



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**  
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS  
ISOFORMAS DEL TGF- $\beta$  POR LA  
ANGIOTENSINA II EN CÉLULAS  
ESTRELLADAS HEPÁTICAS

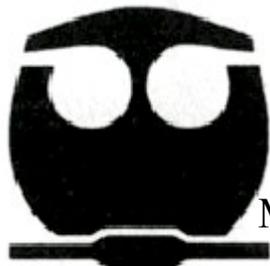
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A :**

**PAOLA MORENO ALVAREZ**

Tutor: DRA. MARINA MACÍAS SILVA



MÉXICO, D. F.

Febrero 2007



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.

# REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL TGF- $\beta$ POR LA ANGIOTENSINA II EN CÉLULAS ESTRELLADAS HEPÁTICAS

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Marina Macías Silva en el laboratorio 225-N, del Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Marina Macías Silva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Ma. Eugenia Torres Márquez	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Bertha González Pedrajo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dra. Claudia González Espinosa y de la M. en C. Jaciel Medina Tamayo, del Departamento de Farmacobiología de Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos del ensayo de protección a la RNasa (RPA).

Se reconoce la asesoría técnica de la Biol. Marcela Sosa, del Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular.

El proyecto fue apoyado por CONACYT (49493-Q), DGAPA (IN-214206) y Fundación Miguel Alemán A.C. Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen de grado estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Ma. Eugenia Torres Márquez	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dr. Rogelio Hernández Pando	Instituto Nacional de Nutrición
Suplente	Dra. Bertha González Pedrajo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. Marco A. Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM

## ÍNDICE

Índice de Figuras	iii
Abreviaturas	iv
Resumen	v
I. INTRODUCCIÓN	1
A. Angiotensina II	1
B. Receptores para angiotensina II	3
B.1 Receptores AT1	4
B.2 Vías de señalización acopladas a los AT1	4
C. Participación de la AII en la fibrosis	7
D. Patogénesis de la fibrosis hepática	8
D.1 La AII y la fibrosis hepática	11
E. Células estrelladas hepáticas (HSC)	11
E.1 Activación de las HSC	12
E.2 Las HSC y su participación en la fibrosis hepática	13
F. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ )	14
F.1 Vías de señalización del TGF- $\beta$	15
F.2 Participación del TGF- $\beta$ en la modulación de la matriz extracelular y la fibrosis	16
II. ANTECEDENTES	19
III. HIPÓTESIS	20
IV. OBJETIVOS	20
V. MATERIAL Y MÉTODOS	21

1. Cultivo primario de células estrelladas hepáticas	21
2. Inmunocitoquímica	22
3. Aislamiento de RNA y ensayo de protección a la RNasa (RPA)	22
4. Inmunoblots	23
VI. RESULTADOS	25
1. Expresión de $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -sma) en HSC de 7 días de cultivo	25
2. La Angiotensina II induce la expresión de las isoformas del TGF- $\beta$ en HSC	26
3. Activación de ERK1/2, de p38 y Akt por la Angiotensina II en HSC	28
4. La fosforilación de ERK1/2 es a través del receptor AT1	30
5. Participación de PKC en la activación de ERK1/2 por All en HSC	31
6. Participación de NADPH oxidasa en la activación de ERK1/2 por All en HSC	33
VII. DISCUSIÓN	34
VIII. CONCLUSIONES	40
IX. PERSPECTIVAS	41
X. REFERENCIAS	42

ÍNDICE DE FIGURAS	Pág.
Figura 1. El Sistema Renina-Angiotensina	2
Figura 2. Diagrama esquemático de las diferentes vías de señalización activadas por la Angiotensina II a través de su receptor AT1.	5
Figura 3. Esquema de un lobulillo hepático	9
Figura 4. Expresión de $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -sma) en células estrelladas hepáticas (HSC)	26
Figura 5. Expresión del RNAm de las isoformas del TGF- $\beta$ inducida por All en HSC de 7 días	27
Figura 6. Fosforilación de ERK1/2 por All en HSC/MFB	29
Figura 7. Fosforilación y activación de p38 y Akt por All en HSC	30
Figura 8. La activación de ERK1/2 por All en HSC de 13 días es a través de AT1.	31
Figura 9. La activación de ERK1/2 por All en HSC de 13 días no es a través de la activación del receptor a EGF (EGFR).	32
Figura 10. Participación de PKC en la activación de ERK1/2 por All en HSC de 13 días	32
Figura 11. Participación de la NADPH oxidasa en la activación de ERK1/2 por All en HSC de 13 días	33
Figura 13. Modelo de activación de la expresión del TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 por la Angiotensina II en células estrelladas hepáticas de rata	39

## Abreviaturas Usadas

ACE	Enzima convertidora de Angiotensina I
AI	Angiotensina I
AII	Angiotensina II
AIII	Angiotensina III
AIV	Angiotensina IV
AP-1	Proteína activadora 1
$\alpha$ -sma	$\alpha$ -actina de músculo liso
AT1	Receptores tipo 1 a angiotensina II
AT2	Receptores tipo 2 a angiotensina II
BIM	Bisindolilmaleimida
CAGE	Enzima generadora de AII sensible a quimostatina
DMEM	Medio esencial mínimo de Dulbecco
DPI	Difenileneiodonio
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor al factor de crecimiento epidérmico
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HB-EGF	Factor de crecimiento tipo EGF que une heparina
HSC	Células estrelladas hepáticas
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1
MEC	Matriz extracelular
MFB	Miofibroblastos
MMPs	Metaloproteasas
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa-B
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
PLA2	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
ROS	Especies reactivas del oxígeno
STA	Estauosporina
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante- $\beta$
TIMPs	Inhibidores de metaloproteasas
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
VMSC	Células de músculo liso vascular

## Resumen

La Angiotensina II (AII) es una hormona peptídica que controla varios procesos fisiológicos como la presión sanguínea y el balance electrolítico. La AII se identificó también como un factor de crecimiento y un factor proinflamatorio para distintos tipos celulares. Desde hace varios años se ha descrito su participación en el desarrollo de fibrosis renal, hepática y pancreática, entre otros. El factor de crecimiento transformante-beta (TGF- $\beta$ ) es uno de los principales factores fibrogénicos, ya que participa en la regulación de la producción de la matriz extracelular (MEC) y además en el crecimiento y la quimiotaxis de fibroblastos. Esencialmente, es por medio de este factor que la AII media sus acciones profibróticas. Las células estrelladas hepáticas (HSC) son las principales células involucradas en fenómenos inflamatorios y fibróticos dentro del hígado; la AII y el TGF- $\beta$  en estas células inducen su proliferación y la producción de varios componentes de la MEC. En este trabajo encontramos que en HSC de 7 días de cultivo la AII induce la expresión de 2 isoformas del TGF- $\beta$  al observar un aumento en los niveles de su RNAm. TGF- $\beta$ 3 es la primera isoforma en expresarse, su RNAm aumenta 2 veces con respecto al control, la isoforma 2 aumenta paulatinamente hasta llegar a su pico máximo a las 24 hrs con un aumento de 2.4 veces con respecto al control. Estudiando las posibles vías de señalización involucradas en la expresión de las isoformas del TGF- $\beta$ , encontramos que la estimulación con AII de HSC induce la fosforilación de p38, Akt y de ERK1/2. La activación de ERK1/2 a través del receptor de AII tipo I (AT1) es independiente de la transactivación del receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Además, se encontró que en la activación de ERK1/2 por AII participan la PKC y la NADPH oxidasa. En la expresión de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 regulada por AII en HSC activadas observamos que una de las vías de señalización que participan es la de la NADPH oxidasa.

# I. INTRODUCCIÓN

## A. La Angiotensina II

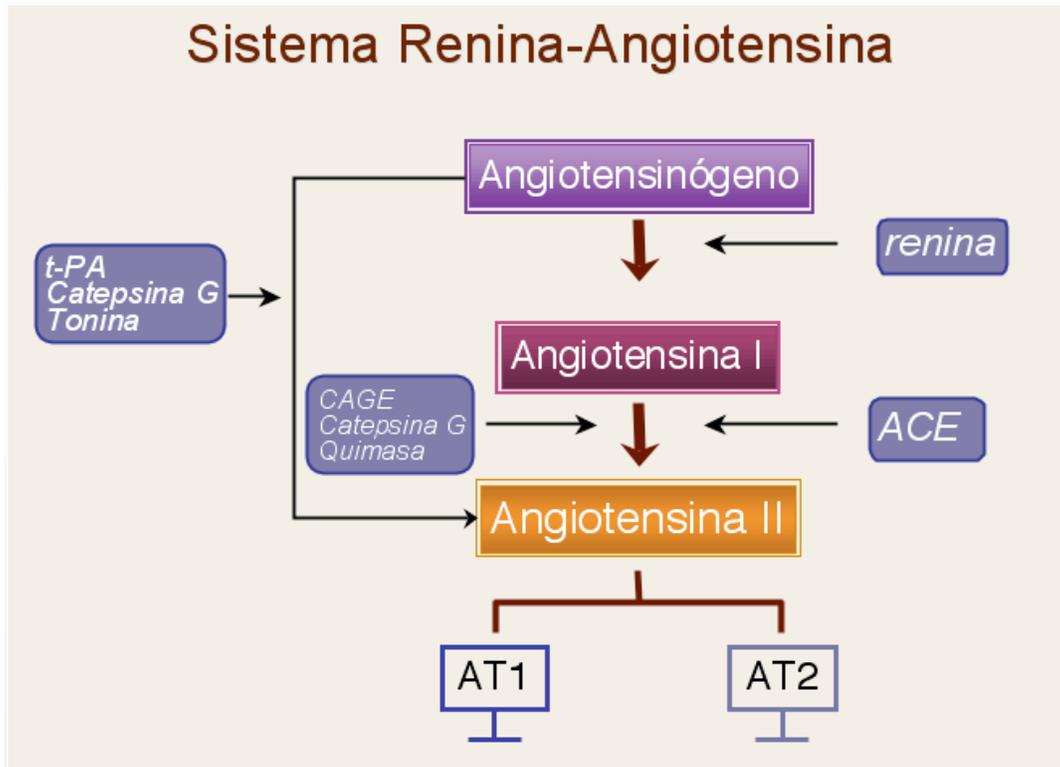
La angiotensina II (AII) es una hormona peptídica, componente del sistema renina-angiotensina que controla varios procesos fisiológicos como la presión sanguínea, el balance electrolítico, la estimulación de la síntesis y la secreción de aldosterona, entre otros (Ganong, 2002).

La AII es un octapéptido producido a partir de su precursor el angiotensinógeno, una  $\alpha_2$ -macroglicoproteína de 453 residuos, que es continuamente sintetizada y liberada por el hígado. Los primeros 10 aminoácidos corresponden a la Angiotensina I (AI), la cual es cortada y liberada por la enzima renina. La renina es una proteasa sintetizada por células del músculo liso de las arteriolas aferentes renales y por las células del mesangio glomerular. Las arteriolas aferentes, los glomérulos y la porción del túbulo distal se encuentran en íntimo contacto con la arteriola aferente, que constituye una estructura conocida como el aparato yuxtaglomerular; cuando existe una disminución en la presión arterial renal se produce una contracción de las células que liberan renina, actuando como baroreceptores que perciben los cambios en la presión de perfusión renal (Bottari et al., 1993; Dinh et al., 2001).

La renina, cuando se encuentra en circulación actúa sobre el angiotensinógeno produciendo la AI. Esta AI es rápidamente convertida en AII por la enzima convertidora de Angiotensina I (ACE) principalmente dentro de la circulación pulmonar, por la remoción de dos aminoácidos (figura 1). La ACE se localiza principalmente en células endoteliales y es blanco de varios inhibidores farmacológicos para disminuir la tasa de producción de AII. La AI y la AII son rápidamente hidrolizadas a pequeños fragmentos peptídicos, algunos de los cuales todavía tienen actividad biológica como la Angiotensina III (AIII) y la Angiotensina IV (AIV). La AIII tiene un 40% de la actividad vasoconstrictora de la AII, pero aún es capaz de inducir la producción de aldosterona.

Además de esta vía de producción de AII por la ACE, existen otras enzimas que pueden producir AII como la Cathepsina G, la enzima generadora de AII sensible a quimostatina (CAGE), la quimasa, la tonina y el activador de plasminógeno tisular (t-

PA). Estas enzimas, en arterias y vasos sanguíneos, representan una fuente importante de AII; se ha considerado el 40% de la AII total producida es a través de estas enzimas (Cheng et al., 2005).



**Figura 1. El Sistema Renina-Angiotensina.** La Angiotensina II (AII) es producida a partir del angiotensinógeno circulante por la enzima renina, para producir angiotensina I (AI). La enzima convertidora de angiotensina I (ACE) elimina dos residuos de aminoácidos de la AI para producir el octapéptido de AII. La AII tiene dos receptores principales AT1 y AT2, ambos de la familia de receptores acoplados a proteínas G. Existen otras enzimas que pueden producir AII, Catepsina G, Tonina, Quimasa, la enzima generadora de AII sensible a quimostatina (CAGE), y el activador de plasminógeno tisular (t-PA).

Los principales efectos cardiovasculares de la AII, son la contracción de las arterias y las venas para incrementar la presión sanguínea, en el corazón incrementa la entrada de calcio y prolonga el potencial de acción en miocitos ventriculares y atriales aumentando, por lo tanto, la fuerza de contracción de estas células. En el riñón, la AII tienen un efecto directo en los túbulos proximales al incrementar la reabsorción de  $\text{Na}^+$  y al inducir la contracción de las células mesangiales, aumentando en forma global la tasa de filtración glomerular por el aumento de la presión en la perfusión renal. Sobre la corteza suprarrenal, la AII induce la liberación de la aldosterona, hormona encargada de la retención de sodio y la pérdida de potasio en el riñón. Estos efectos de la AII en el

riñón y la corteza suprarrenal permiten el balance electrolítico y la regulación del volumen extracelular (Ganong, 2002).

La Angiotensina II (Ang II) es también un factor de crecimiento como se ha demostrado en varios estudios *in vitro* e *in vivo*: la Ang II modula el crecimiento celular de células mesangiales en riñón, fibroblastos y células de músculo liso vascular (VMSC). Junto con otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ); la Ang II induce la proliferación celular, provocando además, hiperplasia. La Ang II estimula la expresión de proteínas específicas de citoesqueleto como la  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -sma) en células mesangiales, lo que ha sugerido también la participación de Ang II en la diferenciación celular de células mesangiales a miofibroblastos (Bottari et al., 1993).

Existe evidencia de que la Ang II participa en la inflamación de la pared vascular que lleva a la arterosclerosis, una condición inflamatoria. En una respuesta inflamatoria, el organismo intenta reconstituir el tejido dañado a través de la infiltración de células del sistema inmune (linfocitos) y células mesenquimatosas (fibroblastos), así como la producción de diversos factores solubles para inducir la producción de componentes de matriz extracelular (MEC) y recuperar la arquitectura del tejido. Al actuar como vasoconstrictor, la Ang II provoca el daño mecánico del endotelio induciendo la liberación de mediadores proinflamatorios que aumentan la permeabilidad vascular y la migración de células inflamatorias al lugar del daño (Cheng et al., 2005). Directamente, la Ang II induce la expresión de varias citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y el TGF- $\beta$  (Suzuki et al., 2003; Smith et al., 2004).

## **B. Receptores para la Angiotensina II**

Existen dos tipos principales de receptores para la Ang II, los receptores tipo 1 (AT1) y los receptores tipo 2 (AT2), pertenecientes a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Los efectos principales de la Ang II son mediados a través de la estimulación del AT1, entre ellos la regulación de la presión sanguínea y el balance electrolítico.

Los receptores AT1 y AT2 no se encuentran distribuidos uniformemente en todos los tejidos somáticos. El hígado, los pulmones, el riñón, la vejiga, el tracto intestinal y el músculo liso aórtico expresan solamente AT1; otros tejidos como el páncreas y el ovario expresan al AT2 (Bottari et al., 1993; Dinh et al., 2001). La All también se une a otros receptores aún no caracterizados del todo, como los AT3 y los AT4, también de la familia de GPCR, que se conocen como receptores atípicos. El AT4 presenta una alta afinidad para el péptido conocido como AIV y una baja afinidad para la All; se expresa principalmente en riñón y se cree participa en la regulación del flujo sanguíneo renal y cerebral. El AT3 se encuentra en células cultivadas de neuroblastoma de ratón, este receptor puede unir a la All con alta afinidad y a la Alll con una baja afinidad (Dinh et al., 2001).

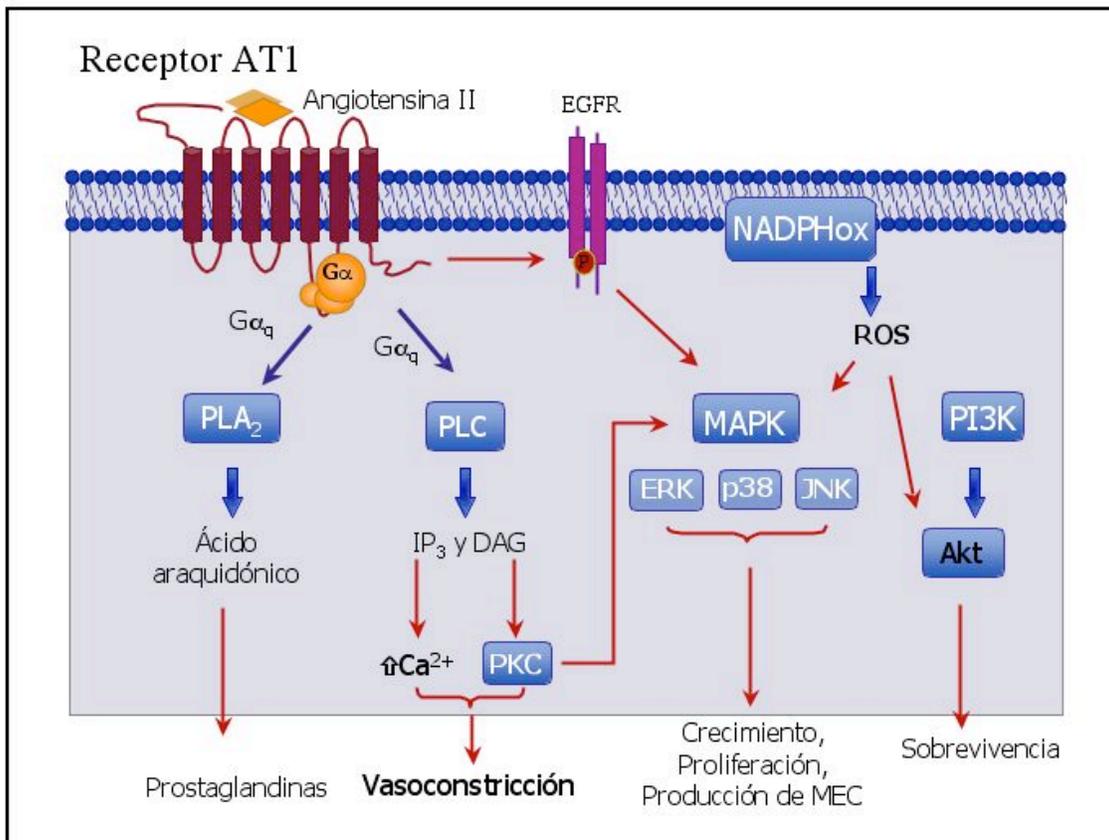
### **B.1 Receptores AT1**

El receptor AT1 en humano, rata y ratón está formado por 359 residuos de aminoácidos y tiene un peso de 41 kDa. Existen dos isoformas del receptor AT1 en roedores: AT1A y AT1B, que comparten 94% de similitud. Los receptores AT1 unen selectivamente bifenilimidazoles, incluyendo losartan, candesartan e irbesartan con alta afinidad, y son insensibles a tetrahydroimidazopiridinas, como PD123319 y PD123177. Además, la afinidad de AT1 se disminuye en presencia de agentes reductores como ditioneitol (DTT) y análogos de GTP (Dinh et al., 2001).

### **B.2 Vías de señalización acopladas a los AT1**

El receptor AT1 puede activar varios mecanismos de señalización intracelular, dependiendo de las proteínas G heterotrimericas involucradas (figura 2), aunque también puede activar vías que no están acopladas a estas últimas.

La All al unirse al receptor AT1 induce un cambio conformacional que promueve la interacción con las proteínas G que intervienen en la transducción de la señal por medio de la regulación de varios sistemas efectores. A través de la proteína Gq, la All activa a la fosfolipasa C (PLC), la fosfolipasa D (PLD) y la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Dinh et al., 2001).



**Figura 2. Diagrama esquemático de las diferentes vías de señalización activadas por la Angiotensina II a través de su receptor AT1.** EGFR: Receptor al Factor de Crecimiento Epidérmico; PLA<sub>2</sub>: fosfolipasa A<sub>2</sub>; AMPc: monofosfato cíclico de adenosina; PLC: fosfolipasa C; IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato; DAG: diacilglicerol; PKC: proteína cinasa C; NADPHox: NADPH oxidasa; ROS: especies reactivas del oxígeno; MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógenos; PI3K: fosfatidilinositol 3 cinasa.

La estimulación de la PLC se lleva a cabo por la acción de la proteína Gq/11, produciendo inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG) por la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>). El IP<sub>3</sub> difunde libremente por el citosol hacia el retículo endoplásmico, principal almacén de calcio, al unirse a su receptor específico desencadena la liberación de Ca<sup>2+</sup> y aumenta la concentración intracelular que participa en la contracción celular. El Ca<sup>2+</sup> liberado y el DAG activan a la proteína cinasa C (PKC) que participa también en la vasoconstricción, además la PKC participa en la transcripción de genes que controlan el crecimiento y la proliferación celular. Las PLD y PLA<sub>2</sub> estimulan la liberación de ácido araquidónico, un precursor de prostaglandinas y tromboxanos, mediadores lipídicos que actúan como vasoconstrictores y que pueden

participar en la inflamación (Bottari et al., 1993; Dinh et al., 2001).

Entre otras de las señales activadas por All y AT1 están las asociadas con la activación de vías de señalización activadas típicamente por factores de crecimiento. La All activa a varias proteínas y enzimas efectoras por medio de su fosforilación en residuos de tirosina. Algunas de estas proteínas pertenecen a las familias de las cinasas Janus (JAK), de las proteínas transductoras de la señal y activadores de la transcripción (STATs) y de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) como p38, JNK y las ERKs. La All transactiva al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) por la acción de proteínas cinasas de tirosina sensibles a  $Ca^{2+}$ , Pyk2 y Src que fosforilan al receptor, induciendo la expresión de fibronectina y del TGF- $\beta$  en fibroblastos cardiacos (Moriguchi et al., 1999). De forma independiente al  $Ca^{2+}$ , la All transactiva al EGFR por la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), también se ha reportado que la All activa a metaloproteasas involucradas en la liberación del factor de crecimiento tipo EGF que une heparina (HB-EGF) que activa al EGFR (Wang et al., 1999; Yang et al., 2005).

La All a través de la activación de MAPK incrementa la expresión de genes de respuesta temprana como *c-fos*, *c-jun* y *c-myc*, controlando el crecimiento, la proliferación celular y la inflamación (de Gasparo, et al., 2000). La All provoca la sobreexpresión de la colágena tipo I en VMSC a través de ERKs (Tharoux et al., 2000), por esta misma vía la All incrementa la expresión de trombospondina y la fibronectina además de tener otros efectos profibrogénicos (Aoki et al., 2000; Kawano et al., 2000). En su vía clásica de activación, ERK se activa por cinasas como MEK que a su vez son fosforiladas por otra serie de cinasas activadas a partir de Ras. Esta es una proteína G monomérica que es activada por factores intercambiadores de nucleótidos como Sos, al promover el intercambio de GDP por GTP, formando el complejo activo Ras-GTP. Este complejo recluta y activa a la cinasa de residuos de treonina y serinas Raf. La activación de MAPKs por All también puede realizarse por medio la activación de PKC y la subsiguiente fosforilación de Raf, por la transactivación del EGFR (Zou et al., 1996) o por la generación de ROS (Frank et al., 2000).

Para generar ROS, la All activa a la flavoenzima NADPH oxidasa, esta enzima es fuente de aniones superóxidos en células fagocíticas y células vasculares, por la

reducción de oxígeno molecular a superóxido, que después se convierte a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El aumento en la actividad de la NADPH oxidasa estimulada por All *in vitro* o *in vivo* es través del receptor AT1 y dependiente de las vías de PLD, PKC, Rac y Src (Cheng et al., 2005). Este aumento en las ROS, puede llevar a la activación de señales de estrés (ERKs, p38 y JNK) (Cheng et al., 2005).

Las ROS también participan en la activación de Akt en VSMC y a través de una vía redox dependiente de ácido araquidónico (Ushio-Fukai et al., 1990). Esta cinasa está implicada en la síntesis de proteínas y es un componente importante para la sobrevivencia celular que protege a las células de la apoptosis. La activación de Akt por factores de crecimiento, puede ser a través de Ras y de la PI3K, su activación por la All en VMSC de rata es dependiente de la actividad de cinasas de tirosinas y la actividad de la PI3K (Takahashi et al., 1999).

### **C. Participación de la Angiotensina II en la fibrosis**

El aumento en la concentración fisiológica de All puede llevar a la hipertensión y aún más a procesos fibróticos cardiovasculares, renales y hepáticos. La fibrosis es un padecimiento que contempla el depósito excesivo de componentes de matriz extracelular, ocasionando daños estructurales y funcionales del tejido afectado. Como se mencionó anteriormente, la All es un factor que puede desencadenar un proceso inflamatorio. La All incrementa la infiltración de leucocitos a través de la pared vascular activando directamente a las células inflamatorias y regulando las moléculas de adhesión en el endotelio, además induce la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. Estos efectos proinflamatorios de la All son mediados principalmente a través del receptor AT1 (Cheng et al., 2005). En un evento inflamatorio, las células y los factores solubles involucrados participan en la eliminación del daño que desencadenó la respuesta, pero ante la persistencia de éste, la inflamación sostenida provoca daños al tejido. Estos daños se resumen en la persistencia de la inflamación, la apoptosis y necrosis de células. Además existe el incremento en el depósito de tejido conectivo fibroso, disminuyendo la función del tejido afectado.

La All modula la proliferación celular y estimula la síntesis de proteínas de matriz extracelular, estos efectos provocan a largo plazo la hipertrofia ventricular, la

remodelación vascular, nefritis intersticial y fibrosis hepática (Marshall et al., 2000). Existe evidencia de la participación de la AII junto con otros factores como el FGF, el PDGF, el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y el TGF- $\beta$ ; que de manera autocrina y paracrina participan en el crecimiento y proliferación celulares (de Gasparo, et al., 2000).

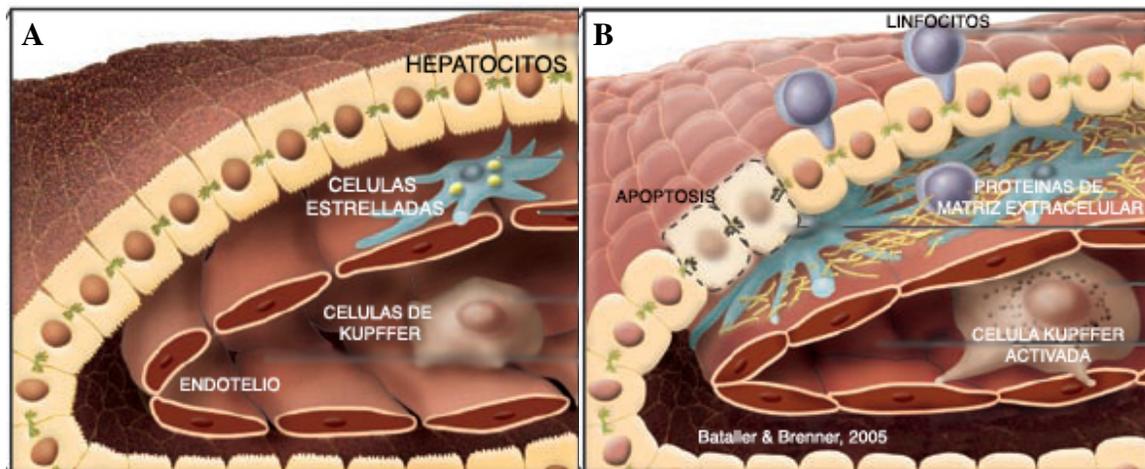
La AII activa varios factores de transcripción involucrados en la hipertrofia y en la inflamación, como por ejemplo la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B) que regulan la expresión de genes que intervienen en el control del crecimiento celular y la inflamación, induciendo la expresión de citocinas y la producción de MEC. Entre los mediadores de los efectos profibróticos de AII están el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), la proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1) y el TGF- $\beta$  (Mezzano et al., 2001).

En modelos de fibrosis en corazón, riñón e hígado se ha descrito el aumento en la expresión de TGF- $\beta$  asociado con el incremento en la concentración local de AII (Wu et al., 1997). De hecho, se ha demostrado que uno de los factores que promueve la sobreexpresión de la isoforma 1 del TGF- $\beta$  en varios tipos celulares es la AII (Weigert et al., 2002). Todos los efectos fibróticos de la AII, pueden ser revertidos por medio de antagonistas de AT1 e inhibidores de las enzimas que producen a la AII como la ACE (Mezzano et al., 2001).

#### **D. Patogénesis de la fibrosis hepática**

Cuando se ocasiona un daño al hígado, la respuesta inflamatoria y la remodelación de la MEC, su alta síntesis y baja degradación, restauran la función y la arquitectura normal de este órgano. Sin embargo, cuando el daño persiste ya sea por agentes externos o genéticos, existe un desbalance entre los factores que intentan reparar y llegar a la resolución del problema, ocasionando una alteración en la regulación de la MEC y provocando la síntesis excesiva de sus componentes (Bedossa et al., 2003; Lotersztajn et al., 2004); provocando así daños como la necrosis, la apoptosis, la isquemia y la alteración de la expresión génica en las células hepáticas.

El hígado es el principal órgano involucrado en la regulación del metabolismo, en el proceso de filtración de la sangre, el almacenamiento de metabolitos, la secreción de bilis y la regulación hormonal. Esta constituido por diferentes tipos celulares: las células parenquimatosas que son los hepatocitos, y las células no parenquimatosas como las células de Kupffer, las células estrelladas, las células endoteliales y los linfocitos granulares (figura 3A). Los hepatocitos son las principales células encontradas, constituyen el 60% en número y el 80% en volumen del hígado. Son células polarizadas, contienen superficies sinusoidales con microvellosidades y uniones estrechas con otras células adyacentes que parecen participar en la propagación de señales de una célula a otra (Ratziu et al., 1997).



**Figura 3. Esquema de un lobulillo hepático.** A) Un lobulillo hepático de manera normal se encuentra constituido por los hepatocitos y células no parenquimatosas como las células estrelladas, el endotelio y las células de kupffer. (B) Durante un proceso inflamatorio las células estrelladas hepáticas se diferencian a miofibroblastos participando en la producción de componentes de matriz extracelular, existe la infiltración de linfocitos y otras células inflamatorias activadas que participan en la fibrosis. Esto ocasiona la pérdida de las fenestraciones del endotelio y la apoptosis de hepatocitos. Tomado de Bataller & Brenner, 2005

Las células no parenquimatosas representan el 35% del número total de células del hígado. Las células endoteliales forman la pared de los vasos o sinusoides y tienen fenestraciones o poros de 100-200 nm, que permiten el intercambio de macromoléculas. El espacio que se forma entre las células endoteliales y los hepatocitos es llamado espacio de Disse o espacio sinusoidal, que contiene una estructura tipo membrana basal de baja densidad, para permitir el intercambio de macromoléculas entre la sangre

y los hepatocitos. Los macrófagos residentes o células de Kupffer se encuentran unidos a la superficie luminal de la pared sinusoidal y participan en la eliminación de agentes extraños. Las células perinusoidales o células estrelladas hepáticas (HSC) se localizan en el espacio de Disse y rodean a las células endoteliales, con sus largos procesos citoplasmáticos que poseen filamentos contráctiles de actina. Por último, se encuentran los linfocitos granulares que están débilmente unidos a la superficie luminal de los sinusoides, y están encargados de la respuesta inmune local (Ratziu et al., 1997).

En la fibrosis los primeros cambios en la matriz después de un daño crónico, son la acumulación de fibronectina en el espacio subsinusoidal, seguido por el de colágena tipo I y otros componentes de la MEC. Con la persistencia del estímulo se perpetúa la acumulación de MEC y se activan diferentes tipos celulares dentro del hígado, entre las principales se encuentran las HSC (figura 3B). Las células endoteliales pierden sus fenestraciones y sintetizan laminina y colágena tipo IV. Este proceso termina con la formación de sinusoides hepáticos dentro de capilares continuos, con una membrana basal engrosada y pericitos que producen colágena y lamininas, ocasionando que el espacio de Disse se transforme en un intersticio fibroso (Martínez-Hernández et al., 1995).

Los componentes de la MEC llegan a incrementarse de 3 a 5 veces en su concentración dentro del tejido hepático, entre los cambios cuantitativos se destaca la presencia predominante de las colágenas tipo I y III, las cuales se acumulan hasta 10 veces más, construyendo una red resistente a la fibrolisis (Bedossa et al., 2003). El flujo sanguíneo hepático se ve impedido debido a un aumento de la resistencia de los vasos, la cual es originada por la misma fibrosis y por la compresión vascular que causan la formación de nódulos regenerativos. Estos nódulos son especialmente propensos a la isquemia debido a su estructura desorganizada y a la relación anormal que se crea entre los hepatocitos y el flujo sanguíneo. Cuando este último se ve comprometido, en los nódulos se produce isquemia provocando un ciclo continuo de muerte celular, hiperplasia y fibrosis (Ettinger et al, 1995).

La fibrosis hepática puede terminar en un estado cirrótico donde el hígado pierde su arquitectura original, y se desarrollan formaciones fibróticas que rodean nódulos de hepatocitos en regeneración y se genera una reestructuración del sistema vascular.

Este estado se dice que es irreversible, pero aún en esta etapa la eliminación del agente dañino puede revertir el proceso fibrótico, con una recuperación muy lenta ya que pueden permanecer los mecanismos perpetuantes de la inflamación crónica (Lotersztajn et al., 2004).

### **D.1 La Angiotensina II y fibrosis hepática**

Existen varios factores genéticos y ambientales implicados como factores de riesgo en el desarrollo de fibrosis hepática. Algunos de los genes clasificados como asociados a esta enfermedad, dependiendo del tipo de fibrosis hepática que se trate, se encuentran enzimas como el Angiotensinógeno, la alcohol deshidrogenasa y citocinas como el TGF- $\beta$ 1 y el TNF- $\alpha$ . Varios mediadores solubles con actividad vasoactiva pueden participar en esta enfermedad: sustancias vasodilatadoras como la relaxina tienen efectos antifibróticos, en cambio sustancias vasoconstrictoras como la norepinefrina, la endotelina-1 y la AII tienen efectos profibróticos. La AII tiene un efecto importante en la fibrosis hepática, es producida de novo en las HSC y los componentes del sistema renina-angiotensina se encuentran expresados localmente en el hígado. AII induce la inflamación hepática y en las HSC induce la proliferación, la síntesis de citocinas proinflamatorias y de colágena (Bataller et al., 2005).

### **E. Células Estrelladas Hepáticas (HSC)**

Existen tres tipos celulares capaces de sintetizar y secretar componentes de la MEC: los hepatocitos, las células endoteliales y las HSC. Estas últimas representan la principal fuente de MEC en procesos fibróticos (Ratziu et al., 1997).

Las HSC se localizan en el espacio sinusoidal dentro de los lóbulos hepáticos (figura 3A). Estas células se caracterizan principalmente por el almacenamiento de ésteres de retinil (vitamina A) y por su estructura celular. En el hígado normal, estas células representan del 5 al 10% del total de células hepáticas; su principal función cuando están quiescentes o inactivas es el almacén y el metabolismo de retinoides, la

síntesis de factores de crecimiento hepáticos y otras citocinas, además de su papel en la regulación del flujo sanguíneo sinusoidal (Ratziu et al., 1997).

### **E.1 Activación de las HSC**

Las HSC pueden pasar de su estado quiescente a un estado activo por la acción de diversos factores como las quimiocinas, los factores de crecimiento y la lipoperoxidación (Blomhoff et al., 1991). La secreción de citocinas proinflamatorias, la producción de ROS por las células de Kupffer, las células endoteliales, o bien por cambios en la estructura de la MEC, ocasionan la activación paracrina de las HSC que se traducen principalmente en cambios en la expresión genética y en el fenotipo celular, lo cual le permite a la célula responder a otros estímulos (Friedman et al., 2000; Ratziu et al., 1997).

La activación de las HSC implica un proceso de diferenciación o transdiferenciación celular que conlleva a la expresión de un fenotipo de miofibroblastos (MFB). En este proceso, las células pierden el retinol y sufren varios cambios morfológicos, entre ellos, adquieren una forma elongada y expresan  $\alpha$ -sma, características de los miofibroblastos. Las HSC/MFB adquieren nuevas propiedades que les ayudan a mantener y amplificar la respuesta inflamatoria: una alta capacidad proliferativa, una elevada tasa de migración, la capacidad de ser contractiles, cambios en el patrón de la producción de citocinas y enzimas, la expresión *de novo* de distintos receptores y principalmente la síntesis y secreción de componentes de matriz extracelular (Friedman et al., 2000; Lotersztajn et al., 2004; Blomhoff et al., 1991).

Cuando las HSC son cultivadas en superficies de poliestireno por varios días, ocurre un proceso similar de transdiferenciación al que sufren *in vivo*, las células llegan a diferenciarse a miofibroblastos, presentan fibras de estrés bien desarrolladas y expresan  $\alpha$ -sma. En cambio, cuando las células son cultivadas sobre componentes de MEC (como laminina y colagena IV), las HSC no se transdiferencian y conservan sus funciones normales de célula no activada o quiescente (Sato et al., 2003). Esto último demuestra la dinámica entre las HSC y la MEC, existen varios receptores específicos a MEC como integrinas, receptores con dominio de discoidina y distroglicanos que estimulan en las HSC varias rutas de señalización; en la fibrosis el cambio en la

composición de la MEC sinusoidal, caracterizada por el reemplazamiento de la membrana basal en matriz fibrilar, inicia y mantiene la activación de estas células (Ratziu et al., 1997).

## **E.2 Las HSC y su participación en la fibrosis hepática**

Entre los principales factores que ocasionan la producción de proteínas de MEC, factores de crecimiento como CTGF, metaloproteasas (MMPs) e inhibidores de metaloproteasas (TIMPs) en HSC activadas está el TGF- $\beta$ . Esta citocina es sintetizada principalmente en la fase de activación por células de Kupffer y plaquetas; en fases más avanzadas el TGF- $\beta$  llega a ser producido principalmente por las HSC activadas, generando una estimulación autocrina, ya que el TGF- $\beta$  regula su propia expresión (Ratziu et al., 1997). La activación de las HSC incrementa la respuesta a TGF- $\beta$ , a través de la regulación de la expresión de los tres receptores a TGF- $\beta$  (Bedossa et al., 2003).

Las células no parenquimatosas del hígado, son las únicas células productoras de TGF- $\beta$ , las células de Kupffer producen en altas cantidades sólo TGF- $\beta$ 1 y las HSC son las únicas células en el hígado que pueden producir las 3 isoformas del TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3), donde es más abundante el TGF- $\beta$ 1. Las HSC pueden amplificar y modular el proceso inflamatorio dentro del daño hepático, induciendo varios quimioatrayentes que promueven la infiltración de células inflamatorias. Entre los principales quimioatrayentes están el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), el MCP-1 y el factor activador de plaquetas (PAF) (Ratziu et al., 1997).

Las HSC-MFB, en la fibrogénesis, producen proteínas de MEC incluyendo colágenas tipo I, III y IV, fibronectinas, lamininas, entactina, tenascina, undulina y proteoglicanos. Además, participan en la regulación de MEC ya que producen MMPs y TIMPs, regulando así, el balance entre síntesis y degradación de MEC. En un estado crónico, las HSC en etapas tempranas incrementan la expresión de MMP-2 y MMP-9, que degradan principalmente colágena tipo IV, y otras enzimas que degradan glicoproteínas; en etapas más avanzadas las HSC producen principalmente TIMPs

oponiéndose a la degradación del exceso en los componentes de la MEC (Friedman et al., 2000).

La fibrosis puede revertirse modulando los componentes que llevan a su formación. En la fibrosis hepática, es necesario además el retiro del o los agentes causantes del daño. Entre los principales blancos terapéuticos se encuentran las HSC, ya que revirtiendo su activación, se eliminaría una fuente importante de varias citocinas proinflamatorias y TIMPs, que disminuirían la infiltración de células inflamatorias y la acumulación de MEC (Bedossa et al., 2003; Lotersztajn et al., 2004).

## **F. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ )**

Los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  son factores reguladores de varios procesos celulares como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, la movilidad y la apoptosis. Las formas activas de los miembros de esta superfamilia son dímeros unidos por puentes disulfuro que contienen subunidades de 110 a 140 aminoácidos. Las subunidades son sintetizadas como complejos latentes, incapaces de unirse al receptor y necesitan por lo tanto ser activados en el medio extracelular por la actividad de varias proteasas o por la interacción con integrinas (López-Casillas, 1998).

Los miembros de esta superfamilia de citocinas comparten una estructura característica central que se conoce como el nudo de cisteínas, que comprende tres puentes disulfuro. A partir de este arreglo se extienden 4 hojas  $\beta$  y una  $\alpha$ -hélice se extiende en dirección opuesta a las hojas  $\beta$ . Las cisteínas restantes forman un puente disulfuro con la cisteína correspondiente en el otro monómero. Dentro de la superfamilia de TGF- $\beta$  se encuentran la subfamilia de las proteínas tipo Vg-Decapentaplegico (DVR) que comprende a las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) y a los factores de crecimiento y diferenciación (GDF), la subfamilia de las activinas/inhibinas y la subfamilia del TGF- $\beta$ , que comprende las 5 isoformas del TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 en mamíferos, TGF- $\beta$ 4 en pollo y TGF- $\beta$ 5 en *Xenopus*. Otros miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  son la hormona anti-Mulleriana (AMH,MIS), los factores

neurotróficos derivados de glia (GDNFs) y Lefty (Border et al, 1995; López-Casillas, 1998, Herpina et al., 2005).

Las formas activas del TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 en mamíferos son moléculas diméricas de 25 kD aproximadamente, cada una compuesta de monómeros idénticos. Entre la isoforma 1 y la 2 existe un 72% de similitud, entre la isoforma 1 y 3 hay un 77%, mientras que las isoformas 2 y 3 tienen alrededor de un 80% de similitud (López-Casillas, 1998). Estas 3 isoformas tienen propiedades semejantes *in vitro*, inhiben la proliferación en muchos tipos celulares e inducen apoptosis en células epiteliales. Pero, por el contrario en varios tejidos *in vivo*, estimulan la proliferación de las células mesenquimatosas y la producción de componentes de matriz extracelular, induciendo una respuesta fibrótica

El dímero del TGF- $\beta$  se produce por varios tipos celulares y es sintetizado como proproteínas homodiméricas unidas por dos enlaces disulfuro, cada proproteína tiene una longitud de 390 aminoácidos, que sufre una proteólisis para producir la forma activa o madura de 112 aminoácidos, localizados en la porción carboxilo terminal, y un péptido asociado de latencia en la porción amino (LAP; López-Casillas, 1998; Shi et al, 2003). Esta proproteína es procesada en el aparato de Golgi donde enzimas tipo furina cortan al TGF- $\beta$  del LAP, ambas proteínas permanecen asociadas por interacciones electrostáticas débiles; en este mismo sitio LAP se asocia a la proteína de unión al TGF- $\beta$  latente (LTBP) formando lo que se conoce como el complejo latente principal de TGF- $\beta$  (LCC). Cuando es secretado el LCC permanece unido covalentemente a la matriz extracelular (López-Casillas, 1998; Annes et al., 2003). El TGF- $\beta$  se activa o libera cuando el LCC interactúa con proteasas, con las integrinas  $\alpha_v\beta_6$  o con la trombospondina-1 (TSP-1), también puede ser activado por la generación de ROS y por la acidificación del medio, liberando así la forma madura y soluble del TGF- $\beta$  ( Herpina et al., 2005).

### **F.1 Vías de señalización del TGF- $\beta$**

El TGF- $\beta$ , una vez activado, se une a su receptor tipo II (T $\beta$ RII), un receptor con una actividad de cinasa de residuos de serinas y treoninas constitutivamente activo. La

unión del ligando al T $\beta$ RII permite la incorporación del receptor tipo I (T $\beta$ RI). El T $\beta$ RI es también un receptor con actividad de cinasa de residuos de serina y treonina, pero que necesita ser activado. Ambos receptores T $\beta$ RII y T $\beta$ RI forman un complejo estable que facilita la proximidad de los dominios de cinasa, esto permite la fosforilación en el sitio GS del T $\beta$ RI, con esta fosforilación se provoca un cambio conformacional que activa su dominio de cinasa (Shi et al, 2003).

El T $\beta$ RI activado fosforila a sus sustratos principales, las proteínas Smads, que realizan la transducción de la señal del TGF- $\beta$ . Existen 3 tipos funcionales de Smads, las Smads reguladas por receptor (R-Smads), las Smads comunes (Co-Smads) y las Smads inhibitorias (I-Smads). Las R-Smads, Smad1, 2, 3, 5 y 8, se activan al ser fosforiladas directamente en el motivo SSXS de su porción carboxilo terminal por los receptores tipo I, ocasionando la formación de complejos con la co-Smad, Smad4. Las Smad2 y Smad3 responden a la señalización por TGF- $\beta$  y activinas, mientras que las Smad1, 5 y 8 a la señalización de la subfamilia de las BMPs (Derynck et al, 2003; Shi et al, 2003). Los complejos de proteínas Smads son translocados al núcleo y junto con otros factores de transcripción regulan la expresión de genes específicos. Las I-Smads, Smad6 y Smad7, regulan negativamente la señal del TGF- $\beta$ , al competir con las R-Smads por el receptor, por la interacción con la Co-Smad y por llevar a los receptores a su internalización y degradación.

La vía de señalización de las Smad controla diversos procesos celulares como la proliferación, la apoptosis, la diferenciación y la inhibición del crecimiento celular, entre otros. Sin embargo, el TGF- $\beta$  activa también otras vías de señalización como la vía de MAPK, incluyendo ERKs, JNK y p38, la vía de PI3K y GTPasas tipo Rho y Ras en ciertos tipos celulares; causando diversos efectos como la transdiferenciación y la sobrevivencia celular (Derynck et al, 2003).

## **F.2 Participación del TGF- $\beta$ en la modulación de la matriz extracelular y la fibrosis**

Uno de los efectos fisiológicos más importantes del TGF- $\beta$  es su participación en la iniciación, modulación y finalización del proceso de reparación o cicatrización en los tejidos. El TGF- $\beta$  controla la producción y la acumulación de proteínas de MEC,

induciendo la expresión de éstas en células mesenquimatosas y epiteliales, además inhibe la producción de MMPs, e incrementa la expresión de inhibidores TIMPs. Este factor modula también la adhesión de las células a la MEC por la regulación en la expresión de integrinas (Border et al, 1995) y es un factor quimiotáctico importante para fibroblastos.

El TGF- $\beta$  interactúa con otros factores de crecimiento (PDGF, FGF) y citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) involucradas en la iniciación de la respuesta inflamatoria, controlando la proliferación celular, la quimiotaxis y la secreción de otros factores involucrados en la reparación tisular.

En el proceso de reparación, los niveles de las isoformas del TGF- $\beta$  aumentan significativamente. En varios estudios con modelos de cicatrización dérmica, se ha demostrado que los niveles de la isoforma 1 y 2 incrementan rápidamente al primer día después de una incisión dérmica, y la isoforma 3 se incrementa después de algunos días, cuando los niveles de TGF- $\beta$ 1 disminuyen. En otros estudios, se observan respuestas similares donde después de una incisión dérmica, los niveles del TGF- $\beta$ 1 aumentan hasta nueve veces dentro de las primeras 24 hrs y permanecen elevados por varios días; los niveles del TGF- $\beta$ 2 no se incrementan hasta los 5 días post-incisión aproximadamente unas 4.5 veces, y los niveles del TGF- $\beta$ 3 alcanzan su pico máximo hasta los 7 días con una inducción de 12.5 veces (O'Kane et al., 1996).

Las isoformas del TGF- $\beta$  en el proceso de reparación tisular pueden tener distintos efectos en las mismas células. El TGF- $\beta$ 1 puede ser un factor estimulador o inhibitorio para la quimioatracción de monocitos, macrófagos, linfocitos, neutrófilos y fibroblastos, además estimula la liberación de citocinas de estas células. Es un importante factor angiogénico y regulador de la matriz extracelular, además activa al promotor de su propio gen, autorregulando su expresión. En cambio, poco se sabe de las acciones de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. Ambos son importantes en la finalización o cierre del proceso de cicatrización principalmente en la restitución de la neodermis y de la microvasculatura. TGF- $\beta$ 2 participa en angiogénesis y al igual que TGF- $\beta$ 1 induce la proliferación de fibroblastos y promueven el depósito excesivo de componentes de MEC. En cambio TGF- $\beta$ 3 no tiene el mismo efecto proliferativo en fibroblastos, pero

tiene un efecto mayor que las otras dos isoformas en la inhibición de la síntesis de DNA en keratinocitos, disminuye el depósito de fibronectina, de las colágenas I y III, mejora la arquitectura de la neodermis y reduce la cicatrización (Kinbara et al., 2002).

En general la regulación de la síntesis de los factores que participan en el proceso de reparación es muy importante, pues puede llevar a efectos patológicos como la fibrosis. Desde hace varios años se ha descrito la participación del TGF- $\beta$  en enfermedades crónicas como la glomerulonefritis, escleroderma, fibrosis idiopática pulmonar y cirrosis hepática entre otras, debido a su excesiva producción y a su principal función como regulador de la composición de la matriz extracelular (Border et al, 1995; López-Casillas, 1998).

## II. ANTECEDENTES

La Angiotensina II (Ang II), principal componente del sistema Renina-Angiotensina, actúa también como un factor de crecimiento que controla la proliferación y el crecimiento celular. Regula la producción de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión que promueven la infiltración de células inflamatorias. La Ang II participa además, en la producción de componentes de matriz extracelular, metaloproteasas e inhibidores de metaloproteasas. La alta producción de Ang II por factores genéticos, desórdenes metabólicos, entre otros, provoca el desarrollo de fibrosis en diversos tejidos.

Desde hace varios años se ha reportado que la utilización de antagonistas del receptor tipo I de la Ang II (AT1), como losartan, candesartan y olmesartan en modelos fibróticos en animales, disminuyen la fibrosis por la inhibición de la síntesis de colágeno, la disminución en la proliferación de las HSC y sobretodo la disminución de los niveles en plasma del TGF- $\beta$  (Kurikawa et al., 2003; Yamada et al., 2003).

De igual forma, la utilización de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), como Benazepril, Trandolapril, provocan una disminución de la fibrosis. En modelos animales de fibrosis pancreática y hepática, el uso de estos inhibidores ocasiona la disminución de los niveles de la proteína y del RNA mensajero del TGF- $\beta$ 1, en células estrelladas de páncreas e hígado (Yoshiji et al., 2001). La utilización de anticuerpos monoclonales para el TGF- $\beta$ 1 como Lerdelimumab, Metelimumab y GC-1008, reducen de manera importante la fibrosis (Yingling et al., 2004).

Weigert y col., describieron la activación de la expresión del TGF- $\beta$ 1 a través de la activación por AP-1 del promotor del gen de TGF- $\beta$ 1, mediante la activación de las vías de señalización dependientes de PKC y de la MAPK p38 en células mesangiales. Por lo tanto, nos proponemos estudiar si los efectos profibróticos de la Angiotensina II son mediados por el TGF- $\beta$ .

### **III. HIPÓTESIS**

Si la angiotensina II media sus acciones profibróticas en hígado a través del TGF- $\beta$ , entonces observaremos que la AII inducirá un aumento en los niveles de expresión de alguna(s) de las isoformas del TGF- $\beta$  en células estrelladas hepáticas (HSC), a través de su receptor AT1.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **Objetivo General**

- Estudiar el papel de la Angiotensina II en la regulación de la expresión del TGF- $\beta$  en células estrelladas hepáticas.

#### **Objetivos Particulares**

- Determinar si la producción del RNA mensajero de las isoformas 1, 2 y 3 del TGF- $\beta$  es modulada por la angiotensina II en células estrelladas hepáticas de rata (HSC).
- Determinar qué vías de transducción utiliza la angiotensina II para regular los niveles de expresión de las isoformas del TGF- $\beta$ .

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Cultivos primarios de Células Estrelladas Hepáticas

Este estudio se realizó en cultivos primarios de HSC obtenidas de hígado de ratas Wistar de más de 500 gr. El hígado se perfundió con solución Krebs-Ringer (NaCl 120mM, KCl 4.75 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgMSO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24 mM) sin calcio pH 7.34 por 15 minutos, después durante 10 min con la solución Krebs-Ringer con calcio (CaCl<sub>2</sub> 1.27 mM) a 37°C. Inmediatamente después se perfundió con 140 mg de pronasa y 3.5 mg de colagenasa tipo IV por 20 y 10 min respectivamente. El hígado digerido se cortó hasta macerarlo y se incubó con DNasa I 20 µg/ml en solución Krebs con calcio a 37 °C por 15 min. Después se filtró por una malla el tejido homogenizado, el líquido conteniendo a las células se centrifugó 1 min a 55 x g (R.C.F.); se lavó con Krebs mas DNasa I en tres ocasiones. A continuación el líquido recuperado en los lavados, se centrifugó por 10 min a 704 x g (R.C.F.) a 10 °C, para obtener una capa de células. De esta capa se obtuvieron las HSC usando un gradiente con solución de Nycodenz (Axis-Shield PoC AS; Oslo, Norway) al 8.2% en una ultracentrifuga XL-100K (Beckman Coulter) a 57831 x g (R.C.F.) rotor SW40Ti por 35 min. La fracción de las HSC se lavó con PBS por centrifugación a 595 x g (R.C.F.) por 7 min y después las células se resuspendieron en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) complementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de streptomicina y 0.05 mg de gentamicina. Las células se sembraron a una densidad de 4 x 10<sup>6</sup> células en cajas Petri de poliestireno de 10 mm de diámetro.

Las células se cultivaron por 7 y 13 días, transcurrido este tiempo de cultivo las células ya se encuentran activadas y según el protocolo se trataron con All [Sigma], el antagonista de AT1 (DUP753, Sigma), el antagonista de AT2 (PD123177; Tocris), e inhibidores de p38 (SB202190; Sigma), MEK1/2 (U0126; Sigma), JNK (SP600125; Sigma), PKC (estaurosporina y bisindolilmaleimida; Tocris) o de la NADPH oxidasa (difenileneiodonio; Tocris).

## **2. Inmunocitoquímica**

La HSC se sembraron sobre cubreobjetos dentro de cajas de 35 mm con una matriz de colágena. Después de los días de cultivo establecidos, el medio se removió y las células se lavaron con PBS 1X. Enseguida, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS por 1 min a temperatura ambiente, inmediatamente se hicieron 4 lavados con PBS. Se permeabilizaron las células y se realizó el tratamiento para inhibir las peroxidasas endógenas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol por 5 min. A continuación se bloquearon las células con avidina y biotina por separado por 15 min cada una. Se continuó con el bloqueo con suero de cabra al 10% en PBT (tritón 10%, PBS 1X, albúmina 10%) por 30 min, seguido por la incubación con el anticuerpo primario específico de ratón para  $\alpha$ -sma 1:200 en suero de cabra al 10% en PBS, a 4°C en cámara húmeda toda la noche. Después se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón a una dilución de 1:200 en PBT por 30 min a 37°, enseguida se incubó con la solución ABC (avidin-biotin complex) por 30 min a 37°C. Entre cada paso se realizaron lavados con agua y PBS. Por último se trató con la solución DAB (diaminobenzidina) a temperatura ambiente por un tiempo adecuado para la tinción y se montó con cytooseal™ 60 (Richard-Allan Scientific) en portaobjetos.

## **3. Aislamiento de RNA y Ensayo de protección de la RNAsa (RPA)**

Para conocer si la producción del RNA mensajero (RNAm) de las isoformas del TGF- $\beta$  en las HSC era inducido por la AII, células de 7 días de cultivo fueron pretratadas con cicloheximida 20 $\mu$ g/ml (CHX, un inhibidor de la síntesis de proteínas) y tratadas a diferentes tiempos con AII 1 $\mu$ M a partir de 30 min, 1, 2, 3, 6 o 24 hrs, además de un tratamiento con los siguientes antagonistas e inhibidores DUP753 10  $\mu$ M, U0126 10  $\mu$ M, estaurosporina (STA) 1  $\mu$ M, bisindolilmaleimida (BIM) 1  $\mu$ M y difenileneiodonio (DPI) 10  $\mu$ M. El RNA total de las HSC se aisló por medio de Trizol (Invitrogen) y después se purificó por medio de cloroformo, se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol al 75%. Se obtuvo en promedio entre 10 y 20  $\mu$ g/ $\mu$ l de RNA total por caja, que fue resuspendido en 20  $\mu$ l de agua destilada tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

El RNA purificado se analizó por RPA (BD Biosciences, RiboQuant™), mediante hibridación con una sonda marcada radiactivamente con <sup>33</sup>P. La sonda para el RNAm de las isoformas 1, 2 y 3 del TGF-β fue presintetizada in vitro con la RNA polimerasa T7 en un amortiguador de transcripción 5X con NTP's (GTP, ATP, CTP, UTP) y UTP marcado con <sup>33</sup>P, por 1 hr a 37°C, parando la reacción con DNasa. La sonda se separó en una microcolumna G50, después de su colecta y secado por 40 min, se resuspendió en un amortiguador de hibridación. Se colocaron 5 µg de RNA de las muestras de HSC tratadas, en un microtubo, junto con 10 µl de amortiguador de hibridación y 3 µl de la sonda marcada, se dejó en baño maría a 100 °C por unos minutos y después se bajó la temperatura a 50°C dejando incubar toda la noche. Además del RNA de las HSC, se colocaron dos controles negativos: RNA de transferencia de levadura y RNA de ratón.

Después de la hibridación, las muestras se trataron con la mezcla de RNasas, adicionando un volumen de 100 µl a cada muestra y dejando incubar a 37°C durante 60 min. Para parar la reacción se adicionó 18 µl a cada tubo de una mezcla de proteinasa K, después de mezclar, centrifugar e incubar por 15 min a 37°C se transfieren a hielo. A continuación, se precipitan las sondas marcadas con 133 µl de la mezcla de glicógeno (Glyco-blue, Ambion) y de acetato de amonio por tubo, se mezcla y se adiciona etanol frío. Después de incubar 10 min en hielo y centrifugar por 15 min a 18188 x g (R.C.F.), se retiro el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Cada pellet se resuspendió en 5 µl de amortiguador de carga (formamida 80%, EDTA 1 mM, pH 8.0; tris-borato 50 mM, pH 8.3; xileno cianol 0.05%, azul de bromofenol 0.05%)1X. Las muestras se corrieron en un gel de acrilamida:bisacrilamida (19:1) y urea (7 mM) a 50 watts por 2 hrs con TBE 1X (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM). El gel se deja secar en un papel filtro y el RNAm que hibridó con la sonda marcada se detecta mediante una placa de rayos X a -80°C.

#### **4. Inmunoblots**

Las células HSC fueron colocadas en ayuno en un medio con SFB al 0.2% por lo menos 12 hrs antes de ser tratadas con los diferentes agonistas y antagonistas. Después, fueron lavadas con PBS frío y lisadas con TNTE (tritón 0.5%, tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM) con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, inhibidor de

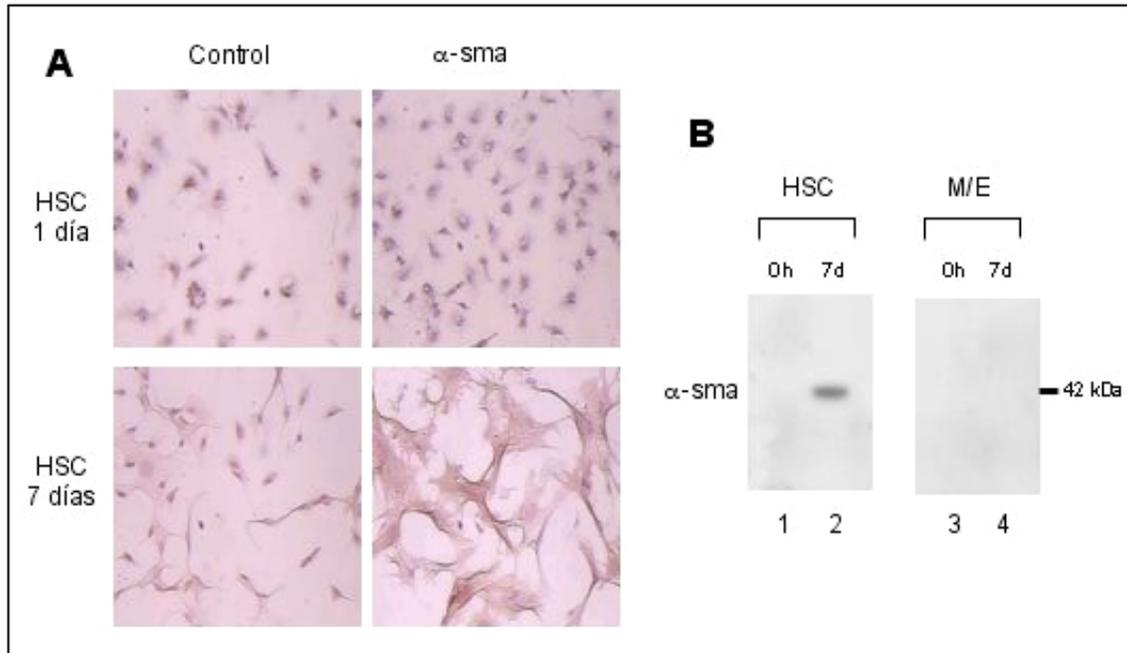
tripsina, pepstatina A, leupeptina, antipaina, benzamidina y aprotinina 0.1 mg/ml cada una) y fosfatasas (NaF 25 mM, pirofosfato de sodio (NaPPi) 1 mM,  $\beta$ -glicerofosfato y  $\text{NaVO}_4$  1mM), obteniendo así las proteínas totales. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS (10%) y transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Estas membranas se bloquearon con 5% de leche descremada en TBS-T (Tris base 200mM, NaCl 1.37 mM, Tween-20 0.1%) por 1 hora, después fueron incubadas toda la noche con los anticuerpos primarios contra las formas fosforiladas y totales de cada una de las proteínas de las vías de señalización que pueden ser activadas por la AII (ERK1/2, p38, JNK y Akt); en una dilución 1:1000 en TBS. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (anti-conejo) por 1 hr a temperatura ambiente. La visualización de los complejos fue por quimioluminiscencia adicionando el sustrato de la peroxidasa (ECL, Amersham Biosciences) y por autorradiografía.

## VI. RESULTADOS

### **1. Expresión de $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -sma) en HSC de 7 días de cultivo**

Las HSC cuando se cultivan en superficies de poliestireno por varios días llegan a presentar una forma aplanada tipo fibroblasto y expresan además la  $\alpha$ -sma, un principal indicador de la activación de las HSC. Para conocer si las células que se aislaban seguían este patrón de activación al sembrarse en cajas de poliestireno, se decidió estudiar por medio de inmunocitoquímica, la expresión de  $\alpha$ -sma en células de 1 día y 7 días de cultivo primario.

Como se observa en la figura 4A, las HSC de 1 día son células pequeñas que presentan procesos citoplasmicos cortos y no expresan  $\alpha$ -sma; en cambio en las HSC de 7 días se observa una forma alargada tipo fibroblasto, la presencia de  $\alpha$ -sma y largos procesos citoplasmicos. También se realizaron inmunoblots para observar la expresión de  $\alpha$ -sma en HSC recién aisladas (0h) y de 7 días de cultivo (7d), y con extractos proteicos de células de Kupffer y células endoteliales, otros tipos celulares encontrados en el hígado. En la figura 4B, se muestra que las únicas células que expresan la  $\alpha$ -sma (42 kDa) son las HSC de 7 días de cultivo es decir miofibroblastos, por lo que el proceso de activación y transdiferenciación de estas células se lleva a cabo.



**Figura 4.** Expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -sma) en células estrelladas hepáticas (HSC). A) HSC cultivadas por 1 y 7 días se fijaron e incubaron en ausencia (control) o presencia del anticuerpo primario contra  $\alpha$ -sma, después con el anticuerpo secundario biotinilado y se tiñieron con DAB. B) Inmunodetección de  $\alpha$ -sma en extractos proteícos de HSC recién aisladas (0h, carril 1) y en cultivo por 7 días (7d, carril 2), células de Kupffer y células endoteliales (M/E) de 0 y 7 días de cultivo (carril 3 y 4 respectivamente).

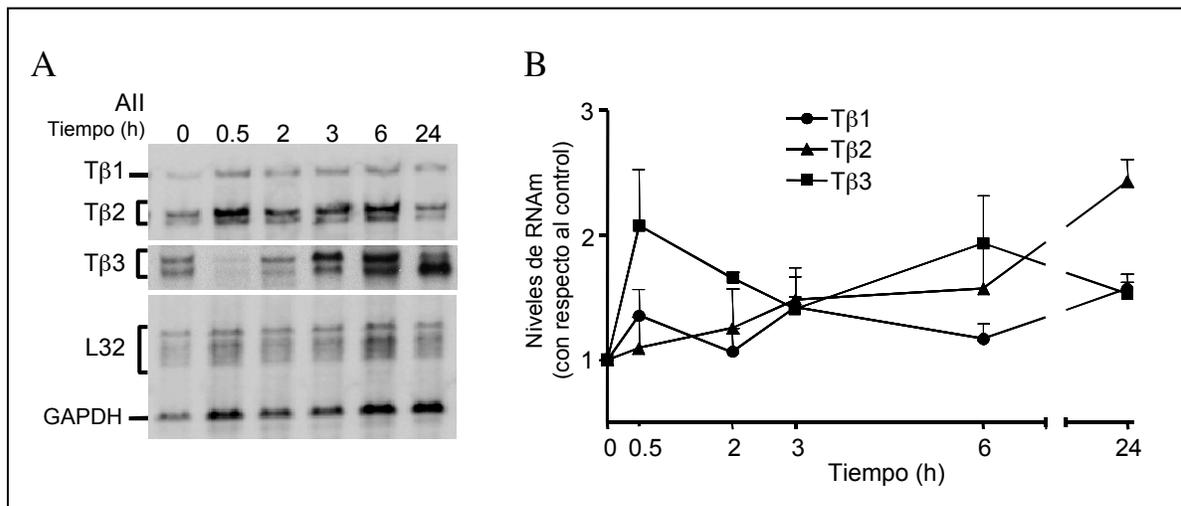
## 2. Angiotensina II induce la expresión de las isoformas del TGF- $\beta$ en HSC

En un estudio previo con células mesangiales de riñón, Weigert y col. reportaron que la AII activa al gen del TGF- $\beta$ 1 mediante la unión de AP-1 a su promotor y es dependiente de la activación de p38 y de la PKC (Weigert et al, 2002). En este estudio se resalta el papel del receptor AT1, ya que el uso de antagonistas abate la respuesta obtenida. Para conocer si la AII inducía la producción del RNAm de alguna de las isoformas del TGF- $\beta$ , HSC de rata de 7 días de cultivo fueron tratadas con AII.

La técnica de RPA permite conocer la expresión del RNA mensajero de las 3 isoformas del TGF- $\beta$  en un solo gel, el subsiguiente análisis de las sondas marcadas por densitometría define el nivel de expresión de estos mensajeros con respecto al control. Las HSC de 7 días de cultivo se pretrataron con CHX (un inhibidor de la síntesis

de proteínas), para acumular el RNAm, a una concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$  por 20 min y después se trataron con All 1  $\mu\text{M}$  a distintos tiempos: 30 minutos, 2, 3, 6 y 24 horas, induce la expresión de las isoformas TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 (figura 5). En diversos estudios se ha indicado que All induce la expresión del TGF- $\beta$ 1 en modelos de fibrosis en animales y en distintos tipos celulares, como en células mesangiales y en células de músculo liso vascular (VMSC), aquí sólo se observa de manera importante la expresión de las isoformas 2 y 3 de manera directa por la All (figura 5A).

En este estudio, se observa principalmente que la primera isoforma en ser inducida por la All, es el TGF- $\beta$ 3 a los 30 min de tratamiento con All, su RNAm se incrementa alrededor de 2 veces con respecto al control, disminuyendo a las 2 y 3 hrs después del estímulo, aunque se incrementa una vez más su expresión a las 6 hrs (figura 5B). La isoforma 2 del TGF- $\beta$  presenta un aumento paulatino, incrementando sus niveles de mensajero hasta 2.4 veces a las 24 hrs de tratamiento con All. La expresión del TGF- $\beta$ 1 se mantiene al parecer sin grandes cambios en el transcurso del tratamiento con All, (figura 5B). Así, en HSC/MFB de rata, la All puede regular positivamente la expresión del RNAm del TGF- $\beta$  2 y el TGF- $\beta$ 3.



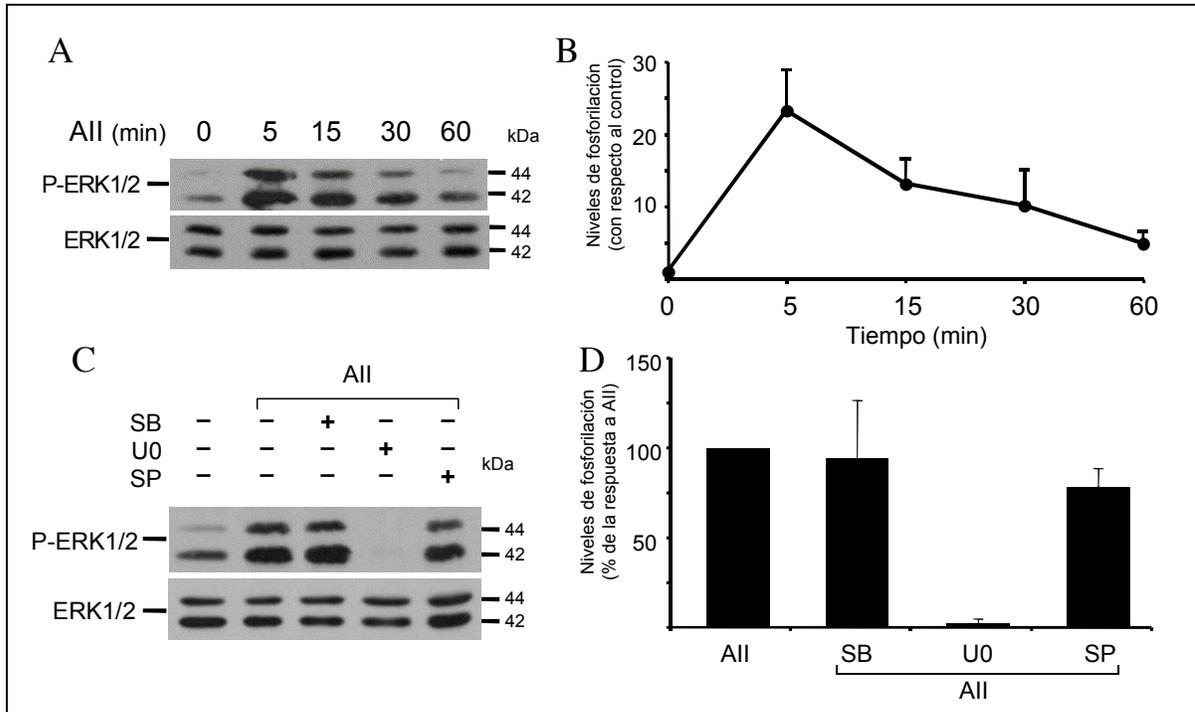
**Figura 5.** Expresión del RNAm de las isoformas del TGF- $\beta$  inducida por All en HSC de 7 días. A) HSC de 7 días de cultivo se pretrataron 20 min con cicloheximida (CHX, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) y fueron estimuladas con All 1  $\mu\text{M}$  en los tiempos que se indican. El RNA total fue analizado por medio de RPA para observar los cambios en la expresión del RNAm de las isoformas del TGF- $\beta$ . B) La gráfica representa de los niveles del RNAm de isoformas del TGF- $\beta$ , determinados por densitometría, normalizados con L32 y comparados con respecto al control.

### **3. Activación de ERK1/2, de p38 y Akt por Angiotensina II en HSC**

La AII, en concentraciones elevadas en el plasma, es capaz de activar a las HSC e inducir un daño hepático por el aumento en la infiltración de células inflamatorias hacia el hígado, las concentraciones de citocinas inflamatorias, el depósito de colágeno y el estrés oxidativo. En cultivos primarios de HSC humanas, la AII induce un aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e induce la contracción de estas células de una manera dosis-dependiente (Bataller et al., 2000), también es capaz de activar vías como Akt y MAPK de forma redox-dependiente (Bataller et al., 2003) y activar al gen del inhibidor de metaloproteasas-1 (TIMP-1) a través de la activación de PKC (Yoshiji et al., 2003).

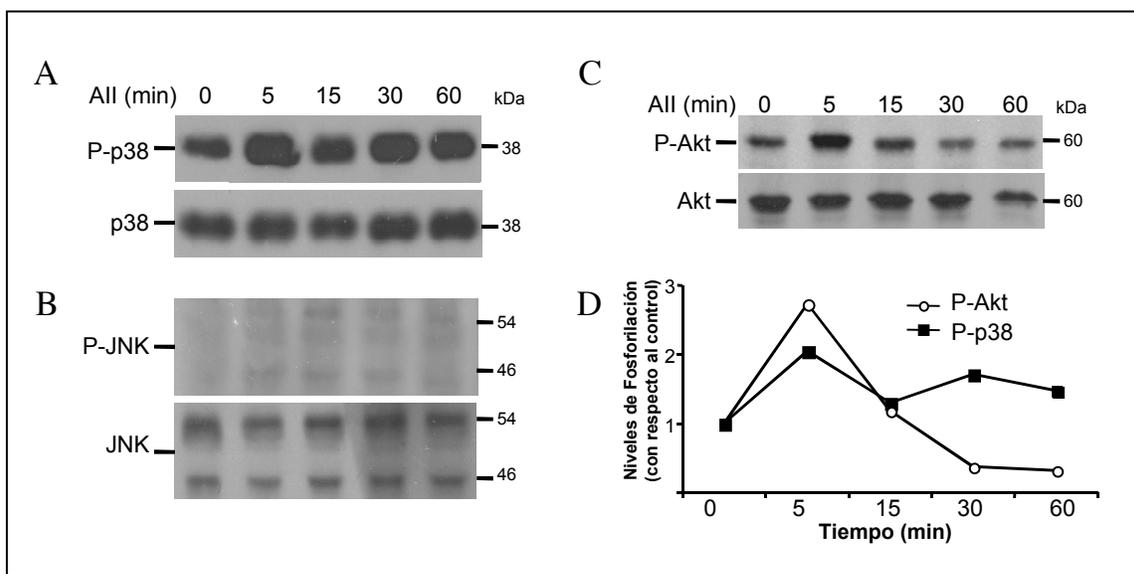
Entre las posibles vías de señalización involucradas en los efectos proliferativos y profibrogénicos de la AII están los miembros de la familia de las MAPK y PI3K, sin embargo, el mecanismo exacto por el cual la AII activa a las MAPK en las HSC no se ha descrito totalmente. En HSC cultivadas por 13 días se realizó una estimulación con AII  $1\mu\text{M}$  por 5, 15, 30 y 60 minutos para observar la posible activación de Akt y de los miembros de la familia de MAPK, utilizando anticuerpos específicos para las formas activas (fosforiladas) de Akt (p60), ERKs (p42 y p44), JNK (p54 y p46) y MAPK p38.

En los inmunoblots, se observa la activación de ERKs (figura 5A) a partir de los 5 minutos con un aumento de 20 veces con respecto al control, su disminución se da a partir de los 15 y hasta los 60 minutos (figura 5B). Para asegurarnos que la activación de ERKs fuera específica, se realizó un curso temporal de 1, 5, 15 y 60 minutos, además de un pretratamiento con inhibidores específicos para MAPK p38 (SB202190), para la MEK 1/2 la cinasa que fosforila a ERK1/2 (U0126) y de JNK (SP600125),  $10\mu\text{M}$  cada uno, además de la estimulación con AII  $1\mu\text{M}$  5 min (figura 5C). La activación de ERK1/2 por AII en HSC se confirmó es a partir de los 5 min y su fosforilación es por medio de MEK1/2, ya que al utilizar el inhibidor U0126 la fosforilación que se observa a los 5 min con AII se ve inhibida (figura 5C, D).



**Figura 6.** Fosforilación de ERK1/2 por All en HSC/MFB. A) HSC de 13 días de cultivo fueron estimuladas con All 1  $\mu$ M por los tiempos indicados, después se analizaron los extractos totales de proteína por inmunoblots para las formas fosforiladas de ERK1/2. B) Gráfica representativa de 3 experimentos que muestra los niveles de fosforilación (en unidades relativas) con respecto al control. C) Curso temporal de activación de ERKs por All en HSC de 13 días, más el uso de inhibidores específicos SB202190 (SB), U0126 (U0) y SP6001251 (SP) 10  $\mu$ M c/u 30 minutos antes de la estimulación con All 1  $\mu$ M por 5 minutos. D) Histograma representativo de los experimentos realizados en (C), de los niveles de fosforilación de ERK determinados por densitometría.

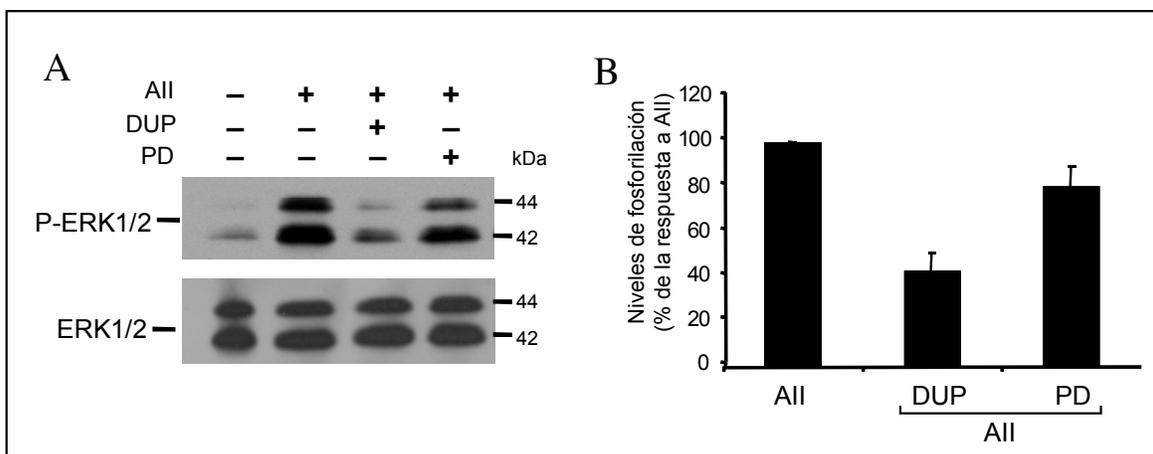
La All puede activar a otras vías del grupo de MAPK como JNK y p38 en VMSC, además de la vía de Akt (Mehta et al., 2006). En HSC/MFB, también se puede observar la activación de p38 2 veces (figura 7A, D) y Akt 2.7 (figura 7C, D) veces con respecto al control, ambas a partir de los 5 minutos de la estimulación con All 1  $\mu$ M, aunque su activación no es tan evidente como la de ERKs; y como se puede observar JNK no es activada por All en HSC (figura 7B).



**Figura 7.** Fosforilación y activación de p38 y Akt por All en HSC. HSC de 13 días de cultivo fueron estimuladas con  $1\mu\text{M}$  de All por los tiempos indicados, después se analizaron los extractos totales de proteína por inmunoblots para las formas fosforiladas y los niveles totales de p38 (A), JNK (B) y Akt (C). D) Gráfica representativa de los niveles de fosforilación con respecto al control de p38 y Akt, analizados por densitometría.

#### 4. La fosforilación de ERK1/2 es a través del receptor AT1

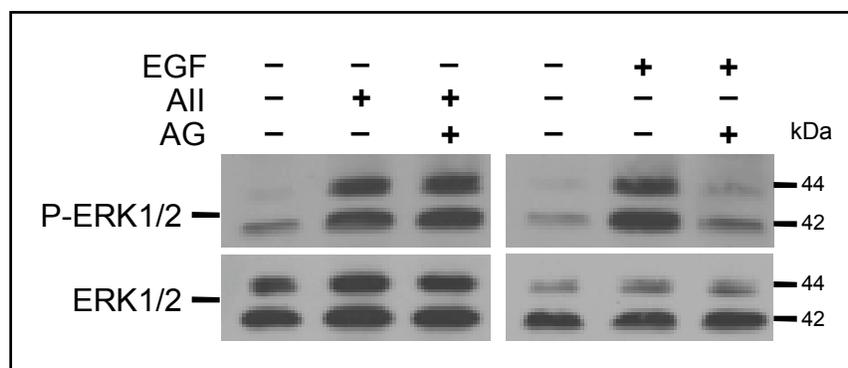
Ante la notable fosforilación de ERK1/2 en HSC activadas por All se decidió seguir estudiando esta vía de señalización. Para conocer qué receptor para All estaba involucrado en la activación de ERKs en HSC, se realizó una preincubación con antagonistas específicos para AT1 (DUP753,  $10\ \mu\text{M}$ ) y para AT2 (PD123177,  $10\ \mu\text{M}$ ), junto con la estimulación por 5 min con All  $1\ \mu\text{M}$  (figura 8). La activación de ERKs se ve disminuida con la utilización de DUP753, mientras que con el uso de PD123177 no hay disminución de esta activación, indicando que la All activa la vía de ERK1/2 a través del receptor AT1.



**Figura 8.** La activación de ERK1/2 por All en HSC de 13 días es a través de AT1. A) HSC de 13 días de cultivo fueron preincubadas 15 min antes de la estimulación con All 1 $\mu$ M por 5 minutos con el antagonista para AT1 (DUP753 [DUP], 10 $\mu$ M) y el antagonista para AT2 (PD123177 [PD], 10  $\mu$ M). B) Histograma representativo de los niveles de fosforilación de ERK en los experimentos realizados en (A), determinados por densitometría.

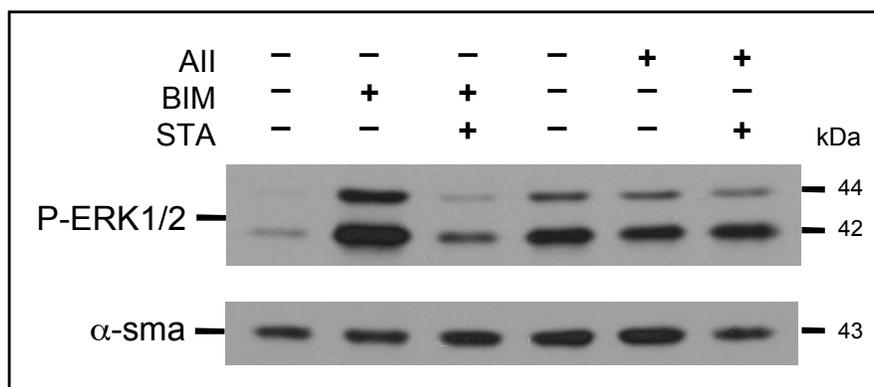
### 5. Participación de PKC en la activación de ERK1/2 por All

En la activación de MAPKs a través de los GPCR se encuentran varios efectores, existen reportes donde la activación de Ras se da por la transactivación del receptor a EGF (una vía clásica en la activación de ERKs), o a través de la activación de Raf por la PKC. La All en varios tipos celulares es capaz de transactivar al receptor a EGF (Shah et al., 2004). Para conocer como AT1 activa a las ERKs en HSC de 13 días, se utilizó en un primer ensayo un inhibidor de la cinasa del receptor a EGF (EGFR), AG1478. Como control de la inhibición del EGFR, las células se pretrataron con AG1478 0.1 $\mu$ M por 15 minutos y después se trataron con EGF 50ng/ml por 5 minutos, como se puede observar, la activación de ERKs por EGF es abatida por el inhibidor (figura 9). La incubación con 0.1 $\mu$ M de AG1478 15 minutos antes de la All 1 $\mu$ M por 5 min no disminuye la fosforilación de ERK1/2 (figura 9), indicando que All no activa a ERKs a través de la transactivación del EGFR.



**Figura 9.** La activación de ERK1/2 por All en HSC de 13 días no es a través de la activación del receptor a EGF (EGFR). HSC de 13 días de cultivo fueron preincubadas con 0.1  $\mu$ M AG1478 (AG), el inhibidor de la cinasa del EGFR y tratadas con All 1 $\mu$ M o EGF 50ng/ml por 5 minutos.

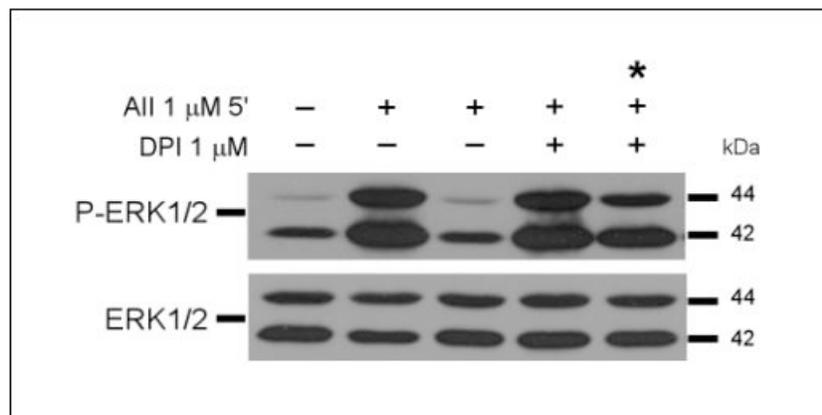
Para explorar el modelo de activación de ERKs inducida por la activación de PKC por AT1, se utilizaron dos inhibidores de la PKC, bisindolmaleimida 10 $\mu$ M (BIM) y estaurosporina 10 $\mu$ M (STA), con las cuales se preincubaron por 15 minutos antes de la estimulación con All 1  $\mu$ M por 5 minutos. BIM y STA disminuyen parcialmente (~60%) la activación de ERK (figura 10). Esto indica la participación de la PKC en la activación de ERK1/2 por All.



**Figura 10.** Participación de PKC en la activación de ERK1/2 por All en HSC de 13 días. En células de 13 días de cultivo se utilizaron dos inhibidores de PKC bisindolmaleimida (BIM) y estaurosporina 10 $\mu$ M, 15 minutos antes de la estimulación con 1 $\mu$ M de All. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -sma.

## 6. Participación de NADPH oxidasa en la activación de Erk1/2 en HSC

La AII es capaz de inducir la generación de ROS a través de la activación de la enzima NADPH oxidasa. Estas especies reactivas están involucradas en la activación y proliferación de las HSC, además participan en el incremento de la síntesis de colágena por estas mismas células con la activación de vías redox-sensibles (Cheng et al., 2005). Bataller y col., demostraron que la AII en HSC de humano es capaz de generar ROS a través de la NADPH oxidasa y que esta enzima esta involucrada en la activación de vías de señalización y en la expresión de genes (Bataller et al., 2003b). Para conocer la participación de la NADPH oxidasa en la activación de ERK en nuestro trabajo, se utilizó un inhibidor de flavoenzimas, el difenileneiodonio o DPI, utilizado ampliamente para inhibir a la NADPH oxidasa. Observamos que la activación de ERKs por AII 1 $\mu$ M en presencia de DPI 1 $\mu$ M no se ve disminuida, pero con una concentración mayor utilizada frecuentemente en estudios con macrófagos (DPI 10 $\mu$ M; Thakur et al., 2006), la fosforilación de ERK1/2 se ve disminuida alrededor de 40% (figura 11). La disminución parcial de la fosforilación de ERKs por el uso de inhibidores de PKC y de NADPH oxidasa sugieren la participación de ambas vías de señalización en la activación de ERK por AII en HSC.



**Figura 11.** Participación de la NADPH oxidasa en la activación de ERK1/2 por AII en HSC de 13 días. HSC de 13 días de cultivo fueron incubadas 2 horas con difenileneiodonio o DPI 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M (\*), antes de la estimulación con AII 1 $\mu$ M.

## **VII. Discusión**

Las células estrelladas hepáticas, HSC, son uno de los tipos celulares involucrados en la respuesta inflamatoria en el hígado ante algún daño. Su principal acción es como fuente de diversos factores proinflamatorios. Sin embargo, cuando se esta en una etapa crónica del proceso inflamatorio, el exceso de células y factores inflamatorios puede llevar a un proceso irreversible de fibrosis que implica el decaimiento de la función del tejido. Es por esto que las HSC se encuentran entre los diversos blancos de estudio para el tratamiento de la fibrosis hepática.

Desde hace varios años se ha descrito a la angiotensina II como un promotor de la fibrosis en distintos órganos, debido a la correlación que existe entre sus altos niveles y el índice de fibrosis que se presenta. A través de sus distintas acciones como factor proinflamatorio y de crecimiento, la angiotensina II puede inducir la proliferación de diversos tipos celulares y la producción de componentes de matriz extracelular. La activación de su receptor AT1 promueve la expresión de muchos mediadores como citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión a través de la activación de varias rutas de señalización.

Entre las principales citocinas involucradas en el proceso profibrótico se encuentra el TGF- $\beta$ . Este factor es uno de los principales factores que inducen la expresión y el depósito varios componentes de matriz extracelular como distintos tipos de colágena (I-IV), fibronectina y elastina. La angiotensina II es uno de los factores que induce la expresión de TGF- $\beta$ , aunque aun no se sabe el mecanismo específico por el cual lo hace. En un reporte con células mesangiales de riñón, se demostró que la AII activa al promotor del TGF- $\beta$ 1 mediante la unión de AP-1 al promotor de TGF- $\beta$ 1 y se cree, es a través de la activación de p38 y dependiente de la PKC (Weigert et al, 2002). En este estudio se resalta el papel del receptor AT1, ya que el uso de antagonistas abate la respuesta obtenida.

Las 3 isoformas expresadas en mamíferos del TGF- $\beta$ , son codificadas por distintos genes y son sintetizadas como formas latentes que necesitan de la acción de proteasas para liberar la forma activa. Las isoformas del TGF- $\beta$  tienen las mismas

acciones biológicas *in vitro* y pueden ser intercambiables en la mayoría de los casos. La diferencia más clara entre ellas, es su expresión regulada tejido-específico y en el desarrollo embrionario en distintas etapas (Roberts, 1998, Yu et al., 2003).

En nuestro trabajo, se observa claramente la inducción de 2 de las 3 isoformas del TGF- $\beta$  en HSC de 7 días de cultivo por la AII. La primera en ser regulada es la isoforma 3 del TGF- $\beta$ , ya que aumenta sus niveles de RNAm desde los 30 min (2 veces con respecto al control). El RNAm del TGF- $\beta$ 2 aumenta lentamente después de las 2 hrs y hasta las 24 hrs, alcanzando su nivel más alto, 2.4 veces con respecto al basal, en este tiempo. En cambio, el TGF- $\beta$ 1 no es regulado positivamente en todo el tratamiento con la AII.

La expresión de cada isoforma es controlada por el tipo de promotor que contienen sus genes, además cada isoforma del TGF- $\beta$  puede regularse por las otras dos. El TGF- $\beta$ 1 se distingue de las isoformas 2 y 3 por carecer de caja TATAA y por la presencia de múltiples sitios regulatorios, los cuales pueden ser activados por genes de respuesta temprana como *c-jun* y *c-fos* que conforman al factor de transcripción AP-1. Con esto se propone que el TGF- $\beta$ 1 es expresado selectivamente en procesos de reparación, en respuesta a estrés, enfermedades virales y cáncer.

En nuestro trabajo, la isoforma 1 del TGF- $\beta$  no es regulada positivamente de forma directa por la AII en HSC/MFB. El TGF- $\beta$ 1 es la isoforma que más se ha estudiado en HSC y es el estímulo dominante en estas células para la producción de componentes de MEC, en la proliferación y en el mantenimiento de su activación, más que iniciarla. En estudios *in vitro*, se ha demostrado que en las HSC/MFB a diferencia de las HSC quiescentes se presenta una alta producción de componentes de MEC como la fibronectina, que no pueden ser elevados aún con el uso de citocinas que inducen su expresión como el TGF- $\beta$ . Este podría ser el caso del TGF- $\beta$ 1 en nuestro estudio, donde su expresión ya no es regulada por el tratamiento con AII, o es muy posible que se necesite la síntesis de proteínas para la regulación de esta isoforma, ya que en estos experimentos el uso de CHX bloquea la síntesis de proteínas.

TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, en cambio, aumentan la expresión de su RNAm en HSC directamente por el tratamiento con AII. Ambas isoformas tienen promotores que presentan una caja TATAA y un elemento proximal CRE-ATF que sugieren un control embrionario y hormonal (Roberts, 1998). Aunque en este estudio se desconoce que factores de transcripción participan directamente en la regulación de su expresión, se ha descrito que algunas de las proteínas que se unen a estos sitios son regulados por PKC y MAPK (O'Reilly et al., 1992; Lu et al., 2001).

Por ejemplo, el promotor del TGF- $\beta$ 3 tiene un sitio RRE (elemento de respuesta a raloxifen) al que se puede unir el receptor a estrógeno, O'Reilly y col. demostraron que este factor de transcripción activa la expresión del TGF- $\beta$ 3 y que dependía de las vías de PKC y MEK. En el promotor del TGF- $\beta$ 2 hay un sitio de unión a ATF-2, este factor como se sabe es regulado por miembros de la familia de MAPK, particularmente por p38 (Yang et al., 2003). En un reporte reciente de Bataller y col, la AII regula de manera positiva la expresión del TGF- $\beta$ 2 y esta expresión es disminuida con el uso de DPI, el inhibidor de la NADPH oxidasa (Bataller et al., 2003).

En experimentos preliminares realizados en HSC activadas, la preincubación con U0126, estaurosporina y DPI además del tratamiento con AII, se observa que estaurosporina y DPI disminuyen la expresión del TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 (datos no mostrados) implicando la participación de PKC y de ROS generados por la NADPH oxidasa en la expresión de estas isoformas por AII.

Dependiendo del contexto celular y las señales existentes en el medio extracelular, existen diferencias en la regulación de la expresión de las isoformas y también en su acción sobre las células. Aún no se conoce con exactitud el papel de cada isoforma en el proceso fibrogénico, ni su acción sobre las HSC. En procesos de reparación en epidermis, las 3 isoformas tienen efectos similares en la expresión de MEC, aunque existen variaciones entre ellas en su acción antiproliferativa en keratinocitos y en la angiogénesis. Se ha observado además, que el TGF- $\beta$ 3 tiene un papel regulatorio en la expresión de TGF- $\beta$ 1 controlando sus niveles después de la expresión de TGF- $\beta$ 3 (Kinbara et al., 2002). En experimentos in vitro de la acción de las

isoformas del TGF- $\beta$  sobre distintas células del riñón, muestran que las tres isoformas tienen los mismos efectos en cuanto al incremento en la producción de MEC; además con la adición de 2 o las 3 isoformas del TGF- $\beta$ , se tiene efecto sinérgico en la producción de MEC (Yu et al., 2003).

En cuanto a las señales intracelulares activadas por la AII que pudieran regular a las isoformas del TGF- $\beta$ , en este trabajo hemos observado en curso temporal con AII en HSC activadas de 13 días que induce la activación de ERK1/2, p38 y Akt. La activación de estas vías, esta relacionada con efectos de proliferación, diferenciación y fibrosis. La notable fosforilación de ERK1/2, de 20 veces con respecto control, es a través del receptor AT1 para AII. La activación de la vía de ERKs por AII participa en la producción de varios componentes de la MEC como por ejemplo la colágena tipo I (Tharaux et al., 2000), además ERKs es una de las principales vías de señalización involucradas en la proliferación de las HSC (Li et al., 1999).

En el laboratorio, se ha observado que en las HSC de dos días de cultivo (quiescentes), no existe una activación de las ERK a diferencia de las HSC de 13 días (activadas). La hipótesis que se propone es que en las células quiescentes el receptor AT1 no se encuentra expresado en la membrana y no puede activar a ERK, mientras que en las HSC de 13 días con su fenotipo de miofibroblasto hay una alta expresión del receptor AT1, una notable activación de ERK y por lo tanto una alta proliferación de estas células.

La activación de ERKs puede llevarse a cabo por la activación de receptores con actividad intrínseca de cinasa de residuos de tirosina y el acoplamiento de proteínas que activan a la proteína G monomérica Ras. La activación de Ras inicia una cascada de activación de cinasas que lleva a la activación de ERK1/2. La activación de ERK1/2 por la AII involucra la activación de diversas vías que llevan a la fosforilación de ERKs. Por ejemplo, se ha estudiado que la PKC, la transactivación del EGFR, la activación de cinasas dependientes de Ca<sup>2+</sup>, la activación de PI3K, entre otros participan en la activación de ERKs (Gutkind et al., 2000).

El EGFR se puede activar por la AII, a través de la activación de metaloproteasas que liberen el HB-EGF anclado a la membrana plasmática (Shah et al.,

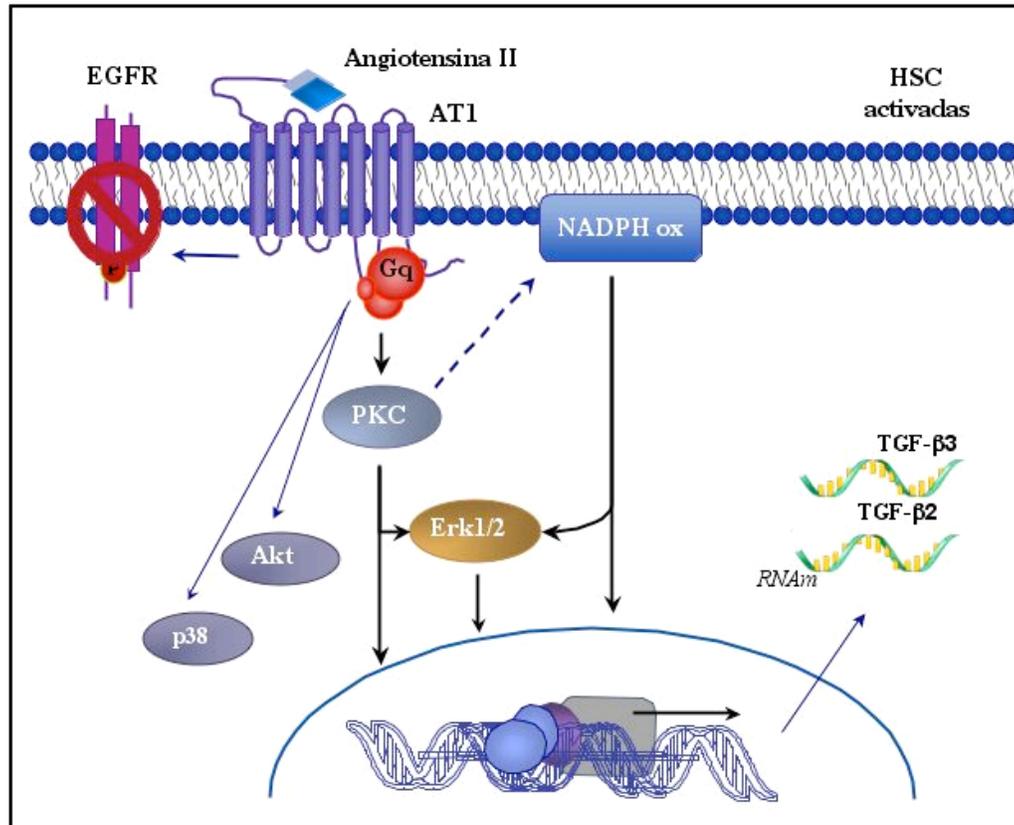
2004). También se ha reportado la activación de cinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  como Src o Pyk2, pueden fosforilar al receptor directamente o activar a MMPs; además existen otros reportes donde la AII a través de la generación de ROS transactiva al EGFR y activa a MAPK (Saito et al., 2001). La AII es capaz de activar al EGFR en fibroblastos cardíacos (Moriguchi et al., 1999) y a la PKC en miocitos cardíacos (Zou et al., 1996) induciendo la activación de MAPK. En las HSC de 13 días de cultivo, observamos que en la activación de ERKs no es a través del EGFR, ya que el uso de AG1478 un inhibidor específico para el EGFR no abate la fosforilación de ERKs.

La PKC es activada por la AII y su receptor AT1, a través de la estimulación de la PLC, activada por la proteína heterotrimerica Gq, y por el aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. La PKC puede fosforilar a Raf y activar así la vía de MAPK, esto depende del tipo celular y la diversidad de isoformas de la PKC que se encuentren en la célula (Gutkind, 2000). Como se puede observar, en la activación de ERKs participan la PKC y la NADPH oxidasa, como se demostró por la disminución parcial de la fosforilación de ERK1/2 en presencia de inhibidores específicos para la PKC, estaurosporina y bisindolilmaleimida, y la para la NADPH oxidasa, el DPI. Esta última enzima es responsable de la generación de ROS y muchas proteínas de señalización son sensibles a estas, como p38 y Src (Mehta et al., 2006). En la fibrosis hepática, el estrés oxidativo producido por las ROS generado por la NADPH oxidasa de las HSC contribuye a la remodelación del tejido y a la fibrogénesis (Minicis et al., 2006)

La activación de ERK por receptores acoplados a proteínas G es un fenómeno donde pueden participar tanto proteínas adaptadoras como por ejemplo la  $\beta$ -arrestina, así como distintas cinasas. Existen reportes donde cinasas como Src y GRK (cinasa de los receptores acoplados a proteínas G) que al ser activadas por AII, llevan a la fosforilación de ERK1/2. En el caso de GRK, se conoce que al fosforilar al receptor se lleva a la internalización del mismo, esta endocitosis es necesaria la activación de ERKs (Gutkind, 2000). La cinasa Src también puede llevar a la activación de ERK1/2, independientemente de la activación de la PKC por la AII (Seta et al., 2002).

La AII y las HSC son actores importantes en el desarrollo de la fibrosis hepática. Las vías de señalización intracelular que la AII activa a través de sus receptor AT1, son las responsables de los efectos de la AII en el desarrollo de la fibrosis. Las vías

dependientes de PKC, la NADPH oxidasa y de ERK activadas por AII, participan en la proliferación de las HSC y son responsables de la regulación de varios genes, entre ellos, componentes de la MEC y las isoformas del TGF- $\beta$  (figura 12).



**Figura 12. Modelo de activación de la expresión del TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 por la Angiotensina II en células estrelladas hepáticas de rata.** La expresión de las isoformas del TGF- $\beta$  por AII está regulada posiblemente por las vías de señalización dependientes de PKC y NADPH oxidasa, aún se necesitan más estudios. En la activación de ERK por Angiotensina II en células estrelladas observada en este estudio, participan la PKC y la NADPH oxidasa, y no interviene el receptor a EGF.

## **VIII. Conclusiones**

- La Angiotensina II (All) induce la expresión de las isoformas TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 en células estrelladas hepáticas activadas (HSC) de rata de 7 días de cultivo primario.
- La primera isoforma en expresarse por el tratamiento con All en HSC, fue el TGF- $\beta$ 3 a los 30 minutos del tratamiento, aumentando sus niveles de mensajero 2 veces con respecto al control. El TGF- $\beta$ 2 aumenta su expresión lentamente alcanzando un nivel máximo a las 24 hrs. En cambio el TGF- $\beta$ 1 permanece sin un cambio significativo durante todo el tratamiento con All.
- La All induce la activación de las vías de señalización ERK1/2, p38 y Akt en HSC de 13 días de cultivo, a los 5 minutos del tratamiento.
- La All activa de manera notable a la vía de señalización de Erk1/2 a partir de los 5 minutos a través de su receptor AT1. La fosforilación de Erk1/2 por la All no es dependiente de la transactivación del receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFR). En la activación de Erk1/2 participan la PKC y la NADPH oxidasa de manera parcial, ya que en la presencia de inhibidores de ambas enzimas, se redujo la fosforilación de ERKs.

## ***IX. PERSPECTIVAS***

- La AII a través de distintas vías de señalización induce la expresión de distintos genes como los de la colágena tipo I y el TGF- $\beta$ 1. En las HSC, la AII es capaz de regular positivamente a el TGF- $\beta$ 2 y el TGF- $\beta$ 3, pero se desconoce que factores de transcripción intervienen en ello. Por tanto, sería interesante estudiar que factores están participando en esta regulación.
- El TGF- $\beta$  es una citocina que contribuye a la regulación de la matriz extracelular y es un factor importante en el desarrollo de fibrosis. Las distintas isoformas del TGF- $\beta$  participan en el desarrollo embrionario en un tiempo y espacio definidos. En cambio, poco se sabe acerca del papel de cada isoforma en el desarrollo de la fibrosis hepática. Sería importante determinar el papel de cada isoforma sobre las HSC, células orquestadoras de la fibrosis hepática.
- Las células estrelladas hepáticas son las principales orquestadoras de las respuestas inflamatorias en el hígado que conllevan a la generación de fibrosis. La capacidad que tienen de reponder a distintos estímulos una vez que son activadas depende de la expresión de distintos receptores en su membrana plasmática. Es posible que el receptor AT1 a AII en HSC quiescentes no se exprese en la membrana, ya que no son responsivas a esta hormona, en cambio cuando son activadas sí responden. Se propone conocer la expresión de AT1 tanto en HSC quiescentes como HSC activadas.

## X. REFERENCIAS

1. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGF- $\beta$  activation. *J. Cell Sci.* 116, 217–224, 2003.
2. Aoki H, Richmond M, Izumo S, Sadoshima J. Specific role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro. *Biochem J.* 347: 275-284, 2000.
3. Bataller R, Gabele E, Schoonhoven R, Morris T, Lehnert M, Yang L, Brenner DA, Rippe RA. Prolonged infusion of angiotensin II into normal rats induces stellate cell activation and proinflammatory events in liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003a Sep;285(3):G642-51.
4. Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbign MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* 2000 Jun;118(6):1149-56.
5. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, Qian T, Schoonhoven R, Hagedorn CH, Lemasters JJ, Brenner DA. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest.* 2003b Nov;112(9):1383-94.
6. Bedossa P., Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol* 200: 504-515, 2003.
7. Blomhoff R., Wake K. Perinuclear cells of the liver: important roles in retinoid metabolism and fibrosis. *FASEB J.* 5: 271-277, 1991.
8. Border W., Noble N. TGF- $\beta$ . *Scientific American* January/February 68-77, 1995.
9. Bottari S., de Gasparo M., Steckelings U, Levens N. Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms and possible physiological implications. *Frontiers in Neuroendocrinology* 14(2): 123-171, 1993.
10. Carey R., Siragy H. Newly recognized components of the Renin-Angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocrine Reviews* 24(3): 261-271, 2003.
11. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit* 11(6): RA194-205, 2005.
12. de Caestecker, M. The Transforming growth factor- $\beta$  superfamily of receptors. *Cytokine & Growth Factors Reviews* 15: 1-11, 2004.
13. de Gasparo M., Catt, K. Inagami, T., Wright, J., Unger, T. International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacol Rev* 52:415–472, 2000.
14. Derynck R., Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature* 425: 577-585, 2003.
15. Dinh D., Frauman A., Johnston C., Fabiani M. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clinical Science* 100: 481-492, 2001.
16. Ettinger J. S.-Feldman C. E. Pathophysiology and Laboratory Diagnosis of Hepatobiliary Disorders. *Diseases of the Liver. Textbook of Veterinary Internal Medicine.* 4th Ed. Saunders. Philadelphia Pennsylvania. 1995.
17. Frank GD, Eguchi S, Yamakawa T, Tanaka S, Inagami T, Motley ED. Involvement of reactive oxygen species in the activation of tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase by angiotensin II. *Endocrinology.* 2000 Sep;141(9):3120-6.
18. Friedman S. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *Journal of Biological Chemistry* 275(4): 2247-2250, 2000.
19. Ganong, W. *Fisiologia medica. Manual Moderno, México* 2002. 885 pp
20. Hamaguchi A, Kim S, Izumi, Zhan Y, Yamanaka S, Iwao H. Contribution of extracellular signal-regulated kinase to angiotensin II-induced transforming growth factor- $\beta$ 1 expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 34:126-131, 1999.
21. Howat WJ, Holgate ST, Lackie PM. TGF- $\beta$  isoform release and activation during in vitro bronchial epithelial wound repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002 Jan;282(1):L115-23.
22. Kawano H, Do YS, Kawano Y, Starnes V, Barr M, Law RE, Hsueh WA. Angiotensin II Has Multiple Profibrotic Effects in Human Cardiac Fibroblasts. *Circulation* 101:1130-1137, 2000.

23. Kinbara T, Shirasaki F, Kawara S, Inagaki Y, de Crombrughe C, Takehara K. Transforming growth factor-beta isoforms differently stimulate proalpha2 (I) collagen gene expression during wound healing process in transgenic. *J Cell Physiol* 190:375-381, 2002.
24. Laesk A, Abraham DJ. TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 18: 816-824, 2004.
25. Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: New insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol.* 1999 Jul;14(7):618-33.
26. López-Casillas F. El lado oscuro y el lado brillante del TGF- $\beta$ . *Mensaje bioquimico XXII* 137-161, 1998.
27. Lotersztajn S., Julien B., Teixeira-Clerc, F., Grenard, P., Mallat, A. Hepatic Fibrosis: Molecular mechanisms and Drug targets. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 605-28, 2005.
28. Lu D, Giguere V. Requirement of Ras-dependent pathways for activation of the transforming growth factor beta3 promoter by estradiol. *Endocrinology.* 2001 Feb;142(2):751-9.
29. Marshall R., McAnulty R., Laurent G. Angiotensin II is mitogenic for human lung fibroblast via activation of the type I receptor. *Am Respir Crit Care Med* 161: 1999-2004, 2000.
30. Martinez-Hernandez A., Sebastian P. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J.* 9: 1401-1410, 1995.
31. McKaig BC, Hughes K, Tighe PJ, Mahida YR. Differential expression of TGF-beta isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Jan;282(1):C172-82.
32. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II Cell Signalling: Physiological and Pathological Effects in the Cardiovascular System. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Jul 26.
33. Moriguchi Y., Matsubara H., Mori Y., Murasawa S., Masaki H., Maruyama K., Tsutsumi Y., Shibasaki Y., Tanaka Y., Nakajima T., Oda K., Iwasaka T. Angiotensin II-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates fibronectin and transforming growth factor-b synthesis via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Circ Res* 84:1073-1084, 1999.
34. O'Kane S, Ferguson MWJ. Transforming growth factor  $\beta$ s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 29 (1):63-78, 1997.
35. O'Reilly MA, Geiser AG, Kim SJ, Bruggeman LA, Luu AX, Roberts AB, Sporn MB. Identification of an activating transcription factor (ATF) binding site in the human transforming growth factor-beta 2 promoter. *J Biol Chem.* 1992 Oct 5;267(28):19938-43.
36. Ratzliff V., Friedman S. Pathobiology of Hepatic Stellate Cells. En: "Functional heterogeneity of liver tissue: from cell lineage to sublobular compartment-specific pathogenesis". Edit: Vidal-Vanaclocha F. RG Landes Company and Chapman & Hall. Texas, EU. 1997
37. Roberts AB. Molecular and Cell biology of TGF- $\beta$ . *Miner Electrolyte Metab* 24:111-119, 1998.
38. Saito Y, Berk BC. Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol.*33(1):3-7, 2001.
39. Sato M., Suzuki S., Senoto H. Hepatic stellate cells: Unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Structure and Function* 28: 105-112, 2003.
40. Shah BH, Yesilkaya A, Olivares-Reyes JA, Chen HD, Hunyady L, Catt KJ. Differential pathways of angiotensin II-induced extracellularly regulated kinase 1/2 phosphorylation in specific cell types: role of heparin-binding epidermal growth factor. *Mol Endocrinol* 18(8):2035-48, 2004.
41. Shi Y., Massagué J. Mechanisms of the TGF- $\beta$  signaling from Cell Membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700, 2003.
42. Thakur V, Pritchard MT, McMullen MR, Wang Q, Nagy LE. Chronic ethanol feeding increases activation of NADPH oxidase by lipopolysaccharide in rat Kupffer cells: role of increased reactive oxygen in LPS-stimulated ERK1/2 activation and TNF-alpha production. *J Leukoc Biol.* 2006 Jun;79(6):1348-56
43. Tharaux PL, Chatziantoniou C, Fakhouri F, Dussaule JC. Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway. *Hypertension* 36(3):330-6, 2000.
44. Ushio-Fukai M., Alexander RW, Akers M., Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griendling K. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 274: 22699-22704, 1999.
45. Takahashi T, Taniguchi T, Konishi H, Kikkawa U, Ishikawa Y, Yokoyama M. Activation of Akt/protein kinase B after stimulation with angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1999 Jun;276(6 Pt 2):H1927-34.

46. Weigert C., Brodbeck K., Klopfer K., Haring U., Schleicher ED. Angiotensin II induces TGF- $\beta$ 1 promoter activation: similarity to hyperglycaemia. *Diabetologia* 45: 890-898, 2002.
47. Wu, L, Cox, A, Roe, C, Dziadek, M, Cooper, M., Gilbert, R. Transforming growth factor beta 1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Kidney International* 51: 1553-1567, 1997.
48. Yamada T., Kuno A., Masuda K., Ogawa K., Sogawa M., Nakamura S., Ando T., Sano H., Nakasawa T., Ohara H., Nomura T., Joh T., Itoh M. Candesartan, an Angiotensin II Receptor Antagonist suppress pancreatic inflammation and fibrosis in rats. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics* 307: 17-23, 2003.
49. Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene*. 2003 Nov 27;320:3-21.
50. Yang X, Zhu MJ, Sreejayan N, Ren J, Du M. Angiotensin II promotes smooth muscle cell proliferation and migration through release of heparin-binding epidermal growth factor and activation of EGF-receptor pathway. *Mol Cells*. 2005 Oct 31;20(2):263-70.
51. Yin G., Yan C., Berk BC. Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases. *The international journal of Biochemistry & Cell biology* 35: 780-783, 2003
52. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Fukui H. Angiotensin-II induces the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 through the protein kinase-C signaling pathway in rat liver fibrosis development. *Hepatology* 2003 Sep;27(1):51-56.
53. Yoshiji H., Kuriyama S., Yoshii J., Ikenaka Y., Noguchi R., Nakatani T., Tsujinoue H., Fukui H. Angiotensin II type I receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 34: 745-750, 2001.
54. Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Aikawa R, Kudoh S, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Yazaki Y. Protein Kinase C, but Not Tyrosine Kinases or Ras, Plays a Critical Role in Angiotensin II-induced Activation of Raf-1 Kinase and Extracellular Signal-regulated Protein Kinases in Cardiac Myocytes. *J. Biol. Chem* 271(52):33592-7, 1996.