del depósito de

colágeno) y la reducción considerable de los niveles de NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción que regula varios genes de citocinas, incluidos TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y MIP-2 <sup>70</sup>, genes proinflamatorios y profibróticos involucrados en el desarrollo y la progresión de la fibrosis pulmonar.

Cabe apuntar que la terapia con antioxidantes o promotores de antioxidantes en pacientes con FPI puede reestablecer la capacidad antioxidativa del tracto respiratorio, además de evitar la exposición a una mayor cantidad de radicales libres culminando en el agravamiento de la enfermedad <sup>71</sup>.

La evaluación del receptor soluble de la prorrenina en suero no tuvo una diferencia significativa en comparación al grupo control, se esperaba que el sPRR pudiera incrementar la actividad de la renina y/o activar a la prorrenina. En nuestros resultados obtuvimos un incremento significativo de la renina en suero y de su receptor en lavados bronquioloalveolares; se ha reportado que el sPRR en pacientes con una diferencia de grados de la actividad del SRA es independiente de las concentraciones de la renina y la prorrenina en suero. <sup>72</sup>

Si bien el sPRR se forma a partir de la escisión del PRR completo en el citoplasma antes de que éste sea anclado a la membrana celular, se podría suponer que un aumento en la expresión del PRR puede ser proporcional al aumento en el receptor soluble.

En este estudio el receptor soluble no podría dirigirnos a determinar con precisión un paciente con FPI; sin embargo, en otros estudios ha servido como marcador de fibrosis tubulointersticial <sup>51</sup>, diabetes Mellitus gestacional <sup>73</sup> y restricción en el crecimiento intrauterino <sup>74</sup>. Además, recientemente se ha encontrado que [s]PRR tiene una correlación con las toxinas urémicas en pacientes con enfermedades renales crónicas (del inglés chronic kidney disease), en especial con el induxil sulfato, una toxina urémica representativa que se acumula en los pacientes con CKD que induce, entre otras cosas, expresión de genes fibróticos como TGF- $\beta$ 1 y colágeno-I en el riñón, así como la expresión de  $\alpha$ -sma en las células tubulares proximales a través de PRR <sup>75</sup>, por lo que cabría suponer que a mayor concentración de [s]PRR, mayor concentración de induxil sulfato y un aumento de concentración de proteínas fibróticas.

Con estos datos y con la información extraída de la literatura nos acercamos a proponer las relaciones que tiene el sistema renina angiotensina entre los demás elementos, que juntos, contribuyen al desarrollo de la fibrosis pulmonar. Aunque cabe aclarar que aun cuando la mayoría de las investigaciones tienen lugar en el riñón, siendo el sitio donde se produce la mayor cantidad de los elementos del SRA, es imperativo detallar este sistema en la fibrosis pulmonar ya que es una enfermedad en constante aumento de casos y en constante aumento de decesos.

Por otro lado, con este trabajo se aportó la base para poder trasladar estas mediciones a una cohorte de pacientes con FPI más amplia y posteriormente adicionando pacientes con otras ILD para así evaluar la utilidad de la renina y su receptor soluble como un biomarcador diagnóstico o pronóstico a futuro, ya que como se mencionó al principio de este trabajo debido a la complejidad del diagnóstico y detección es prioritaria la necesidad de encontrar moléculas que puedan servir para este propósito.

## **CONCLUSIONES**

- En los lavados bronquiolo-alveolares de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática la renina y el receptor soluble de la prorenina están elevados; a su vez, la renina está elevada en suero.
- Es posible aprovechar la evaluación de la renina y el receptor de prorenina como un biomarcador diagnóstico para la fibrosis pulmonar idiopática.
- El receptor soluble de la renina no está elevado en suero de pacientes con FPI, por lo tanto, no es posible su uso como biomarcador para diagnosticar a la FPI, reiterando la falta de evaluaciones de su utilidad con otras ILD como lo es la neumonitis por hipersensibilidad.

## **PERSPECTIVAS**

- Aumentar la cantidad de pacientes y comparar los niveles de la renina y su receptor soluble en el suero de pacientes con FPI y otras ILD.
- Evaluar al sPRR en plasma de controles y pacientes con FPI para saber si existen diferencias significativas en este tipo de muestra.
- Correlacionar los niveles de la renina y su receptor soluble con las variables clínicas de los pacientes con FPI.
- Cuantificar los niveles de los elementos de SRA en pacientes con FPI en sus diferentes estadios en diferentes muestras biológicas.

## REFERENCIAS

- 1 Franquet, T. and Gimenez, A. "Idiopathic interstitial pneumonias," *Radiologia* **54** (6), 479-489 (2012).
- 2 N. Sverzellati, D. A. Lynch, D. M. Hansell, T. Johkoh, T. E. King, Jr., and W. D. Travis, "American Thoracic Society-European Respiratory Society Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias: Advances in Knowledge since 2002," *Radiographics* **35** (7), 1849-1871 (2015).
- 3 M. H. Branton and J. B. Kopp, "TGF-beta and fibrosis," *Microbes Infect* **1** (15), 1349-1365 (1999).
- 4 R. M. Liu, "Oxidative stress, plasminogen activator inhibitor 1, and lung fibrosis," *Antioxid Redox Signal* **10** (2), 303-319 (2008).
- 5 Luz Silvera and Carmen Barrios, "La matriz extracelular: el ecosistema de la célula," *Revista Científica Salud Uninorte* **16** (2012).
- 6 María del Carmen Díaz Galindo, Abraham Loera Muro, Flor Yazmín Ramírez Castillo, Roxanne Olvera Farías, and Alma Lilián Guerrero-Barrera, "Matriz extracelular:¿ es el andamio de los tejidos?," *Investigación y Ciencia* **20** (56), 53-60 (2012).
- 7 Stephan W Glasser, James S Hagood, Simon Wong, Carmen A Taype, Satish K Madala, and William D Hardie, "Mechanisms of Lung Fibrosis Resolution," *The American journal of pathology* **186** (5), 1066-1077 (2016).
- 8 M. S. Wilson and T. A. Wynn, "Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation," *Mucosal Immunol* **2** (2), 103-121 (2009).
- 9 TA Wynn, "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis," *The Journal of pathology* **214** (2), 199-210 (2008).
- 10 A. Pardo and M. Selman, "Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis," *Front Biosci* **7**, d1743-1761 (2002).
- 11 A. N. Lekkerkerker, J. Aarbiou, T. van Es, and R. A. Janssen, "Cellular players in lung fibrosis," *Curr Pharm Des* **18** (27), 4093-4102 (2012).
- 12 J. Wang, L. Chen, B. Chen, A. Meliton, S. Q. Liu, Y. Shi, T. Liu, D. K. Deb, J. Solway, and Y. C. Li, "Chronic Activation of the Renin-Angiotensin System Induces Lung Fibrosis," *Sci Rep* **5**, 15561 (2015).
- 13 José O Barreto-Rodríguez, Mayra E Mejía, and Ivette Buendía-Roldán, "Panorama actual de la fibrosis pulmonar idiopática en México," *Neumología y cirugía de tórax* **74** (4), 256-261 (2015).
- 14 Moises Selman and Annie Pardo, "The epithelial/fibroblastic pathway in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: tying loose ends," *American journal of respiratory cell and molecular biology* **29** (3), S93 (2003).
- 15 T. E. King, Jr., A. Pardo, and M. Selman, "Idiopathic pulmonary fibrosis," *Lancet* **378** (9807), 1949-1961 (2011).
- 16 Álvaro Undurraga, "FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA," *Revista Médica Clínica Las Condes* **26** (3), 292-301 (2015).
- 17 G. Diaz-Pina, E. Montes, M. Checa, C. Becerril, C. Garcia de Alba, A. Vega, I. Paramo, R. Ordonez-Razo, and V. Ruiz, "Profibrosing effect of angiotensin converting enzyme inhibitors in human lung fibroblasts," *Lung* **193** (2), 199-202 (2015).
- 18 Eduardo Montes, Víctor Ruiz, Marco Checa, Vilma Maldonado, J Melendez-Zajgla, Martha Montañó, R Ordonez-Razo, Jose Cisneros, Carolina García-de-Alba, and Annie Pardo, "Renin is an angiotensin-independent profibrotic mediator: role in pulmonary fibrosis," *European Respiratory Journal* **39** (1), 141-148 (2012).

- 19 Matthew W Parker, Daniel Rossi, Mark Peterson, Karen Smith, Kristina Sikström, Eric S White, John E Connett, Craig A Henke, Ola Larsson, and Peter B Bitterman, "Fibrotic extracellular matrix activates a profibrotic positive feedback loop," *The Journal of clinical investigation* **124** (4), 1622-1635 (2014).
- 20 Brett Ley and Harold R Collard, "Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis," *Clinical epidemiology* **5**, 483 (2013).
- 21 Fernando J Martinez, Harold R Collard, Annie Pardo, Ganesh Raghu, Luca Richeldi, Moises Selman, Jeffrey J Swigris, Hiroyuki Taniguchi, and Athol U Wells, "Idiopathic pulmonary fibrosis," *Nature Reviews Disease Primers* **3**, 17074 (2017).
- 22 Luca Richeldi, Harold R Collard, and Mark G Jones, "Idiopathic pulmonary fibrosis," *The Lancet* **389** (10082), 1941-1952 (2017).
- 23 Justin C Hewlett, Jonathan A Kropski, and Timothy S Blackwell, "Idiopathic pulmonary fibrosis: Epithelial-mesenchymal interactions and emerging therapeutic targets," *Matrix Biology* (2018).
- 24 Manfred Kopf, Christoph Schneider, and Samuel P Nobs, "The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells," *Nature immunology* **16** (1), 36 (2015).
- 25 Huiping Li, "The alveolar epithelium and pulmonary fibrosis," *J Epithel Biol Pharmacol* **2**, 30-35 (2009).
- 26 Paul J Wolters, Harold R Collard, and Kirk D Jones, "Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis," *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **9**, 157-179 (2014).
- 27 JV Barbas-Filho, MA Ferreira, A Sesso, RA Kairalla, CRR Carvalho, and VL Capelozzi, "Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IFP)/usual interstitial pneumonia (UIP)," *Journal of clinical pathology* **54** (2), 132-138 (2001).
- 28 Nasreen Khalil, Robert N O'Connor, Helmut W Unruh, Peter W Warren, Kathleen C Flanders, Angela Kemp, Oliver H Berezney, and Arnold H Greenberg, "Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor- $\beta$  in idiopathic pulmonary fibrosis," *Am J Respir Cell Mol Biol* **5**, 155-162 (1991).
- 29 Isis E Fernandez and Oliver Eickelberg, "The impact of TGF- $\beta$  on lung fibrosis: from targeting to biomarkers," *Proceedings of the American Thoracic Society* **9** (3), 111-116 (2012).
- 30 Xiao-ming Meng, David J Nikolic-Paterson, and Hui Yao Lan, "TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis," *Nature Reviews Nephrology* **12** (6), 325 (2016).
- 31 Raghu Kalluri and Robert A Weinberg, "The basics of epithelial-mesenchymal transition," *The Journal of clinical investigation* **119** (6), 1420-1428 (2009).
- 32 Brigham C Willis, Roland M duBois, and Zea Borok, "Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung," *Proceedings of the American Thoracic Society* **3** (4), 377-382 (2006).
- 33 Sem H Phan, "The myofibroblast in pulmonary fibrosis," *Chest* **122** (6), 286S-289S (2002).
- 34 Bruce D Uhal, Jong Kyong Kim, Xiaopeng Li, and Maria Molina-Molina, "Angiotensin-TGF- $\beta$ 1 crosstalk in human idiopathic pulmonary fibrosis: autocrine mechanisms in myofibroblasts and macrophages," *Current pharmaceutical design* **13** (12), 1247-1256 (2007).
- 35 Rongi Wang, Carlos Ramos, Iravati Joshi, Alex Zagariya, Annie Pardo, Moises Selman, and Bruce D Uhal, "Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides," *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **277** (6), L1158-L1164 (1999).
- 36 H Nishimura, H Tsuji, H Masuda, K Nakagawa, Y Nakahara, H Kitamura, T Kasahara, T Sugano, M Yoshizumi, and S Sawada, "Angiotensin II increases plasminogen activator inhibitor-1 and tissue factor mRNA expression without changing that of tissue type plasminogen activator or tissue factor pathway inhibitor in cultured rat aortic endothelial cells," *Thrombosis and haemostasis* **77** (6), 1189-1195 (1997).

- 37 Geneviève Nguyen and Aurélie Contrepas, "The (pro) renin receptors," *Journal of Molecular Medicine* **86** (6), 643-646 (2008).
- 38 Peter M Abadir, Jeremy D Walston, and Robert M Carey, "Subcellular characteristics of functional intracellular renin-angiotensin systems," *Peptides* **38** (2), 437-445 (2012).
- 39 Manne Krop, Xifeng Lu, AH Jan Danser, and Marcel E Meima, "The (pro) renin receptor. A decade of research: what have we learned?," *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **465** (1), 87-97 (2013).
- 40 Eduardo Montes Martínez, "Receptor renina/prorenina y su relación con la fibrosis pulmonar idiopática," *Neumología y Cirugía de Tórax* **69** (2), 116-122 (2010).
- 41 A. H. Danser, "Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions," *Int J Biochem Cell Biol* **35** (6), 759-768 (2003).
- 42 Maria Francisca Coutinho, Maria João Prata, and Sandra Alves, "Mannose-6-phosphate pathway: a review on its role in lysosomal function and dysfunction," *Molecular genetics and metabolism* **105** (4), 542-550 (2012).
- 43 Pablo Gómez-Fernández, Javier Nieto, and Nicolás Roberto Robles, "La pro-renina y su receptor. Papel de la inhibición directa de la renina," *Revista española de cardiología suplementos* **11**, 8-12 (2011).
- 44 Mark MED van den Eijnden, Jasper J Saris, René JA de Bruin, Elly de Wit, Wim Sluiter, Timothy L Reudelhuber, Maarten ADH Schalekamp, Frans HM Derkx, and AH Jan Danser, "Prorenin accumulation and activation in human endothelial cells: importance of mannose 6-phosphate receptors," *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **21** (6), 911-916 (2001).
- 45 Genevieve Nguyen and Dominik N Muller, "The biology of the (pro) renin receptor," *Journal of the American Society of Nephrology* **21** (1), 18-23 (2010).
- 46 Genevieve Nguyen and AH Danser, "Prorenin and (pro) renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents," *Experimental physiology* **93** (5), 557-563 (2008).
- 47 Genevieve Nguyen, Françoise Delarue, Céline Burcklé, Latifa Bouzahir, Thomas Giller, and Jean-Daniel Sraer, "Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin," *The Journal of clinical investigation* **109** (11), 1417-1427 (2002).
- 48 Y Huang, NA Noble, J Zhang, C Xu, and WA Border, "Renin-stimulated TGF- $\beta$ 1 expression is regulated by a mitogen-activated protein kinase in mesangial cells," *Kidney international* **72** (1), 45-52 (2007).
- 49 Christelle Cousin, Diane Bracquart, Aurelie Contrepas, Pierre Corvol, Laurent Muller, and Genevieve Nguyen, "Soluble Form of the (Pro)Renin Receptor Generated by Intracellular Cleavage by Furin Is Secreted in Plasma," *Hypertension* **53** (6), 1077-1082 (2009).
- 50 G. Nguyen, "Renin and prorenin receptor in hypertension: what's new?," *Curr Hypertens Rep* **13** (1), 79-85 (2011).
- 51 Naro Ohashi, Shinsuke Isobe, Sayaka Ishigaki, Takahisa Suzuki, Takamasa Iwakura, Masafumi Ono, Tomoyuki Fujikura, Takayuki Tsuji, Atsushi Otsuka, and Yasuo Ishii, "Plasma soluble (pro) renin receptor reflects renal damage," *PloS one* **11** (5), e0156165 (2016).
- 52 A. U. Wells, "The revised ATS/ERS/JRS/ALAT diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)--practical implications," *Respir Res* **14 Suppl 1**, S2 (2013).
- 53 Dugeshwar Karley, Deepesh Gupta, and Archana Tiwari, "Biomarkers: The future of medical science to detect cancer," *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis* **2011** (2012).
- 54 Lucía Silva Fernández, Carmen Barbadillo Mateos, Mónica Fernández Castro, and Teresa Otón Sánchez, "Los otros biomarcadores.¿ Qué debe saber el reumatólogo?," *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología* **12** (3), 67-72 (2011).

- 55 Argyris Tzouvelekis, George Kouliatsis, Stavros Anevlavis, and Demosthenes Bouros, "Serum biomarkers in interstitial lung diseases," *Respiratory research* **6** (1), 1 (2005).
- 56 Richard P Marshall, Peter Gohlke, Rachel C Chambers, David C Howell, Steve E Bottoms, Thomas Unger, Robin J McAnulty, and Geoffrey J Laurent, "Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury," *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **286** (1), L156-L164 (2004).
- 57 Richard P Marshall, "The pulmonary renin-angiotensin system," *Current pharmaceutical design* **9** (9), 715-722 (2003).
- 58 Claudia Landi, Elena Bargagli, Alfonso Carleo, Laura Bianchi, Assunta Gagliardi, Antje Prasse, Maria G Perari, Rosa M Refini, Luca Bini, and Paola Rottoli, "A system biology study of BALF from patients affected by idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and healthy controls," *PROTEOMICS-Clinical Applications* **8** (11-12), 932-950 (2014).
- 59 Bruce D Uhal, Xiaopeng Li, Christopher C Piasecki, and Maria Molina-Molina, "Angiotensin signalling in pulmonary fibrosis," *The international journal of biochemistry & cell biology* **44** (3), 465-468 (2012).
- 60 Ulrich Specks, William J Martin, and Michael S Rohrbach, "Bronchoalveolar lavage fluid angiotensin-converting enzyme in interstitial lung diseases," *American Review of Respiratory Disease* **141** (1), 117-123 (1990).
- 61 Soo-Taek Uh, Tae-Hoon Kim, Eun-Young Shim, An-Soo Jang, Sung-Woo Park, Jong-Sook Park, Byung-Lae Park, Byoung Whui Choi, Hyoung Doo Shin, and Dong Soon Kim, "Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms are associated with idiopathic pulmonary fibrosis," *Lung* **191** (4), 345-351 (2013).
- 62 Isabelle Noël-Georis, Alfred Bernard, Paul Falmagne, and Ruddy Wattiez, "Database of bronchoalveolar lavage fluid proteins," *Journal of Chromatography B* **771** (1), 221-236 (2002).
- 63 Ali Nehme, Catherine Cerutti, Nedra Dhaouadi, Marie Paule Gustin, Pierre-Yves Courand, Kazem Zibara, and Giampiero Bricca, "Atlas of tissue renin-angiotensin-aldosterone system in human: A transcriptomic meta-analysis," *Scientific reports* **5** (2015).
- 64 Christian Krebs, Inge Hamming, S Sadaghiani, OM Steinmetz, Catherine Meyer-Schwesinger, S Fehr, RAK Stahl, IM Garrelds, AHJ Danser, and Harry van Goor, "Antihypertensive therapy upregulates renin and (pro) renin receptor in the clipped kidney of Goldblatt hypertensive rats," *Kidney international* **72** (6), 725-730 (2007).
- 65 Y Huang, S Wongamorntham, J Kasting, D McQuillan, RT Owens, L Yu, NA Noble, and W Border, "Renin increases mesangial cell transforming growth factor- $\beta$ 1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms," *Kidney international* **69** (1), 105-113 (2006).
- 66 Alva Rosendahl, Gianina Niemann, Sascha Lange, Erfan Ahadzadeh, Christian Krebs, Aurelie Contrepas, Harry Van Goor, Thorsten Wiech, Michael Bader, and Michael Schwake, "Increased expression of (pro) renin receptor does not cause hypertension or cardiac and renal fibrosis in mice," *Laboratory Investigation* **94** (8), 863 (2014).
- 67 Alexis A Gonzalez, Leonardo Zamora, Cristian Reyes-Martinez, Nicolas Salinas-Parra, Nicole Roldan, Catherina A Cuevas, Stefanny Figueroa, Alex Gonzalez-Vergara, and Minolfa C Prieto, "(pro) renin receptor activation increases profibrotic markers and fibroblast-like phenotype through Mapk-dependent Ros formation in mouse renal collecting duct cells," *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (2017).
- 68 Nicolas Clavreul, Patricia Sansilvestri-Morel, Delphine Magard, Tony J Verbeuren, and Alain Rupin, "(Pro) renin promotes fibrosis gene expression in HEK cells through a Nox4-dependent mechanism," *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **300** (6), F1310-F1318 (2011).

- 69 Boris Manoury, Soazig Nenan, Olivier Leclerc, Isabelle Guenon, Elisabeth Boichot, Jean-Michel Planquois, Claude P Bertrand, and Vincent Lagente, "The absence of reactive oxygen species production protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis," *Respiratory research* **6** (1), 11 (2005).
- 70 A Serrano-Mollar, D Closa, N Prats, S Blesa, M Martinez-Losa, J Cortijo, JM Estrela, EJ Morcillo, and O Bulbena, "In vivo antioxidant treatment protects against bleomycin-induced lung damage in rats," *British journal of pharmacology* **138** (6), 1037-1048 (2003).
- 71 Alain Meyer, R Buhl, and H Magnussen, "The effect of oral N-acetylcysteine on lung glutathione levels in idiopathic pulmonary fibrosis," *European Respiratory Journal* **7** (3), 431-436 (1994).
- 72 Geneviève Nguyen, Anne Blanchard, Emmanuel Curis, Damien Bergerot, Yann Chambon, Takuo Hirose, Aurore Caumont-Prim, Sylvie Brailly Tabard, Stéphanie Baron, and Michael Frank, "Plasma soluble (pro) renin receptor is independent of plasma renin, prorenin, and aldosterone concentrations but is affected by ethnicity," *Hypertension, HYPERTENSIONAHA*. 113.02217 (2013).
- 73 Shokoufeh Bonakdaran, Ghazaleh Azami, Fatemeh Tara, and Leila Poorali, "Soluble (Pro) renin receptor is a predictor of gestational diabetes mellitus," *Current diabetes reviews* **13** (6), 555-559 (2017).
- 74 Noriyoshi Watanabe, Satoshi Morimoto, Takeo Fujiwara, Tomo Suzuki, Kosuke Taniguchi, Takashi Ando, Tadashi Kimura, Haruhiko Sago, and Atsuhiro Ichihara, "Association between soluble (Pro) renin receptor concentration in cord blood and small for gestational age birth: a cross-sectional study," *PloS one* **8** (3), e60036 (2013).
- 75 Kaori Narumi, Emiko Sato, Takuo Hirose, Tae Yamamoto, Takashi Nakamichi, Mariko Miyazaki, Hiroshi Sato, and Sadayoshi Ito, "(Pro) renin receptor is involved in mesangial fibrosis and matrix expansion," *Scientific reports* **8** (1), 16 (2018).