



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**  
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

MECANISMOS MOLECULARES DE  
REGULACIÓN Y DE ACCIÓN DE LA  
CITOCINA TGF- $\beta$  EN PROCESOS  
INVOLUCRADOS EN LA REMODELACIÓN  
TISULAR

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
**DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**  
P R E S E N T A :  
**PAOLA MORENO ALVAREZ**



Tutor: Dra. MARINA MACIAS SILVA

MÉXICO, D. F.

SEPTIEMBRE 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

# MECANISMOS MOLECULARES DE REGULACIÓN Y DE ACCIÓN DE LA CITOCINA TGF- $\beta$ EN PROCESOS INVOLUCRADOS EN LA REMODELACIÓN TISULAR

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección de la Dra. Marina Macías Silva en el Departamento de Biología Celular y Desarrollo 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. Claudia Gonzalez Espinosa	Depto. Farmacobiología, CINVESTAV
Dra. Yvonne J. Rosenstein Azoulay	Instituto de Biotecnología, UNAM

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

Se reconoce la colaboración del Dr. José Pedraza Chaverri y del M. en C. Eduardo Molina Jijón, del Departamento de Biología de la Facultad de Química-UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de detección de especies reactivas de oxígeno.

Se reconoce la asesoría del Dr. José Vázquez Prado y la asesoría técnica del M. en C. Ricardo Hernández García del Departamento de Farmacología del CINVESTAV, por su ayuda en la sección de  $G\alpha_{13}$  y RhoA.

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

El proyecto fue apoyado parcialmente por Dirección General de Asuntos del Personal Académico/UNAM [IN214206 and IN222909], Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [49493-Q y 101826], Third World Academy of Science [TWAS, 05-253] y Fundación Miguel Alemán A.C.. Durante los estudios de doctorado fui apoyada con una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado en el mes de Septiembre de 2010.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Rolando Efrain Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Ernesto Maldonado Olvera	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dra. Claudia González Espinosa	Dpto. Farmacobiología, CINVESTAV
Suplente	Dra. Marta Menjívar Iraheta	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Karlen Gazarian Gazarian	Inst. de Invest. Biomedicas, UNAM

## *Dedicatorias*

*A mis padres y hermanos, por su apoyo*

*A mis abuelos, LUZ de mi camino*

*A mis amigos, por su confianza y ayuda*

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS QUE ME HIZO SABER QUE EXISTE EN LOS MOMENTOS MAS DIFÍCILES.

A LA DRA. YVONNE R. QUIEN CREYÓ EN MI Y ME APOYO PARA SALIR ADELANTE, ES UN EJEMPLO DE VIDA TANTO PERSONAL COMO PROFESIONAL, GRACIAS POR PREOCUPARSE POR SUS ALUMNOS.

AL DOC PACO VÁZQUEZ, LIZBETH, ADVERQUEYDI Y GENARO POR LOS MOMENTOS MÁS DIVERTIDOS Y EXTRAÑOS DENTRO Y FUERA DEL LABORATORIO, DE QUIENES APRENDÍ MUCHO, SON LOS MEJORES COMPAÑEROS Y AMIGOS QUE PUDE TENER.

A LOS AMIGOS QUE CONOCÍ EN LA UNAM Y LOS QUE SIGUEN DENTRO DE ESTA HERMOSA UNIVERSIDAD.

A MIS AMIGOS DEL IFC Y DEL CINVESTAV, POR LA PEQUEÑA GRAN AYUDA QUE SIEMPRE ME BRINDARON PARA CONTINUAR CON EL TRABAJO DEL LAB Y SUS CONSEJOS PARA SEGUIR EN ESTE CAMINO.

AGRADEZCO MUY ESPECIALMENTE A GENARO VÁZQUEZ, NUESTRO LIDER, A QUIEN ADMIRO PROFUNDAMENTE POR SU ÉTICA Y HONESTIDAD EN EL TRABAJO. GRACIAS POR TANTOS AÑOS DE AMISTAD.

A MIS AMIGOS DE TODA LA VIDA FELIPE Y ALFONSO PORQUE SIEMPRE CUENTO CON ELLOS Y SIGUEN JUNTO A MI, SIEMPRE LOS VOY A NECESITAR.

A JULIO POR SU COMPRESIÓN, AGUANTE, APOYO Y CARIÑO.

A FAREZ ZEIDÁN PORQUE EN UNOS CUANTOS DIAS CAMBIO MI PERSPECTIVA DE LA VIDA.

I GET BY WITH A LITTLE HELP FROM MY FRIENDS  
I GET HIGH WITH A LITTLE HELP FROM MY FRIENDS  
I'M GOING TO TRY WITH A LITTLE HELP FROM MY FRIENDS.

A LA UNAM QUE SE CONVIRTIO EN MI PRINCIPAL HOGAR.

AGRADEZCO A LA DRA. MARINA MACÍAS SILVA POR SU ASESORIA EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A LA DRA. YVONNE ROSENSTEIN Y LA DRA. CLAUDIA GONZÁLEZ, QUE FORMARON PARTE DE MI COMITÉ TUTORIAL POR SUS CONSEJOS Y ORIENTACIÓN EN LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO Y SUS VALIOSOS CONSEJOS DE VIDA.

AL DR. JOSÉ VÁZQUEZ PRADO POR SU ASESORIA Y AYUDA CON PARTE DE ESTE TRABAJO.

A LETY QUE SIN SU AYUDA EN EL POSGRADO TODO SERÍA MAS COMPLICADO Y CAÓTICO.

A RICARDO GARCÍA POR SU GRAN AMISTAD, CONSEJOS Y PACIENCIA.

A JACIEL MEDINA Y A EDUARDO MOLINA POR SU CAMARADERÍA Y PRECIADA AYUDA.

A REBECA POR SU AMISTAD, Y SU VALIOSA COOPERACIÓN CON LAS RATAS.

## ÍNDICE

Índice de figuras y tablas	iii
Abreviaturas	v
Resumen	1
Abstract	2
I. INTRODUCCIÓN	3
1. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ )	3
1.1 La Superfamilia del TGF- $\beta$	4
1.2 Vías de señalización del TGF- $\beta$	8
2. Participación del TGF- $\beta$ en procesos reguladores de la remodelación tisular como la fibrosis y la transición epitelio mesénquima.	11
2.1 Fibrosis Hepática	13
3. La transición epitelio-mesénquima (EMT) como origen de miofibroblastos	16
3.1 Principales cambios celulares producidos durante la EMT	18
4. Angiotensina II y el proceso de fibrogénesis hepática	20
II. ANTECEDENTES	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
III. HIPÓTESIS	25
IV. OBJETIVOS	25
V. MATERIAL Y MÉTODOS	27
1. Cultivos primarios de Células Estrelladas Hepáticas	27
2. Líneas Celulares	28
3. Inmunoblots	28
4. Inmunoprecipitación	28
5. Inmunofluorescencia	29
6. Ensayo de Activación de RhoA	29



7. Aislamiento de RNA y Ensayo de protección de la RNAsa I (RPA)	30
8. Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)	30
9. RT-PCR	31
10. Transfección	32
11. Ensayo de genes reporteros	32
12. Bioinformática	32
13. Análisis estadístico	33
VI. RESULTADOS	34
1. La Angiotensina II induce la expresión de las isoformas del TGF- $\beta$ en HSC	34
2. El TGF- $\beta$ y la transición Epitelio-Mesénquima en células A549	36
3. Activación de RhoA por TGF- $\beta$ en células A549	39
4. Interacción de G $\alpha$ 13 y de los receptores a TGF- $\beta$	41
5. Participación de G $\alpha$ 13 en la activación de RhoA por TGF- $\beta$ en células A549	47
VII. DISCUSIÓN	50
La angiotensina II regula la expresión de las isoformas del TGF- $\beta$ en HSC de rata	50
Participación de G $\alpha$ 13 en la activación de RhoA por TGF- $\beta$ en un modelo de EMT	54
VIII. CONCLUSIONES	57
IX. PERSPECTIVAS	57
X. REFERENCIAS	58
ANEXO	62

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura del TGF- $\beta$	6
Figura 2. Síntesis y activación del TGF- $\beta$	7
Figura 3. Familia de receptores tipo I y tipo II de la superfamilia del TGF- $\beta$	9
Figura 4. Vías de señalización del TGF- $\beta$	11
Figura 5. Modelo de activación de las Células Estrelladas Hepáticas (HSC)	15
Figura 6. Tipos de transición epitelio-mesénquima (EMT) en condiciones patológicas	17
Figura 7. Participación de Angiotensina II en la respuesta inflamatoria	21
Figura 8. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por All a través de la Nox en HSC activadas de rata	35
Figura 9. Cambios morfológicos inducidos por TGF- $\beta$ en células A549, dependientes de la actividad de cinasa de T $\beta$ RI.	37
Figura 10. Represión de E-caderina y expresión de Snail por TGF- $\beta$ en A549	38
Figura 11. Formación de fibras de estrés en células A549 por TGF- $\beta$	39
Figura 12. La activación de RhoA es necesaria para los cambios morfológicos inducidos por TGF- $\beta$ en células A549	40
Figura 13. Activación de vías de señalización por TGF- $\beta$ en células A549.	41
Figura 14. La activación de ERK1/2 y RhoA por TGF- $\beta$ en A549 no depende de la actividad de cinasa de T $\beta$ RI	42
Figura 15. Esquema representativo de la subfamilia de RhoGEFs con dominios RGS	44
Figura 16. G $\alpha$ 13 interactúa con los receptores a TGF- $\beta$ .	44
Figura 17. En células L17, G $\alpha$ 13 no interactúa con los receptores a TGF- $\beta$	45
Figura 18. Curso temporal de asociación entre G $\alpha$ 13 y los receptores a TGF- $\beta$ .	46
Figura 19. Activación de RhoA por G $\alpha$ 13 en AD293	47
Figura 20. Expresión de RhoGEFs y G $\alpha$ 13 en células A549	47
Figura 21. G $\alpha$ 13 interactúa con los receptores a TGF- $\beta$ de manera endógena en células A549	48
Figura 22. Participación de PDZ- y LARG-RhoGEFs en la activación de RhoA por TGF- $\beta$ en células A549	49

Figura 23. Modelo integrativo del papel del TGF- $\beta$  durante la reparación tisular 50

**TABLAS**

Tabla I. Miembros de la Superfamilia del TGF- $\beta$ y sus principales funciones.	5
Tabla II. Efectos del TGF- $\beta$ 1 sobre la expresión de los principales componentes de matriz extracelular.	13
Tabla III. Principales marcadores de la EMT	19
Tabla IV. GEFs candidatos que regulan la función de GTPasas de la familia de Rho encontrados en LUMIER y OPHID	43

## ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math>-sma</b>	$\alpha$ -actina de músculo liso
<b>AII</b>	Angiotensina II
<b>APO</b>	Apocinina
<b>AT1</b>	Receptores tipo 1 a angiotensina II
<b><math>\beta</math>-gal</b>	$\beta$ -galactosidasa
<b>BIM</b>	Bisindolilmaleimida
<b>BMP</b>	Proteínas morfogenéticas de hueso
<b>CTGF</b>	Factor de crecimiento de tejido conectivo
<b>DHE</b>	Dihidroetidio
<b>DPI</b>	Difenileneiodonio
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>EMT</b>	Transición epitelio mesénquima
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FSP-1</b>	Proteína específica de fibroblastos-1
<b>GAP</b>	Proteínas activadoras de GTPasas
<b>GEF</b>	Intercambiadores de nucleótidos de guanina
<b>HIF1-<math>\alpha</math></b>	Factor inducible por hipoxia1
<b>HO-1</b>	Hemo oxigenasa-1
<b>HSC</b>	Células estrelladas hepáticas
<b>LAP</b>	Péptido asociado de latencia
<b>LPA</b>	Ácido Lisofosfatídico
<b>LTBP</b>	Proteína de unión al TGF- $\beta$ latente
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1
<b>MFB</b>	Miofibroblastos
<b>MMPs</b>	Metaloproteasas
<b>N-AC</b>	N-acetil cisteína
<b>NADPH</b>	nicotinamida adenín dinucleótido fosfato
<b>Nox</b>	NADPH oxidasa
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear kappa-B
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Superoxido
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>RGS</b>	Reguladores de la señalización de proteínas G
<b>RhoGEF</b>	Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) para Rho
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>STA</b>	Estaurosporina

<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante- $\beta$
<b>TIMPs</b>	Inhibidores de metaloproteasas
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>TSP-1</b>	Trombospondina-1
<b>T<math>\beta</math>RI</b>	Receptor tipo I a TGF- $\beta$
<b>T<math>\beta</math>RII</b>	Receptor tipo II a TGF- $\beta$
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento de endotelio vascular

## RESUMEN

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) es una citocina que participa en la regulación de diversos procesos celulares como son la proliferación, adhesión, migración y diferenciación. En el presente trabajo se estudiaron los mecanismos moleculares de regulación y de acción de la citocina TGF- $\beta$  en dos procesos que se presentan durante la remodelación tisular. Primero el papel del TGF- $\beta$  como factor profibrogénico al ser regulado por angiotensina II (All) en las células estrelladas hepáticas (HSC) activadas, principales células que participan en el desarrollo de la fibrosis hepática; y segundo como inductor de la transición epitelio mesénquima (EMT), un proceso relevante tanto en fibrosis como en cáncer, evaluando principalmente nuevos efectores de los receptores para el TGF- $\beta$ .

En la primera parte, estudiamos los efectos de All en la modulación de la expresión de las isoformas del TGF- $\beta$  en HSC. En varios modelos animales se ha observado que en altas concentraciones, la All es capaz de provocar fibrosis hepática al regular a varias citocinas como el TGF- $\beta$ . Las HSC son células que se encargan de producir factores para la homeostasis del hígado, cuando existe un proceso inflamatorio, las HSC son activadas, y participan en el proceso fibrogénico produciendo componentes de matriz extracelular y citocinas proinflamatorias. Nuestros resultados muestran que en las HSC tanto quiescentes como activadas, la All es capaz de regular positivamente la transcripción de los genes que codifican a las isoformas 2 y 3 del TGF- $\beta$ . Es notable que la All también puede inducir la producción de TGF- $\beta$  activo en HSC activadas. La All en HSC activadas es capaz de señalar a través de diversas vías como PLC/ $\text{Ca}^{2+}$ /PKC, ERK y producir especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la NADPH oxidasa (Nox). Utilizando inhibidores de estas vías, observamos que el RNAm de las isoformas del TGF- $\beta$  es regulado positivamente a través de Nox y ERK, mientras que la liberación de la forma activa de TGF- $\beta$  es a través de la producción de ROS.

En la segunda parte de este trabajo, se evaluaron las acciones del TGF- $\beta$  sobre la inducción de la EMT en la línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano, A549. Estas células cuando son tratadas con TGF- $\beta$  por tiempos prolongados presentan varios marcadores de una EMT. El TGF- $\beta$  puede activar en estas células a las proteínas Smads y a vías alternas como ERK, Akt y a RhoA. Además, encontramos que utilizando dominantes negativas de RhoA se bloquean los cambios morfológicos inducidos por TGF- $\beta$  en A549. El mecanismo por el cual los receptores a TGF- $\beta$  activan a RhoA no se conoce, probablemente a través de intercambiadores de nucleótidos de guanina (RhoGEFs). Realizando una búsqueda en bases de datos para encontrar RhoGEFs candidatos regulados por la vía del TGF- $\beta$  encontramos a la proteína  $\text{G}\alpha_{13}$  y a los RhoGEFs con dominios RGS regulados por la familia  $\text{G}\alpha_{12/13}$  (p115, PDZ y LARG). Realizando transfecciones transitorias con  $\text{G}\alpha_{13}$  *wild-type* y QL (constitutivamente activa) y ensayos de co-inmunoprecipitación, encontramos que esta proteína puede interactuar con los receptores a TGF- $\beta$ , independientemente de la actividad de cinasa de su receptor tipo I. De hecho, esta interacción sucede de manera endógena en A549, donde RhoA es activada por TGF- $\beta$ . Transfectando los dominios RGS de p115, PDZ y LARG, para bloquear la activación de  $\text{G}\alpha_{13}$  y RhoA, encontramos que los Rho-GEFs PDZ y LARG participan en la activación de RhoA por TGF- $\beta$ .

## ABSTRACT

Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) is a multifunctional cytokine that controls several cellular processes such as differentiation, proliferation and migration. Particularly, TGF- $\beta$  is a key profibrogenic factor in fibrosis development, increasing synthesis and deposition of ECM components and retarding ECM degradation. In addition, TGF- $\beta$  has been identified as one of the most important factors that initiate and maintain epithelial-mesenchymal transition (EMT) process, where epithelial cells acquire morphological changes as a result of a genetic re-programming that enables them for cell movement and morphogenesis. Recently, EMT has been identified as a source to obtain fibroblasts in liver and kidney fibrosis. In this work, we decided to study the molecular mechanisms of action and regulation of TGF- $\beta$  during tissue remodelling. First, we studied how angiotensin II increases TGF- $\beta$  levels in hepatic stellate cells (HSCs). In the second part, we describe a new interaction between TGF- $\beta$  receptors and G $\alpha$ 13, important for RhoA signaling in an EMT model.

Angiotensin II (All) is a vasoactive peptide that plays an important role in the development of liver fibrosis by mainly regulating profibrotic cytokine expression such as TGF- $\beta$ . HSCs are the major cell type responsible for ECM deposition during liver fibrosis, and also are a target for All and TGF- $\beta$  actions. Here, we studied the effect of All on the mRNA levels of TGF- $\beta$  isoforms in primary cultures of rat HSCs. The mRNA levels of TGF- $\beta$ 2 and - $\beta$ 3 were increased after All treatment in activated HSCs. In addition, activated HSCs were able to produce active TGF- $\beta$  protein after All treatment. The mRNA expression of TGF- $\beta$  isoforms induced by All required both ERK1/2 and Nox activation but not PKC participation. Interestingly, All has a similar effect on TGF- $\beta$  expression in quiescent HSCs, although it has a smaller but significant effect on ERK1/2 activation in these cells.

TGF- $\beta$  signals through the type I and type II serine/threonine kinase receptors, members of activin receptor-like kinases (ALK) family. Activated type I receptor (T $\beta$ RI) is able to phosphorylate Smads proteins, which are the pivotal intracellular mediators in TGF- $\beta$  signaling. However, it has been described that the TGF- $\beta$  receptors (T $\beta$ Rs), activate non-Smad signalling pathways, like the small GTPases Ras and Rho. The guanine nucleotide exchanger factors (GEFs) promote exchange of bound GDP for GTP for Rho activation; GEFs proteins can be regulated via different mechanisms including TGF- $\beta$  signals. We used A549 cell line in order to study EMT process induced by TGF- $\beta$ ; we analyzed several markers of EMT as E-cadherin repression, snail upregulation, stress fibers formation and morphological changes. Also, we observed Smads, ERK1/2, Akt and Rho activation; notably, ERK1/2 and Rho activation induced by TGF- $\beta$  occurred independently of T $\beta$ RI kinase activity. Dominant-negative Rho blocked morphological changes in A549 cells produced for TGF- $\beta$ -treatment. In order to identify Rho-GEFs regulated by T $\beta$ Rs in response to TGF- $\beta$ , we used a bioinformatic approach, searching in the LUMIER and OPHID databases, we found G $\alpha$ 13 protein and RGS-RhoGEFS family (p115, PDZ y LARG). We found that G $\alpha$ 13 interacts with T $\beta$ Rs in AD293 (transiently transfected) and A549 (endogenous) cells. Additionally, PDZ- and LARG-RGS domains, but not p115-RGS domain, blocked Rho activation by TGF- $\beta$  in A549.

# INTRODUCCION

## 1. EL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE $\beta$ (TGF- $\beta$ )

El Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) es una citocina con múltiples efectos sobre las células, es capaz de controlar el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, la motilidad y la apoptosis. El TGF- $\beta$  regula también, la producción de sensores y moduladores celulares como proteínas de matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), citocinas y receptores. Todos estos procesos son esenciales en la morfogénesis y en la reparación tisular, así como en el mantenimiento general de la homeostasis del organismo (*Shi & Massagué, 2003; Herpin et al., 2004*). Si se llegan a presentar alteraciones en la regulación o en las acciones del TGF- $\beta$ , se desencadenan patologías como el cáncer, la fibrosis o incluso se ocasionan defectos en el desarrollo embrionario, lo que resalta la importancia de esta citocina.

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 de los tejidos. El TGF- $\beta$  controla la producción y la acumulación de proteínas de ECM, induciendo la expresión de éstas en células mesenquimatosas y epiteliales. Este factor, también modula la adhesión de las células a la ECM al regular la expresión de integrinas y moléculas de adhesión (*Border et al, 1995*), y además es un factor quimiotáctico y de proliferación para fibroblastos.

En el cáncer, el TGF- $\beta$  tiene un papel dual actuando como un supresor de tumores al inhibir la proliferación celular a través de la represión de la expresión de proteínas inhibidoras del ciclo celular y, al mismo tiempo, funciona como un factor pro-oncogénico debido a que es capaz de inducir una remodelación de la ECM para permitir la migración celular (*Shi & Massagué, 2003*); alterar la respuesta del sistema inmune para que las células cancerosas sobrevivan y muy significativamente, estimula la transformación celular o la transición de epitelio a mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés). Tanto en la reparación tisular como en el cáncer, las células epiteliales presentan esta transformación. Ocurre cuando las células epiteliales pueden ser convertidas reversible o irreversiblemente a células mesenquimatosas, adquiriendo así la capacidad de migrar a sitios específicos, lo cual es una de las características de este último fenotipo (*Hay, 2005*). De manera general, en el proceso de EMT se producen modificaciones importantes en el fenotipo celular, debido a cambios en la expresión epigenética que modifican los sistemas de adhesión célula-célula, y entre célula y matriz extracelular; además entre estos



cambios, se incluyen modificaciones en el citoesqueleto que permiten que la célula epitelial pierda su polaridad y adquiriera una capacidad migratoria (Hay, 2005; Weinberg, 2007).

### 1.1 LA SUPERFAMILIA DEL TGF- $\beta$

El TGF- $\beta$  es el miembro prototipo de una superfamilia de proteínas que comparten un arreglo estructural. 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 (tabla 1). 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).

Esta superfamilia de citocinas comparte una estructura característica central que se conoce como el nudo de cisteínas, que comprende tres puentes disulfuro intracadena. Otra cisteína forma un puente disulfuro (intercadena) con la cisteína correspondiente en el otro monómero. A partir de este arreglo, en cada monómero se extienden 4 láminas  $\beta$  y en dirección opuesta a estas, una  $\alpha$ -hélice. Dentro de la superfamilia del TGF- $\beta$  se encuentran la subfamilia de las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) y los factores de crecimiento y diferenciación (GDF), la subfamilia de las activinas/inhibinas y la subfamilia del TGF- $\beta$ , esta comprende las 5 isoformas del TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 presentes en mamíferos, TGF- $\beta$ 4 en pollo y TGF- $\beta$ 5 en *Xenopus* (Shi & Massagué, 2003; Herpin et al., 2004).

El dímero del TGF- $\beta$  es producido por casi todos los tipos celulares y es sintetizado como pro-proteínas homodímeras unidas por dos enlaces disulfuro (figura 1A). Cada monómero de la pro-proteína 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 & Massagué, 2003). Esta pro-proteína se pliega en el aparato de Golgi donde enzimas convertasas de proproteínas como la 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 del TGF- $\beta$  (LCC). Cuando el LCC es secretado permanece unido covalentemente a la matriz extracelular (figura 2) (López-Casillas, 1998; Annes et al., 2003). El TGF- $\beta$  se activa o libera cuando el LCC interacciona con proteasas, con integrinas como  $\alpha$ v $\beta$ 6 o con la trombospondina-1 (TSP-1); también puede ser activado por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y por la

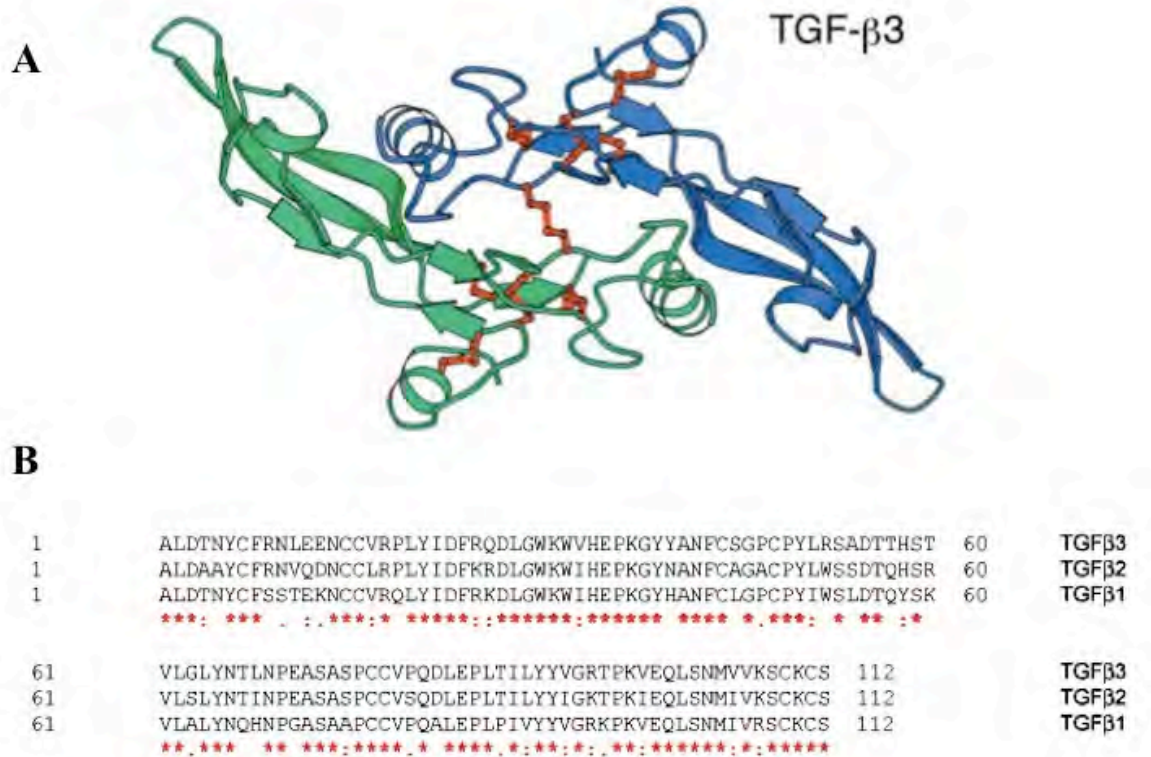
acidificación del medio, liberando así la forma madura y soluble del TGF- $\beta$  que puede unirse a sus receptores (Annes *et al.*, 2003).

**Tabla I.** Miembros de la Superfamilia del TGF- $\beta$  y sus principales funciones.

NOMBRE (HOMÓLOGO)	%	ACTIVIDADES REPRESENTATIVAS
<i>Subfamilia BMP2</i>		
BMP2 (Dpp <sup>D</sup> )	100	Gastrulación, neurogénesis, condroigénesis, apoptosis interdigital
BMP4	92	
<i>Subfamilia BMP5</i>		
BMP5 (60 A <sup>D</sup> )	61	Junto con BMP2 y BMP4 participa en el desarrollo de órganos y neurogénesis
BMP6/Vgr1	61	
BMP7/OP1	60	
BMP8/OP2	55	
<i>Subfamilia GDF5</i>		
GDF5/CDPM1	57	Condrogénesis en el desarrollo de extremidades
GDF6/CDM2	54	
GDF7	57	
<i>Subfamilia Vg1</i>		
GDF1(Vg1 <sup>X</sup> )	42	Inducción mesodérmica axial en ranas y peces
GDF3/Vgr2	53	
<i>Subfamilia BMP3</i>		
BMP3/osteogenina	48	Diferenciación osteogénica, formación de huesos y quimiotaxis de monocitos
GDF10	46	
<i>Miembros intermedios</i>		
Nodal (Xnr 1-3 <sup>X</sup> )	42	Inducción del mesodermo axial, regulación de la diferenciación celular en el tubo neural, inhibición del crecimiento del músculo esquelético
Dorsalina	40	
GDF8	41	
GDF9	34	
<i>Subfamilia Activina</i>		
Activina $\beta$ A- $\beta$ E	42	Producción de la hormona folículo estimulante (FSH), diferenciación celular eritroide
Inhibina $\beta$ A-B		
<i>Subfamilia TGF-<math>\beta</math></i>		
TGF- $\beta$ 1	35	Inhibición del crecimiento, apoptosis, diferenciación celular, inmunosupresión, homeostasis celular, producción de matriz extracelular
TGF- $\beta$ 2	34	
TGF- $\beta$ 3	36	
<i>Miembros divergentes</i>		
MIS/AMH	27	Regresión del tubo Mülleriano
Inhibina $\alpha$	22	Inhibición de las acciones de activina
GDNF	23	Desarrollo del riñón

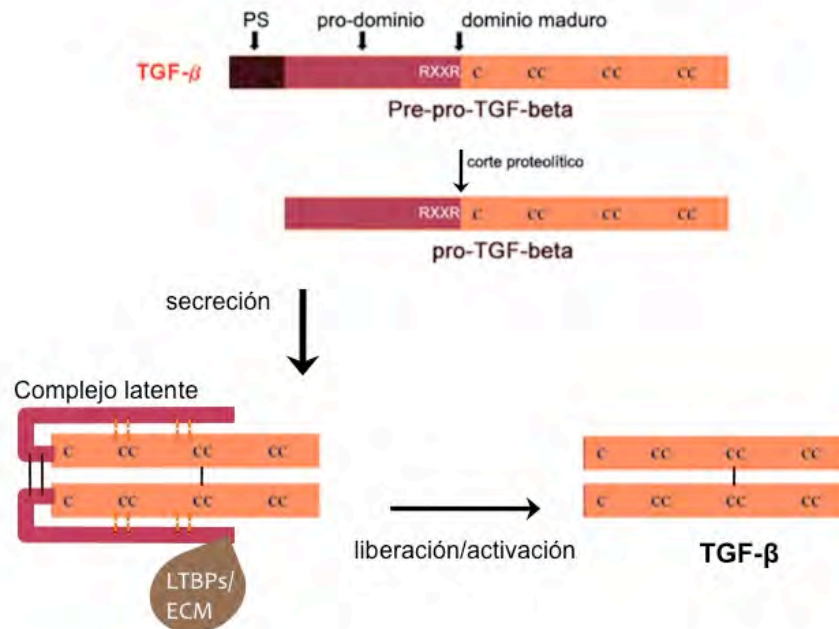
Los miembros listados han sido identificados en humano y ratón. Entre paréntesis se muestran los homólogos en *Drosophila* (<sup>D</sup>) y *Xenopus* (<sup>X</sup>). El porcentaje se refiere a la identidad de aminoácidos con respecto a BMP2. GDF, factor de diferenciación y crecimiento. CDMP, proteína morfogenética derivada del cartílago. MIS/AMH, sustancia

inhibidora de la hormona Mülleriana. GDNF, factor neurotrófico derivado de la célula glial. Tomado de Massagué, 1998.



**Figura 1. Estructura del TGF- $\beta$ .** A) Estructura representativa del TGF- $\beta$ 3, los dos monómeros están en color verde y azul, los residuos de cisteínas y los puentes disulfuro en rojo. B) Alineamiento de los residuos de aminoácidos de las 3 isoformas del TGF- $\beta$ , (\*) indica residuos idénticos, (:) sustitución conservada. Tomado de Shi & Massagué, 2003; Laverty *et al.*, 2009.

Las formas activas del TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 en mamíferos son moléculas dimericas de 25 kDa aproximadamente, cada una compuesta de monómeros idénticos (figura 1A). Entre la isoforma 1 y la 2 existe un 68% de identidad y 80% de similitud, entre la isoforma 1 y 3 hay un 76% de identidad y un 86% de similitud, mientras que las isoformas 2 y 3 tienen alrededor de un 79% de identidad y un 91% de similitud (figura 1B) (López-Casillas, 1998). Estas isoformas tienen propiedades semejantes *in vitro*, ya que inhiben la proliferación en muchos tipos celulares e inducen apoptosis en células epiteliales. Aunque en varios tejidos *in vivo*, por el contrario, las tres isoformas estimulan la proliferación de las células mesenquimatosas y la producción de componentes de matriz extracelular, induciendo una respuesta fibrótica (Howat *et al.*, 2002; Kinbara *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2003).



**Figura 2. Síntesis y activación del TGF-β.** El TGF-β es sintetizado como una pro-proteína precursora, después de la eliminación del péptido señal (PS) el precursor es cortado en el sitio RXXR por convertasas dentro de Golgi para liberar al factor maduro. El factor permanece asociado al pro-dominio o péptido asociado a latencia (LAP) por interacciones no covalentes formando un complejo latente, que puede unirse a proteínas de unión (LTBP) y a la matriz extracelular (ECM). Tomado de Herpin et al., 2004.

En el proceso de reparación tisular las isoformas del TGF-β pueden tener distintos efectos en las mismas células. El TGF-β1 puede ser un factor estimulador o inhibidor para la quimioatracción de monocitos, macrófagos, linfocitos, neutrófilos y fibroblastos, además estimula la liberación de citocinas de estas células. El TGF-β1 es un importante factor angiogénico y regulador de la matriz extracelular, además activa al promotor de su propio gen autorregulando positivamente su expresión, amplificando así sus efectos. En cambio, poco se sabe de las acciones de TGF-β2 y TGF-β3, aunque se conoce que ambos son importantes en la finalización o cierre del proceso de cicatrización, principalmente en la restitución de la neodermis y de la microvasculatura (*O'Kane et al., 1997*). El TGF-β2 participa en angiogénesis, y al igual que TGF-β1, induce la proliferación de fibroblastos y promueven el depósito excesivo de componentes de ECM. En cambio el TGF-β3 no tiene el mismo efecto proliferativo en fibroblastos, pero sí un efecto mayor que las otras dos isoformas en la inhibición de la síntesis de DNA en queratinocitos, disminuye el depósito de fibronectina, de las colágenas I y III, mejora la arquitectura de la neodermis y reduce la cicatrización (*O'Kane et al., 1997; Kinbara et al., 2002*).

Las diferentes isoformas del TGF-β participan en distintos aspectos de la EMT principalmente durante el desarrollo embrionario. Durante la formación de la cresta neural, las 3 isoformas del TGF-β y

las BMP2 y BMP4 influyen directamente en el destino de las células que forman la cresta. Estas proteínas se expresan cerca de la cresta premigratoria y de ésta surgirán los distintos tipos celulares que son esenciales para el desarrollo del corazón, el desarrollo craneofacial y en general la formación de los distintos órganos (*Dorsky et al., 2000*).

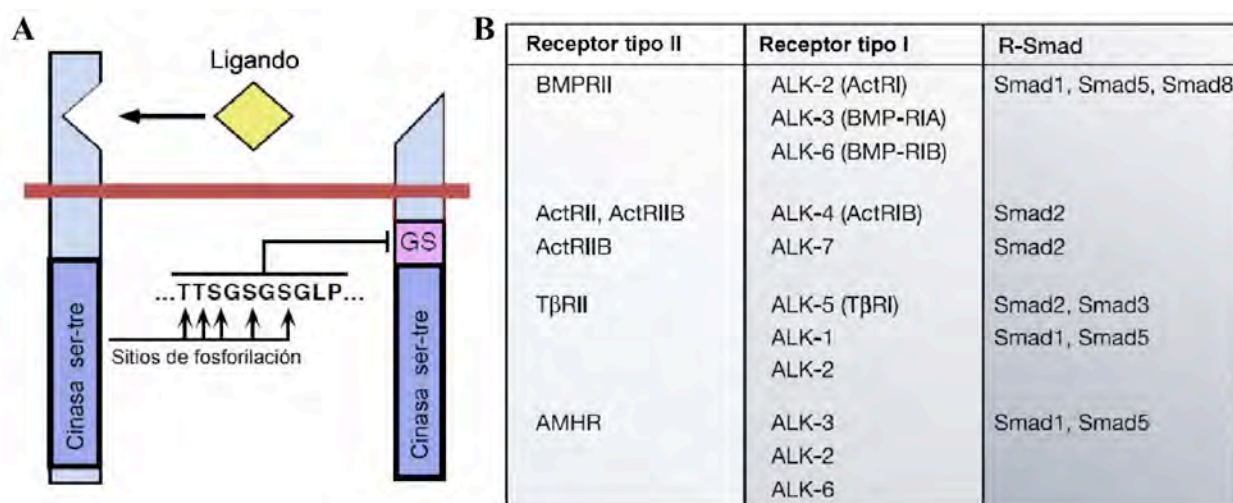
En un mismo sitio las tres isoformas pueden actuar de forma distinta; por ejemplo, las tres regulan la formación del paladar, el TGF- $\beta$ 1 y el TGF- $\beta$ 2 participan en el crecimiento celular, mientras el TGF- $\beta$ 3 regula la transformación del epitelio del límite medio a mesénquima, el cual se encargará de cerrar el paladar (*Nawshad et al., 2004*). En el desarrollo del tejido cardiaco, el TGF- $\beta$ 2 se encarga de la separación del endotelio y el TGF- $\beta$ 3 se expresa en el inicio de la cardiogénesis, principalmente en el endotelio que sufre una transformación endotelio-mesénquima (EndMT), un proceso similar a la EMT (*Boyer et al., 1999*).

## 1.2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL TGF- $\beta$

La señalización de los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  ocurre a través de dos tipos de receptores con actividad de cinasa de residuos de serinas y treoninas, los receptores tipo I y los receptores tipo II (figura 3A). En mamíferos, se han identificado 7 receptores tipo I y 5 receptores tipo II, que se unen diferencialmente a miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  (figura 3B). Los receptores para el TGF- $\beta$  son el T $\beta$ RI o ALK5 (receptor tipo I) y el T $\beta$ RII (receptor tipo II); ambos tipos de receptores son glicoproteínas, el tipo I con un peso aproximado de 55 kDa, y el tipo II de ~70 kDa. Estas proteínas contienen una región corta extracelular con un dominio de 9 cisteínas, una región transmembranal y una región citoplasmática que contiene un dominio de cinasa. Además, en el caso del T $\beta$ RII se presenta una cola citoplasmática en la región carboxilo terminal rica en serinas y treoninas (*Massagué et al., 1994*).

El receptor T $\beta$ RII está constitutivamente activo y presenta la mayor afinidad para unir al ligando. Este complejo ligando-receptor II propaga la señal hacia el interior celular formando heterocomplejos con el receptor T $\beta$ RI para activarlo. Después de la unión del ligando, el T $\beta$ RII fosforila al T $\beta$ RI en el dominio GS, constituido por aproximadamente 29 aminoácidos y con numerosos residuos de glicinas, serinas y treoninas (figura 3A). Esta fosforilación cambia la conformación del receptor T $\beta$ RI, activando su dominio de cinasa, y permitiéndole por tanto propagar la señal a través de la fosforilación de las proteínas Smad. El T $\beta$ RI contiene además, una región adyacente al dominio GS denominada el asa L45, que participa en la unión de las proteínas Smads, y que especifica la interacción selectiva entre las R-Smads y los distintos receptores tipo I (figura 3B) (*Massagué et al., 1994; de Caestecker, 2004*).

Las Smads son proteínas que constituyen la vía de señalización canónica activada por los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ . Las Smads reguladas por el receptor o R-Smads, comprenden a las Smad1, 2, 3, 5 y 8, las cuales son fosforiladas directa y específicamente por los receptores tipo I en las últimas dos serinas conservadas en el motivo SSXS de su extremo carboxilo (Mehra & Wrana, 2002; Shi & Massagué, 2003). Esta fosforilación permite la formación de complejos entre las R-Smad y la Smad común o Co-Smad, Smad4; estos complejos son translocados al núcleo donde se unen al DNA en secuencias específicas, y junto con coactivadores o co-represores determinan la respuesta celular inducida por el TGF- $\beta$  (figura 4) (Mehra & Wrana, 2002).



**Figura 3. Familia de receptores tipo I y tipo II de la superfamilia del TGF- $\beta$ .** A) Mecanismo de activación de los receptores a TGF- $\beta$ . Al unirse el ligando, el dominio de cinasa de residuos de serinas-treoninas del receptor tipo II fosforila al receptor tipo I en el dominio GS, permitiendo la activación de la cinasa de este receptor. B) Miembros de la familia de receptores tipo I y tipo II, se muestran las distintas combinaciones entre los tipos de receptores y las proteínas Smads que definen las respuestas en la señalización. Tomado de Massagué, 1998; Derynck & Zheng 2003.

Además de la activación de la vía canónica de las proteínas Smads, el TGF- $\beta$  activa a otras vías de señalización que ayudan a regular las acciones del TGF- $\beta$ . Dependiendo del contexto celular, el TGF- $\beta$  puede activar la vía de MAPK: ERKs, JNK y p38; GTPasas como Ras, RhoA, Rac y Cdc42, y la vía de PI3K y su efector Akt (figura 4) (Derynck et al., 2003; Moustakas & Heldin, 2005). Las proteínas G pequeñas o GTPasas monoméricas como Ras y la familia de Rho (RhoA, Cdc42 y Rac) son reguladas por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) y proteínas activadoras de GTPasas (GAPs). Los GEFs ayudan a las GTPasas a intercambiar el GDP que tienen unido en su estado inactivo por el GTP, para cambiar a su estado activo e iniciar la interacción con sus distintos efectores. Las GAPs estimulan la actividad de GTPasa de las proteínas G pequeñas, para hidrolizar el GTP unido y así volver

a su estado inactivo unido a GDP. En condiciones normales, la actividad de las GTPasas esta estrictamente regulada, y es dependiente del tipo celular y de la señalización específica del receptor. Además, el estado de activación de todas las GTPasas es dependiente del balance de actividad entre GEFs y GAPs que se encuentre en la célula. Existen diversos GEFs que pueden activar a Ras como Sos, Vav, Dbl, y Ras-GRF entre otros, dependiendo el tejido donde se expresen (*Quilliam et al., 2002*) y se han identificado hasta el momento alrededor de aproximadamente 70 GEFs, 60 GAPs y 3 GDIs para la familia de Rho (*Ellenbroeck et al., 2007*).

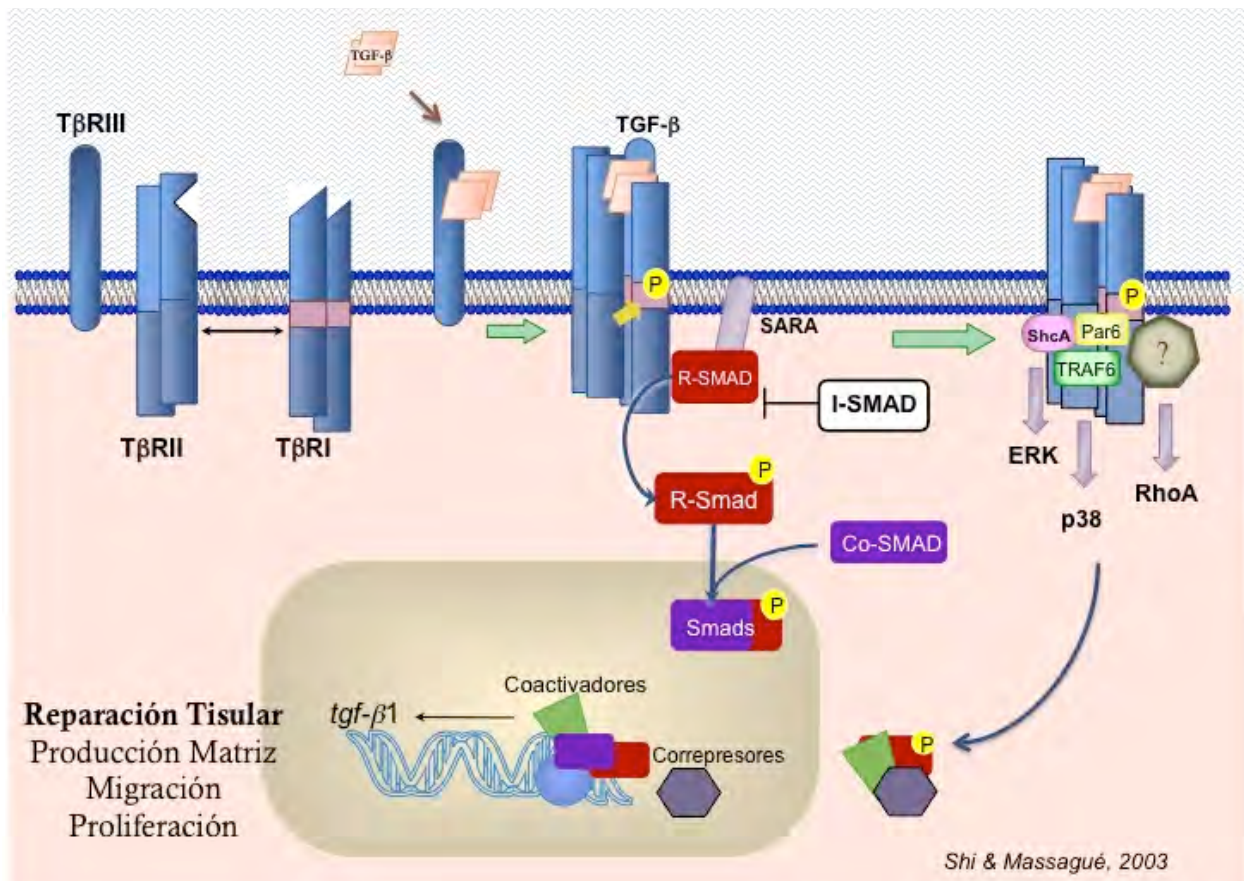
La activación de MAPK por el TGF- $\beta$  a través de Ras, puede participar en la regulación de la transcripción de genes, colaborando junto con las Smads. Esta habilidad del TGF- $\beta$  para activar ambas vías, tiene un papel importante en la transición de células epiteliales a células mesenquimatosas (*Lee et al., 2007; Derynck et al., 2003*). Existen varias evidencias sobre la cooperación entre la vía de Smads y las vías de MAPK para la producción de componentes de ECM e inducción de la EMT por TGF- $\beta$ , al regular factores de transcripción como AP-1. En células mesangiales, el promotor de la colágena tipo I requiere no solo la acción de las Smads sino también la señalización de Ras/ERK, y en fibroblastos de la dermis requiere la activación de p38. Sin embargo, en ambos tipos celulares el TGF- $\beta$  regula la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), a través de Smads y Ras/ERK. En otras acciones del TGF- $\beta$ , Smad2 y Ras cooperan para mediar la EMT, y la formación de metástasis en células epiteliales de glándula mamaria (Eph) (*Oft et al., 2002*). De hecho se considera como un prerrequisito la activación constitutiva de Ras para que ocurra la EMT de hepatocitos y de Eph (*Gotzmann et al., 2002; Janda et al., 2002*).

La familia de GTPasas de Rho intervienen en la organización del sistema de filamentos de actina importantes en la EMT para los procesos de migración e invasión: RhoA regula la formación de fibras de actina y miosina contráctiles (fibras de estrés), así como las adhesiones focales; Rac1 regula la formación de profusiones ricas en actina (lamelipodios) y también la ondulación de la membrana; por último Cdc42 regula la formación de filopodios. Estas 3 GTPasas, Rac, Rho y Cdc42 cooperan para regular los cambios en el citoesqueleto que se requieren para la migración celular (*Malliri et al., 2003*). El TGF- $\beta$  puede activar a esta familia de GTPasas dependiendo el contexto celular, por ejemplo en macrófagos el TGF- $\beta$  activa a RhoA y a Rac para permitir la migración de estas células. Otros reportes han demostrado que TGF- $\beta$  y RhoA conjuntamente permiten la transformación celular en células que atraviesan por una EMT, ya que al usar dominantes negativos de RhoA, el TGF- $\beta$  ya no puede inducir EMT (*Bhowmick et al., 2001*).



## 2. PARTICIPACIÓN DEL TGF- $\beta$ EN PROCESOS REGULADORES DE LA REMODELACIÓN TISULAR COMO LA FIBROSIS Y LA TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA.

La fibrosis es un padecimiento que comprende el depósito excesivo de componentes de matriz extracelular, ocasionando daños estructurales y funcionales del tejido afectado. Después de un daño o estrés se desencadena un evento inflamatorio, diversas células y factores solubles participan en la eliminación del daño que desencadenó la respuesta, pero ante la persistencia de éste, la inflamación sostenida provoca daños al tejido (*Bedossa et al., 2003*). Estos daños se resumen en la persistencia de la inflamación, la apoptosis y necrosis de células del tejido. Conjuntamente, existe un incremento importante en el depósito de tejido conectivo fibroso (principalmente colágena tipo I y fibronectina) debido a la activación de fibroblastos que proliferan y migran hacia el sitio de daño, estas células son las principales sintetizadoras de ECM (*Leask et al., 2004*); además de la inhibición de la degradación (fibrólisis) de ECM por metaloproteasas (MMPs) al sintetizarse varios inhibidores de estas enzimas (TIMPs).



**Figura 4. Vías de señalización del TGF- $\beta$ .** El TGF- $\beta$  es sintetizado como un complejo latente, que puede ser liberado por trombospondina-1 (TSP-1), integrinas, metaloproteasas (MMPs) o especies reactivas de oxígeno (ROS). Una vez liberada su forma activa, el TGF- $\beta$  puede entonces unirse a sus receptores (T $\beta$ Rs) activar a las



Smads y a vías alternas como ERK, p38 y RhoA, que ayudan a modular genes blancos del TGF- $\beta$  para regular la reparación tisular. Tomado de Shi & Massagué, 2003.

Si estos procesos persisten de manera constante pueden desencadenar la pérdida de la función del órgano afectado o incluso la muerte. El TGF- $\beta$  es uno de los principales factores que estimula la producción de componentes de la ECM y de inhibidores de la fibrólisis, causando una remodelación en la arquitectura del tejido afectado lo que puede llevar a la pérdida de su función (*Border et al, 1995*). De hecho, desde hace varios años se conoce la participación del TGF- $\beta$  en enfermedades crónicas como la glomerulonefritis, escleroderma, fibrosis idiopática pulmonar y cirrosis hepática entre muchas 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*).

El TGF- $\beta$  es la citocina central en la generación de miofibroblastos y el principal regulador de la remodelación de matriz extracelular. En un tejido normal, los fibroblastos son quiescentes, es decir se encuentran en fase G0 del ciclo celular y su principal función es el mantenimiento de la homeostasis de la ECM. En la fibrosis y en los mecanismos de reparación tisular, los fibroblastos se “activan” y se convierten en miofibroblastos (MFB) los cuales se caracterizan por un incremento en su proliferación, un aumento en la migración y la contracción celular, por la expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -sma), la síntesis de citocinas y principalmente por el aumento en la producción de ECM intersticial (*Guarino et al., 2009*). Entre las citocinas que secretan los MFB esta el TGF- $\beta$ , el cual regula su propia producción, perpetuando así el estado de activación de los MFB y la producción de ECM. Como se ha mencionado, el TGF- $\beta$  es uno de los más poderosos inductores de ECM, en la tabla I se resume la acción del TGF- $\beta$ 1 sobre estos genes (*Branton & Kopp et al., 1999; Guarino et al., 2009*).

El TGF- $\beta$ 1 ha sido la isoforma más estudiada en fibrosis, en cambio, poco se sabe de las acciones de las isoformas TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, ya que *in vitro* las 3 isoformas actúan de manera similar en la regulación de los genes de ECM (*Yu et al., 2003*). Las isoformas TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 se han estudiado más ampliamente en el contexto de reparación tisular dérmica, y ambas 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 ECM. En cambio el 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 queratinocitos, disminuye el depósito de fibronectina, y de las colágenas I y III, mejora la arquitectura de la neodermis y reduce la cicatrización (*Kinbara et al., 2002*).

## 2.1 FIBROSIS HEPÁTICA

La fibrosis hepática es un proceso activo de reparación tisular, que involucra la activación de células peri-sinusoidales especializadas que generan un amplio espectro de componentes de ECM, citocinas proinflamatorias, mediadores lipídicos, prostaglandinas y ROS. En la fibrosis hepática, tanto la cantidad como la composición de ECM se ve alterada: en estados avanzados el hígado fibrótico contiene 6 veces más ECM que un hígado normal, incluye el aumento de 8 veces en la colágena I, 4 veces en la colágena III, 14 veces en la colágena IV, fibronectina y elastina, entre otros (*Gressner & Weiskirchen, 2006*). El proceso de fibrogénesis en el hígado empieza por la destrucción del parénquima hepático (necrosis) debido a múltiples agentes y mecanismos nocivos, seguido por un proceso inflamatorio que activa a células peri-sinusoidales como las células de Kupffer (macrófagos) y las células estrelladas hepáticas (HSC).

**Tabla II.** Efectos del TGF- $\beta$ 1 sobre la expresión de los principales componentes de matriz extracelular.

Los efectos que se muestran son la acumulación de RNA mensajero, transcripción y síntesis de la proteína. Las flechas indican aumento o disminución, --- indican que no hay cambio, espacio en blanco indica que no hay reportes.

<i>PROTEÍNA DE MATRIZ</i>	<i>ACUMULACIÓN DE RNA MENSAJERO</i>	<i>TRANSCRIPCIÓN</i>	<i>SÍNTESIS</i>
<i>Colágena</i>			
I	↑	↑	↑
II	↑		↑
II	↑		↑
IV	↑	↑	↑
V	↑		↑
VII	↑		
XVI	↑		
<i>Membrana Basal</i>			
Laminina	↑	↑	↑
Entactina/nidogeno	↑		↑
Perlecano	↑	↑	↑
<i>Matriz intersticial</i>			
Fibronectina	↑	↑	↑
Osteopontina	↑↓	↑↓	
Thrombospondina	↑		
Tenascina	↑		↑
Osteonectina/SPARC	↑		↑
Elastina	↑	↑	↑
Biglicano	↑	---	↑
Decorina	↑	---	↓
Hyaluronano	NA	NA	↑↓

Tomado de Branton & Kopp (1999) *Microbes and Infection*, 1, 1349–1365.

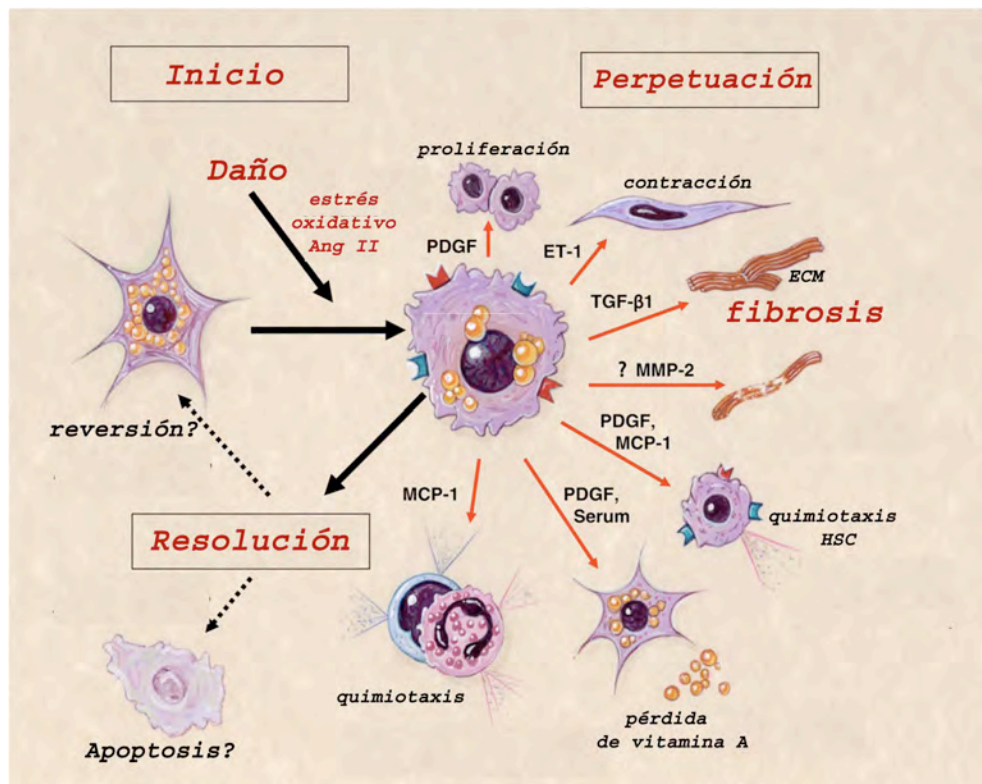
Las HSC son las principales células productoras de la ECM en el hígado, y estas células pueden pasar de un estado quiescente a un estado activado, gracias a distintos factores inflamatorios (*Blomhoff et al., 1991*). Las HSC se localizan en el espacio sinusoidal dentro de los lóbulos hepáticos, estas células se caracterizan principalmente por el almacenamiento de 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 almacenamiento y el metabolismo de retinoides, la síntesis de factores de crecimiento hepáticos y de citocinas, además de su papel en la regulación del flujo sanguíneo sinusoidal (figura 5) (*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 MFB (*Friedman et al., 2000*). En este proceso, las células pierden el retinol, y presentan varios cambios morfológicos, entre ellos, adquieren una forma elongada, expresan  $\alpha$ -sma, y otras características de los MFB ya mencionadas. Las HSC activadas también adquieren nuevas propiedades como la expresión *de novo* de distintos receptores que les permiten responder a distintos estímulos (figura 5) (*Friedman et al., 2000; Blomhoff et al., 1991*). Entre las citocinas que secretan se encuentra el TGF- $\beta$ , de hecho 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- $\beta$  lo que potencia sus efectos sobre la ECM (*Bedossa et al., 2003*).

Existen varios agentes identificados como factores de riesgo en el desarrollo de la fibrosis hepática como IL-13, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; de hecho, se han descrito varios mediadores solubles con actividad vasoactiva: sustancias vasodilatadoras como la relaxina tienen efectos antifibróticos, en cambio sustancias vasoconstrictoras como la norepinefrina, la endotelina-1 y la angiotensina II (AII) tienen efectos profibróticos. La AII tiene un efecto importante en la fibrosis hepática, induce la producción de citocinas inflamatorias en monocitos, permite la infiltración de células inflamatorias y, particularmente en las HSC induce la proliferación, la síntesis de citocinas proinflamatorias y de colágena además de otros componentes de ECM (*Bataller et al., 2005; Cheng et al., 2005*).

No sólo las HSC-MFB participan en el proceso de fibrosis, estudios recientes demuestran una población heterogénea de MFB que participan en el proceso de fibrosis hepática, situación que también ocurre en fibrosis pulmonar, fibrosis renal y el proceso de reparación en la piel. Así se ha propuesto la generación de MFB que se originan de diversas fuentes celulares: derivados de fibroblastos de espacios portales, de médula ósea (células madre mesenquimatosas y fibrocitos circulantes); además se han reportado MFB derivados de la EMT de hepatocitos y colangiocitos (epitelio del ducto biliar), pero que no expresan  $\alpha$ -sma (*Gressner et al., 2008; Parola et al., 2009*). En diversos estudios se ha estimado que cerca

del 68% de las HSC y 70% de MFB de hígados cirróticos de ratón, se originan de la médula ósea. Además, existe una subpoblación de leucocitos CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> capaces de sintetizar colágena tipo I, que además de los fibroцитos participan en procesos como el escleroderma, la fibrosis pulmonar y la fibrosis renal (Gressner et al., 2008).

Actualmente existe una hipótesis que puntualiza un importante mecanismo de amplificación del reservorio de MFB durante la fibrogénesis del tejido dañado (Kalluri & Weinberg, 2009). Esta hipótesis reside en la generación de fibroblastos o células mesenquimatosas a partir del epitelio existente, es decir, sufren una EMT. Este proceso es reconocido ampliamente en desarrollo embrionario y en cáncer (Hay, 2005).



**Figura 5. Modelo de activación de las Células Estrelladas Hepáticas (HSC).** Las HSC son las principales células productoras de citocinas proinflamatorias y de ECM cuando existe un evento inflamatorio en el hígado por algún daño. Las HSC son capaces de activarse o transdiferenciarse en MFB, en este fenotipo expresan una amplia variedad de receptores *de novo* que le permiten responder a una diversidad de estímulos (perpetuación). Cuando el daño es reparado se cree que estas las HSC vuelven a un estado quiescente o que sufren apoptosis. Tomado de Friedman SL, 2000.

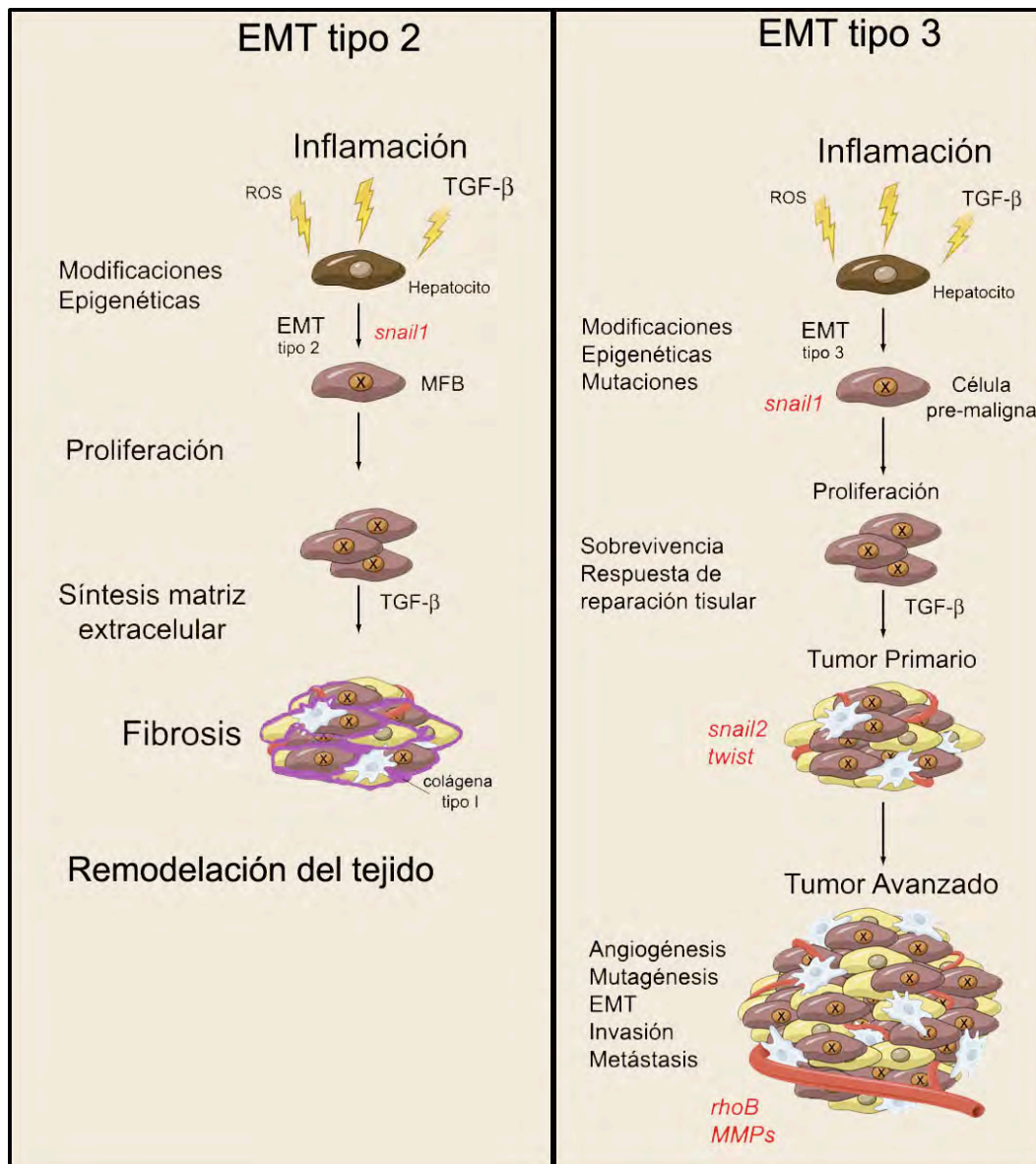
### 3. LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA (EMT) COMO ORIGEN DE MIOFIBROBLASTOS

La definición de EMT describe el complicado proceso por el cual las células epiteliales pierden sus características y adquieren un fenotipo mesenquimatoso (*Weinberg, 2007*). Existen dos tipos principales de tejido con base en su morfología y características funcionales: el tejido epitelial y el mesenquimatoso. El epitelio se compone de células unidas estrechamente una a la otra y adheridas también a la membrana basal, con una polaridad apical-basal; esto permite al epitelio funcionar como una barrera física y una superficie secretoria/absorbente. El tejido mesenquimatoso consiste de células poco organizadas, coexistiendo individualmente dentro de la ECM que ellas mismas producen y con una capacidad migratoria importante (*Alberts et al, 1994; Hay, 2005; Guarino et al., 2009*). El proceso de EMT es una teoría recientemente acuñada (*Kalluri & Weinberg, 2009*) que se ajusta a la inherente plasticidad del epitelio, ofreciendo nuevas perspectivas en el estudio de las funciones epiteliales dependiendo del ambiente y lo más importante, deja atrás el concepto de inmutabilidad o diferenciación terminal del epitelio (*Neilson, 2007*).

Existen tres tipos de EMT: el tipo 1 ocurre en el desarrollo embrionario donde el epitelio primario se transforma a células mesenquimatosas como parte del evento de gastrulación o en la migración de las células de la cresta neural; algunas de estas células generaran un epitelio secundario para formar los órganos de origen endodérmico o mesodérmico. En la EMT tipo 2, los epitelios secundarios o las células endoteliales se transforman a fibroblastos tisulares. En la reparación tisular, la EMT tipo 2 empieza como consecuencia de un evento inflamatorio donde las células epiteliales intentan reparar el daño al transformarse a células equivalentes a fibroblastos (figura 6); cuando la inflamación disminuye los fibroblastos derivados de la EMT sufren apoptosis y el proceso de reparación tisular termina. Sin embargo, cuando la inflamación es persistente, a través de una EMT surgen más fibroblastos que junto con las células del sistema inmune pueden dañar irreparablemente el órgano afectado (*Savagner, 2001; Zeisberg & Neilson, 2009*). Por último, en la EMT tipo 3, las células cancerosas epiteliales localizadas en los nódulos tumorales cambian a células metastásicas que migran por el torrente sanguíneo y forman nuevos nódulos tumorales distantes (figura 6) (*Zeisberg & Neilson, 2009*).

Existe evidencia *in vitro* e *in vivo* sobre la EMT tipo 2 en la fibrosis renal, la fibrosis pulmonar, en la reparación de la dermis y fibrosis hepática. En ésta última, se han realizado estudios con ratones transgénicos que expresan al menos dos marcadores para seguir la transición de hepatocitos a fibroblastos, la albúmina- $\beta$ gal y la proteína específica de fibroblastos-1 (FSP-1). Este estudio revela que cerca del 45%

de los fibroblastos positivos para FSP-1 derivaron de hepatocitos y aproximadamente se detectó un 60% de hepatocitos FSP-1<sup>+</sup> y albúmina<sup>+</sup>, lo que describe un estado “intermedio o parcial” de EMT tipo 2 (Zeisberg *et al.*, 2007). En hepatocitos en cultivo y en la línea celular de hepatocitos AML12, la adición de TGF- $\beta$  por 48-72 h provoca también cambios morfológicos, la expresión de colágena tipo I y del correpresor Snail, además de la disminución de la expresión de E-caderina, que son marcadores generales de la EMT (Kaimori *et al.*, 2007).



**Figura 6. Tipos de transición epitelio-mesénquima (EMT) en condiciones patológicas.** Bajo distintos estímulos, las células epiteliales pueden cambiar su fenotipo hacia miofibroblastos (MFB) o células malignas (cáncer). En una EMT tipo 2, la inflamación provoca que se liberen diversos factores, como el TGF- $\beta$ , que regulan genes como Snail provocando una modulación epigenética, originando células productoras de matriz extracelular. En una EMT tipo 3, estos mismos efectores provocan además mutaciones en el DNA formando células pre-malignas que forman tumores y metástasis. Tomado Grivennikov, *et al.*, 2010.

### 3.1 PRINCIPALES CAMBIOS CELULARES PRODUCIDOS DURANTE LA EMT

Al inicio del proceso de EMT, el epitelio polarizado y altamente organizado empieza a perder su polaridad por la remodelación de los contactos célula-célula y a perder los contactos del citoesqueleto con la membrana basal. La expresión tanto de la E-caderina (proteína de unión adherente) como de citoqueratinas específicas del epitelio se ve reprimida, y se expresan otro tipo de proteínas que ocasionan un fenotipo mesenquimatoso tales como la vimentina, un componente de los filamentos intermedios del citoesqueleto. Existen diversos correpresores que son regulados de manera positiva para reprimir la expresión de marcadores epiteliales. Entre los más estudiados se encuentra a Snail/Slug, que se unen directamente sobre el promotor de E-caderina reprimiendo su expresión en varias líneas celulares. Otros correpresores que participan en la EMT son la familia de  $\Delta$ EF, Twist y SIP1 (*Zavadil & Böttinger, 2005*)

La pérdida de la polaridad apical-basal en el epitelio conlleva a cambios en el citoesqueleto que le permiten a la célula separarse del resto del epitelio y empezar a migrar. Para esto, aparecen filopodios en la superficie basal de las células epiteliales que se extienden hacia la matriz intersticial, permitiendo que la célula se alargue y se desprenda del epitelio. La actina cortical en el epitelio se polimeriza en fibras de estrés, un sello característico de una célula migratoria; además, esta actina forma agregados que interactúan con los filamentos de miosina II, responsables de la contractibilidad de la célula (*Hay, 2005; Weinberg, 2007*). A pesar de que se reconocen tres tipos de EMT, es notable la similitud entre los procesos normales y los patológicos, lo que sugiere que comparten el mismo mecanismo: el programa intracelular altamente complejo de reorganización celular presentado depende de la reactivación de programas de comportamiento latentes por lo que las células que sufren EMT solamente tienen que activar el programa morfogénico ya codificado en el genoma. Con esta base, los eventos celulares patológicos y normales que producen una EMT pueden considerarse de un solo tipo (*Weinberg, 2007*). Los principales marcadores asociados a los diferentes tipos de EMT se resumen en la tabla III.

Las diversas señales extracelulares que desencadenan un proceso de EMT, provocan una reprogramación epigenética que involucra la expresión de cientos de genes involucrados en la polaridad celular y en la reorganización del citoesqueleto (*Thiery, 2003*). Existen diversas señales que inducen una EMT: Hedgehog, Wnt, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento tipo-insulina (IGF)-II, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-2, BMP-2 y el TGF- $\beta$ , este último es el principal promotor de EMT (*Thiery, 2003; Hay, 2005; Zavadil & Böttinger, 2005*). También los receptores acoplados a proteínas G pueden inducir una EMT, los receptores PAR activados por serina-proteinasas

como la Trombina o catepsina G pueden inducir un transformación tipo EMT en células epiteliales alveolares a través de vías como ERK y RhoA, lo que provoca una transformación y migración celular (Ando et al., 2007).

**Tabla III.** Principales marcadores de la EMT

<b>TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA</b>			
<i>Marcadores adquiridos</i>		<i>Marcadores atenuados</i>	
<b>Proteína</b>	<b>Tipo de EMT</b>	<b>Proteína</b>	<b>Tipo de EMT</b>
<b>SUPERFICIE CELULAR</b>			
N-caderina	1, 2	E-caderina	1, 2, 3
OB-caderina	3	ZO-1	1, 2, 3
Integrina $\alpha 5\beta 1$	1, 3		
Integrina $\alpha V\beta 6$	1, 3		
<b>CITOESQUELETO</b>			
FSP1	1, 2, 3	Citoqueratinas	1, 2, 3
$\alpha$ -SMA	2, 3		
Vimentina	1, 2		
$\beta$ -Catenina	1, 2, 3		
<b>MATRIZ EXTRACELULAR</b>			
Colágena $\alpha 1(I)$	1, 3	Colágena $\alpha 1(IV)$	1, 2, 3
Colágena $\alpha 1(III)$	1, 3	Laminina 1	1, 2, 3
Fibronectina	1, 2		
Laminina 5	1, 2		
<b>FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN</b>			
Snail1 (Snail)	1, 2, 3		
Snail2 (Slug)	1, 2, 3		
ZEB1	1, 2, 3		
Twist	1, 2, 3		
LEF-1	1, 2, 3		
Ets-1	1, 2, 3		

Tomado de Zeisberg & Neilson, 2009.

En el proceso de EMT patológica existen mecanismos comunes que llevan al desarrollo de EMT tipo 2 y 3 en un mismo proceso fisiopatológico. Desde hace varios años se sabe que existe una conexión entre la inflamación crónica y el cáncer, ya que en un ambiente inflamatorio crónico las distintas citocinas y factores de crecimiento que se liberan pueden regular factores de transcripción que favorecerían a una transformación epitelial a largo plazo (López-Novoa & Nieto, 2009). La continua producción de citocinas por distintas células involucradas en la inflamación es un mecanismo importante en la promoción o



formación de tumores, ya que provee una fuente continua de señales de supervivencia y crecimiento en un microambiente hostil inicial. Un microambiente inflamatorio puede incrementar las tasas de mutación y fallas en la reparación del DNA, además de acelerar la proliferación de células mutadas, un mecanismo adicional en la generación de células cancerosas es la EMT tipo 3. Por ejemplo, la alta cantidad de ROS, producidas por diversas células inmunes y MFB, puede causar un daño al DNA e inducir la expresión de factores de transcripción como Snail, este correpresor se une directamente al promotor de E-caderina bloqueando su expresión. Además, la alta producción de citocinas inflamatorias pueden activar factores que ayudan al desarrollo de tumores en células pre-malignas, como NF- $\kappa$ B, STAT-3 y AP-1; ya que controlan el crecimiento, proliferación y supervivencia celulares, así como la angiogénesis, invasión, motilidad y la producción de más citocinas (*Grivennikov et al., 2010*).

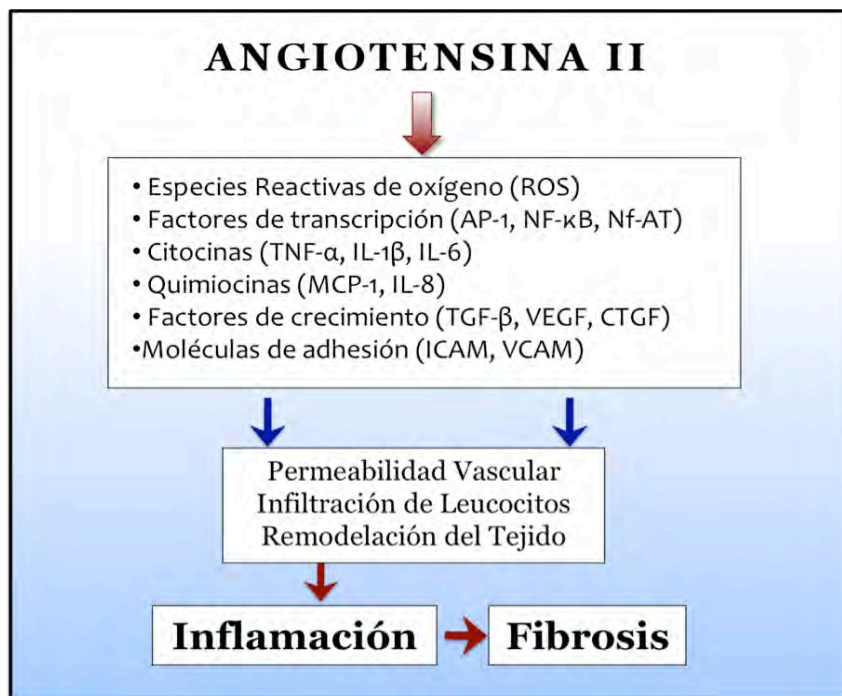
Como ejemplo, en un proceso inflamatorio ocasionado por una alta concentración de AII se sintetizarían diversas citocinas como el TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$ , principalmente; junto con el estrés oxidativo generado por ROS, se activarían factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y HIF1- $\alpha$  que ayudarían a su vez a regular a factores como Snail y Twist; todo esto deriva en una EMT que contribuiría no solo a la generación de MFB sino también a la transformación del epitelio a células cancerosas (*López-Novoa & Nieto, 2009*). Este escenario propuesto se ha comprobado en diversos estudios *in vivo* donde AII induce un proceso inflamatorio además de hipoxia en diversos órganos como el riñón y el hígado, regulando los factores ya mencionados.

#### **4. ANGIOTENSINA II Y EL PROCESO DE FIBROGÉNESIS HEPÁTICA**

El aumento en la concentración fisiológica de AII puede llevar a la hipertensión y aún más a procesos fibróticos cardiovasculares, renales y hepáticos (figura 7). La 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, que es continuamente sintetizado y liberado por el hígado. Los primeros 10 aminoácidos corresponden a la Angiotensina I (AngI), 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; cuando existe una disminución en la presión arterial renal se produce una contracción de las células que liberan renina, actuando como barorreceptores 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 AngI. Ésta es rápidamente convertida en AII por la

enzima convertidora de angiotensina (ACE) principalmente dentro de la circulación pulmonar, por la remoción de dos aminoácidos. La ACE se localiza principalmente en células endoteliales y es blanco de varios inhibidores farmacológicos para disminuir la tasa de producción de AII (*Dinh et al., 2001*).

Como se mencionó anteriormente, la AII es un factor que puede desencadenar un proceso inflamatorio (figura 7) (*Cheng et al., 2005; Bataller et al., 2003a*). La AII incrementa la infiltración de leucocitos a través de la pared vascular al regular a las moléculas de adhesión en el endotelio; además, AII induce la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias directamente en monocitos (*Cheng et al., 2005*). Entre los mediadores de los efectos profibróticos de AII están la proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1), el factor de crecimiento de epitelio vascular (VEGF), el CTGF y el TGF- $\beta$  (*Mezzano et al., 2001*). En modelos de fibrosis en corazón, riñón e hígado, se ha descrito que el aumento en la expresión de TGF- $\beta$  esta 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*). La AII activa varios factores de transcripción involucrados en la hipertrofia y en la inflamación, como por ejemplo AP-1 (*c-jun* y *c-fos*), *egr-1* y el 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 ECM.



**Figura 7. Participación de Angiotensina II en la respuesta inflamatoria.** La angiotensina II modula la expresión de varios agentes que desencadenan un proceso inflamatorio, entre ellos citocinas, moléculas de adhesión

y quimiocinas que aumentan la permeabilidad vascular y la infiltración de leucocitos. Un proceso inflamatorio crónico puede llevar a la fibrosis del tejido. Tomado de Cheng et al., 2005.

Estos efectos proinflamatorios de la AII son mediados principalmente a través del receptor AT1 acoplado a proteínas Gαq (Cheng et al., 2005). Entre las principales vías de señalización que activa este receptor se encuentra el sistema fosfoinosítidos (PI)/Ca<sup>2+</sup>, y la vía de MAPK como ERK, p38 y JNK, así como la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) a través de la acción de cinasas de tirosina sensibles a Ca<sup>2+</sup>, Pyk2 y Src que fosforilan al receptor directamente o por la liberación de EGF a través de MMPs (Cheng et al., 2005). Conjuntamente, AII induce la producción de ROS a través de la enzima nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (Nox) (Dinh et al., 2001).

Las ROS son moléculas derivadas del oxígeno reducidas a varios niveles, incluyendo radicales de oxígeno (O<sub>2</sub>•), hidroxilo (•OH) y peroxilo (RO<sub>2</sub>•), entre otras moléculas no radicales que pueden ser agentes oxidantes o que son fácilmente convertidas en radicales como el ozono (O<sub>3</sub>) y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Las ROS pueden ser moléculas muy nocivas al alterar o destruir la función de otras moléculas como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos; a las cuales se unen ávidamente provocando daños celulares (Bedard et al., 2007). Aunque algunas ROS, especialmente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pueden considerarse como moléculas de señalización (Hancock et al., 2001). La señalización por ROS puede regular las acciones de varias citocinas como el TNF-α y el TGF-β, y directamente a factores de transcripción como AP-1, el NF-κB y p53 (Bedard et al., 2007).

La NOX es la principal enzima generadora de ROS, y está conformada por varias subunidades que se encuentran tanto en la membrana como en el citoplasma. La activación de la Nox requiere el ensamblaje de los componentes citosólicos al complejo NOX2/p22<sup>phox</sup>, la fosforilación de p47<sup>phox</sup> (la subunidad organizadora), permite su interacción con p22<sup>phox</sup>, ya localizada en la membrana p47<sup>phox</sup> trae consigo a la subunidad activadora p67<sup>phox</sup> para que entre en contacto con NOX2. Por último, p40<sup>phox</sup> se une al complejo permitiendo que Rac interactúe con NOX2 y después con p67<sup>phox</sup>. Una vez ensamblado el complejo, la enzima está activa y genera superóxido, transfiriendo un electrón del NADPH del citosol al oxígeno del espacio extracelular (Hancock et al., 2001; Bedard et al., 2007). Generalmente, las enzimas Nox que se encuentran en células que participan en procesos inflamatorios y fibrogénicos como los fibroblastos, están constitutivamente activas produciendo bajos niveles de ROS bajo condiciones basales; mientras que en respuesta a diversas citocinas estos niveles aumentan considerablemente activando diversas señales sensibles al estado redox (Hancock et al., 2001).

En el hígado, todas las células del tejido pueden generar ROS, particularmente, las HSC expresan

los componentes de la Nox como p47<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, NOX1 y NOX2 (*Hancock et al., 2001*). Por lo que se estima que la Nox participa en la proliferación celular y en la producción de colágena por las HSC; sugiriendo además que tiene un papel importante en la fibrosis hepática. Por ejemplo, en modelos de fibrosis experimental inducida por AII en ratones, la eliminación de la subunidad p47<sup>phox</sup> atenúa marcadamente la fibrosis hepática (*Bataller et al., 2003b*).

## II. ANTECEDENTES

Los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  son citocinas que regulan el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celulares. El TGF- $\beta$  es un factor importante en procesos fisiológicos como la reparación tisular y el desarrollo embrionario. La regulación positiva o negativa de este factor determina su papel como factor homeostático o como promotor de patologías, por ejemplo en altas concentraciones este factor desencadena la fibrosis de distintos órganos al modular la acumulación de ECM. Por otro lado, la falta de TGF- $\beta$  puede favorecer la formación de tumores debido a la ausencia de los efectos citostáticos de este factor, o incluso causar defectos en el desarrollo embrionario como por ejemplo en la formación del paladar

En el hígado, cuando existe algún daño, se activan mecanismos proinflamatorios que permiten la reparación de dicho daño. Uno los factores que participan es el TGF- $\beta$ , que es capaz de regular en fibroblastos la proliferación celular y la producción de ECM. En varios modelos animales se ha observado que en altas concentraciones, la AII es capaz de provocar inflamación y en casos severos, fibrosis; actualmente se le reconoce como un factor principal en el desarrollo de fibrosis hepática ya que contribuye al incremento en la síntesis y depósito de ECM, al estrés oxidativo y a la producción de varias citocinas como el TGF- $\beta$ 1 (*Warner et al., 2007*). En el suero de pacientes con cirrosis y hepatitis C crónica, la AII se encuentra en niveles altos (*Bosch et al., 1980*). De hecho, la utilización de inhibidores de su producción o bloqueadores de sus receptores disminuyen la inflamación crónica y la fibrosis en el hígado (*Yoshiji et al., 2001; Bataller et al., 2003a; Ueki et al., 2006*).

La fibrosis puede revertirse modulando los componentes que llevan a su formación. En la fibrosis hepática, es necesario además el retiro de los agentes causantes del daño. Entre los principales blancos terapéuticos en esta patología 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 ECM (*Bedossa et al., 2003; Lotersztajn et al., 2004*). Desde hace varios años se ha reportado que en modelos fibróticos en animales, la utilización de antagonistas del receptor tipo

I de la AII (AT1) como losartan, candesartan y olmesartan disminuye la fibrosis ya que causan la inhibición de la síntesis de colágena, 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 y 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 también reducen de manera importante la fibrosis (Yingling *et al.*, 2004).

En los últimos años, se ha observado que al menos 2 tipos celulares hepáticos pueden sufrir una EMT en cultivo: hepatocitos y colangiocitos. Varios grupos han demostrado que el tratamiento de hepatocitos en cultivo con TGF- $\beta$  causa que se reprima la expresión de genes epiteliales como albúmina y se regulen positivamente genes como  $\alpha$ -sma y colágena tipo I, además de inducir un fenotipo invasivo (Kaimori *et al.*, 2007; Zeisberg *et al.*, 2007). Sin embargo, existe poca evidencia del proceso de EMT inducido por el TGF- $\beta$  *in vivo*, en varios modelos de fibrosis. Las principales acciones de TGF- $\beta$  en diversos modelos de EMT son mediados a través de las proteínas Smads, aunque existe evidencia de que el TGF- $\beta$  puede activar vías de transducción alternas como MAPK y RhoA. Aún no se conoce como puedan estar interconectados los complejos de receptores del TGF- $\beta$  y los módulos de señalización de las otras vías (MAPKs, PI3K-Akt, RhoA); además, se desconoce con detalle como estas vías contribuyen a las respuestas inducidas por el TGF- $\beta$ . En el proceso fibrótico, la activación de MAPK contribuye a la regulación de varios componentes de ECM; en cambio en la EMT, los efectos principales del TGF- $\beta$  en la reprogramación epigenética ocurren vía las Smads, pero también sus acciones dependen de la participación, aún no detallada, de otras vías como por ejemplo Ras-Erk, RhoA y PI3K-Akt (Han *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007).

La activación de vías alternas por el TGF- $\beta$  y su contribución a los efectos de esta citocina no están completamente descrito y se siguen estudiando, Ozdamar y col., demostraron que Par6 es un nuevo sustrato para el receptor T $\beta$ R2, y además que esta proteína participa en el desensamble de las uniones estrechas, al servir como adaptadora entre los receptores y la maquinaria que lleva al desensamble de las uniones estrechas epiteliales en el proceso de la EMT. Es posible por lo tanto, que los receptores para el TGF- $\beta$  interactúen con otras moléculas que participen en la activación de vías alternas independientes

de las Smads (*Ozdamar et al., 2005*). En este mismo rubro, Bhowmick y col., encontraron que el TGF- $\beta$  podía activar a RhoA y su efector ROCK con una cinética rápida a los 5 min, y que además esta vía era esencial para la EMT inducida por TGF- $\beta$  en NMuMG (*Bhowmick et al., 2001*). Es posible que los receptores se asocien con algún Rho-GEF, que son componentes esenciales en la regulación de GTPasas.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Considerando la relevancia que tiene la citocina TGF- $\beta$  en los diversos procesos que se presentan en la reparación tisular como son la proliferación y la transformación celular, la síntesis de ECM, citocinas, quimiocinas, entre otros; nos propusimos estudiar: 1) los mecanismos proinflamatorios que llevan a la producción de TGF- $\beta$  en el hígado y 2) las vías alternas de señalización que participan junto con las Smads, en la transformación epitelial (EMT).

## **III. HIPÓTESIS**

*En la reparación tisular, un agente proinflamatorio como la Angiotensina II, regulará la expresión de las isoformas del TGF- $\beta$  en las células que contribuyen al proceso fibrótico (las HSCs), y el TGF- $\beta$  contribuirá en la transición epitelio mesénquima al activar a Smads y a vías alternas como RhoA a través de nuevos efectores.*

## **IV. OBJETIVOS**

### ***OBJETIVO GENERAL***

Estudiar algunos de los mecanismos moleculares de regulación y de acción del TGF- $\beta$  implicados en procesos relevantes en la remodelación tisular como son: el papel de la Angiotensina II en la regulación de la expresión de las isoformas del TGF- $\beta$  en las células profibrogénicas HSC, así como la identificación de nuevos efectores de la vía del TGF- $\beta$  en células que sufren una EMT.

### ***OBJETIVOS PARTICULARES***

1. Estudiar si la Angiotensina II modula positivamente las isoformas del TGF- $\beta$  en células estrelladas hepáticas de rata
2. Identificar nuevos efectores de señalización de TGF- $\beta$  para la activación de RhoA en células que pasan por un proceso de transición epitelio-mesénquima.

### ***OBJETIVOS ESPECÍFICOS***

- 1.1. Determinar si la angiotensina II modula la producción del RNA mensajero de las isoformas 1, 2 y 3 del TGF- $\beta$  así como la producción de la proteína TGF- $\beta$  activa en las células estrelladas hepáticas de rata (HSC).
- 1.2. Determinar que vías de transducción utiliza la angiotensina II para regular los niveles de expresión del RNA mensajero de las isoformas del TGF- $\beta$  en HSC.
  - 2.1. Estudiar la activación y la importancia de RhoA en la transición epitelio mesénquima (EMT) inducida por el TGF- $\beta$  en células A549.
  - 2.2. Estudiar la asociación y la activación de G $\alpha$ 13 por los receptores a TGF- $\beta$ , en células A549 durante la EMT.
  - 2.3. Identificar si los intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) p115, LARG y PDZ Rho-GEFs están implicados en la activación de RhoA por TGF- $\beta$  y G $\alpha$ 13, en células A549 durante la EMT.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. *Cultivos primarios de Células Estrelladas Hepáticas*

Las células estrelladas hepáticas (HSC) se obtuvieron de ratas macho Wistar con más de 500 g de peso. El hígado de la rata se perfundió con solución Krebs-Ringer (NaCl 120 mM, KCl 4.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24 mM) con un pH 7.34 a 37 °C por 15 min y después durante 10 min con solución Krebs-Ringer con calcio (CaCl<sub>2</sub> 1.27 mM). Se continuó la perfusión con 140 mg de Pronasa (Roche) o Proteasa (Sigma) por 20 min y después con 3.5 mg de colagenasa tipo IV (Worthington) por 10 min. El hígado digerido se cortó hasta macerarlo y se incubó con solución Krebs-Ringer más DNasa I (Roche) 20 µg/ml a 37 °C, por 15 min en agitación. El hígado homogenizado se filtro por una malla, la solución que resulta contiene las células hepáticas que se centrifugan por 1 min a 55 × g, realizándose tres lavados más para separar a los hepatocitos. A continuación, el sobrenadante recuperado en los lavados se centrifugó por 10 min a 704 × g, a 10 °C, para obtener una fracción de células no parenquimatosas. Para aislar a las HSC a partir de este punto, se utilizó un gradiente de Nycodenz (Axis-Shield PoC AS) al 8.2% en un volumen de 12 ml, debido a que las HSC guardan ésteres de retinol (vitamina A) y son menos densas que las otras células hepáticas, este gradiente fue centrifugado a 57831 × g, por 35 min en una ultracentrífuga XL-100K (Beckman Coulter) y usando el rotor SW40Ti.

La fracción obtenida de las HSC se lavó con PBS por centrifugación a 595 × g por 7 min, y después las células se resuspendieron en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) complementado con 10% de suero fetal de bovino (FBS), 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 × 10<sup>6</sup> células en cajas Petri de poliestireno de 100 mm de diámetro.

Las HSC se cultivaron por 2 días para mantener su estado quiescente, o por 7 y 13 días para obtener un fenotipo de células activadas tipo miofibroblasto (MFB). Estas células, según el protocolo, se trataron con AII (Sigma), el antagonista de AT1 (Losartan), el antagonista de AT2 (PD123177), o bien con inhibidores de p38 (SB202190; Sigma), MEK1/2 (U0126; Sigma), JNK (SP600125; Sigma), PKC (estaurosporina y bisindolilmaleimida; Tocris), de la NADPH oxidasa (difenileneiodonio [DPI], Tocris; apocinina [APO], Sigma), o con un antioxidante la N-acetil cisteína (NAC; Sigma). Los antagonistas de los receptores de AII (AT1 y AT2) fueron amablemente donados por el Dr. J. Adolfo García-Sáinz (IFC, UNAM).



## **2. Líneas Celulares**

Para este trabajo utilizamos las líneas celulares de epitelio pulmonar de visón Mv1Lu y la clona L17 derivada de Mv1Lu que carece del receptor tipo I a TGF- $\beta$ , la línea A549 que son células transformadas provenientes de un adenocarcinoma de pulmón humano, las células AD293 de epitelio de riñón humano. Las células Mv1Lu y L17 se cultivaron en medio MEM, la línea AD293 se cultivó en medio DMEM, y las células A549 en medio Ham's F12, todos los medios con suero fetal de bovino (SFB) al 10%, y en presencia de penicilina y estreptomicina (100U/ml).

## **3. Immunoblots**

Los cultivos celulares se colocaron en ayuno en un medio con FBS al 0.2% o sin suero por lo menos 12 h antes de ser tratadas con los diferentes agonistas, antagonistas o inhibidores. Después, se lavaron con PBS frío y lisadas con TNTE (Tritón-X100 0.5%, Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM) con inhibidores de proteasas (PMSF 1  $\mu$ M, inhibidor de tripsina, pepstatina A, leupeptina, antipaina, benzamidina y aprotinina 0.1  $\mu$ g/ml cada una) e inhibidores de fosfatasas (NaF 25  $\mu$ M, pirofosfato de sodio (NaPPi) 1  $\mu$ M,  $\beta$ -glicerofosfato y NaVO<sub>4</sub> 1 $\mu$ M), obteniendo así las proteínas totales. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS (10% ó 7.5%) y transferidas a una membrana de polivinilideno fluoruro (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 h a temperatura ambiente (TA), después se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios contra las formas fosforiladas o totales de cada una de las proteínas a analizar (ERK1/2, Akt, RhoA, HO-1, G $\alpha$ 13, T $\beta$ R11); en una dilución 1:1000 o 1:10000 en TBS-T. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (anti-conejo o anti-ratón) por 1 h a temperatura ambiente en una dilución 1:10000 en TBS-T. La visualización de los complejos se llevo a cabo mediante quimioluminiscencia, adicionando el sustrato de la peroxidasa (ECL, Amersham Biosciences) y por autorradiografía.

## **4. Inmunoprecipitación**

Después de obtener los extractos de proteína, estos se cuantificaron por el método de Bradford y se colocó la misma cantidad de proteína de cada condición en microtubos. Para la co-inmunoprecipitación de los receptores de TGF- $\beta$  y la proteína G $\alpha$ 13 se utilizó el siguientes buffer de lisis e inmunoprecipitación: Tritón X-100 al 1 %, NaCl 10 mM, DTT 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM. En la inmunoprecipitación, se colocaron 3  $\mu$ l de anticuerpo específico para las proteínas blanco (Smad2/3 o

T $\beta$ RII). Los extractos se dejaron incubando en agitación continua toda la noche a 4°C. Para precipitar los complejos anticuerpo-proteína blanco, se incubaron las muestras con 60  $\mu$ l de proteína G agarosa (diluida 1:5) en agitación continua por 2 h a 4°C. Las muestras se centrifugaron y los pellets se lavaron 3 veces con buffer TNTE 0.1%. Después, se resuspendieron en 30  $\mu$ l de solución Laemmli 2x. Las muestras se corrieron en un gel al 10% o 7.5% de poliacrilamida-SDS.

## **5. *Inmunofluorescencia***

Las células A549 se cultivaron sobre cubreobjetos cubiertos con fibronectina, en medio F12 con FBS al 10%. Después se trataron con TGF- $\beta$  0.2 nM por 48 h en medio sin suero. Pasado este tiempo, las células se lavaron con PBS 1x y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 20 min. Las células fijadas se permeabilizaron con una solución de Triton X-100 al 1% por 20 min más. Después, se bloqueó con una solución de BSA 1% por 30 min y las células se incubaron con el anticuerpo Alexa fluor 594 phalloidin (Molecular Probes) para teñir el citoesqueleto y detectar fibras de estrés, por 1 h a TA. Los núcleos se tiñieron con 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) 0.1 $\mu$ g/ml por 1min. Los cubreobjetos con las células se montaron en portaobjetos, se dejaron 24 h a 4°C y después las preparaciones se examinaron en un microscopio de fluorescencia.

## **6. *Ensayo de Activación de RhoA***

Para evaluar la activación de la GTPasa Rho por TGF- $\beta$  se realizaron ensayos de pull-down usando una proteína de fusión GST-RBD, el dominio RBD pertenece a Rhotekina (una proteína efectora de RhoA) que se une específicamente a RhoA-GTP (la forma activa). Las células A549 se trataron con la citocina a distintos tiempos e inmediatamente después lisadas en 1ml del siguiente buffer: 50 mM Tris [pH 7.5], 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, Tritón X-100 al 1%; mas los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF 1 $\mu$ M, leupeptina 10  $\mu$ g/ml y aprotinina 10  $\mu$ g/ml. De los extractos, se separaron 75  $\mu$ l para detectar la proteína total, y el resto para detectar a RhoA-GTP al incubarse con 50  $\mu$ l de esferas GST-RBD por 45 min. Los precipitados se lavaron con el mismo buffer de lisis (1 ml) en tres ocasiones al centrifugarse 1,957  $\times$  g por 2min, y al final se resuspendieron en buffer de carga (Laemli 2X). Las muestras se separaron en geles de poliacrilamida al 15% y transferidas a membranas de PDVF para detectar a RhoA por inmunoblot.

## **7. Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Para medir la producción de ROS por AII se utilizó el reactivo fluorescente Dihidroetidio (DHE), un marcador de la producción del anión superóxido  $O_2^{\cdot-}$ . El DHE difunde a la células y al entrar en contacto con  $O_2^{\cdot-}$  se oxida produciendo etidio (Et) y 2-hidroxietidio (2-OH-Et) en el citosol, ambos productos emiten un rojo fluorescente brillante a una longitud de 560 nm (Zhao *et al.*, 2005; Hernández-Fonseca, *et al.* 2008).

Las HSC de 7 días se cultivaron en cajas Petri de 12 pozos (mm) y tratadas con AII  $1\mu M$  por distintos periodos de tiempo: 5, 15, 30, 60 y 90 min. En otra serie de experimentos, las HSC se pretrataron con DPI  $1\mu M$ , apocinina  $10\mu M$  y NAC  $5mM$  por separado por 30min, después se incubaron con AII  $1\mu M$  por 30 min. Pasado el tiempo correspondiente, se incubó el DHE por 20 min en buffer Krebs-Ringer. Las células se examinaron en un microscopio de epifluorescencia (Excitación/Emisión 510-560 nm), la intensidad de la fluorescencia del etidio se midió en 5 campos distintos por pozo y por condición en 3 experimentos independientes usando NIS Elements Imaging Software (Nikon Co. Japan). La fluorescencia en la condición control fue normalizada a 1 unidad y los cambios en la fluorescencia se expresa como veces de incremento con respecto al control.

## **8. Aislamiento de RNA y Ensayo de protección de la RNasa I (RPA)**

Para conocer si la producción del RNA mensajero (RNAm) de las isoformas del TGF- $\beta$  en las HSC era inducido por la AII, HSC de 2 ó 7 días de cultivo se pretrataron con cicloheximida  $20\mu g/ml$  (CHX, un inhibidor de la síntesis de proteínas) y luego tratadas a diferentes tiempos con AII  $1\mu M$  por 30 min, 1, 2, 3, 6 ó 24 hrs, además de un pretratamiento en la ausencia o presencia de los siguientes antagonistas o 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  $20\mu g/ml$  de RNA total por caja, que fue resuspendido en agua destilada tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

El RNA purificado se analizó por RPA (BD Biosciences, RiboQuant<sup>TM</sup>), mediante hibridación con una sonda marcada radiactivamente con  $^{33}P$ . La sonda para el RNAm de las isoformas 1, 2 y 3 del TGF- $\beta$  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  $^{33}P$ , por 1 h a  $37^\circ C$ , parando la reacción con DNasa. La sonda se separó con 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 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 una 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 adicionaron 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 × g, se retiró 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 secó sobre un papel filtro y el RNAm que hibridó con la sonda marcada se detecta mediante una placa de rayos X a -70 °C.

## **9. RT-PCR**

El RNA total de células A549 se purificó por el método de Trizol (invitrogen). Usando la enzima MMLV-RT, 2 µg del RNA total se transcribió a cDNA, seguido por la amplificación de los genes blanco por PCR. Para Snail se utilizaron los siguientes oligos: 5'-CACATCCTTCTCACTGCCATG-3' como oligo sentido y 5'-GCATCTAAACTCTAGTCTGC-3' como antisentido; para E-caderina: 5'-ATTCTGATTCTGCT-GCTCTTG-3' (sentido) y 5'-AGTAGTCATAGTCCTGGTCTT-3' (antisentido). La amplificación se realizó por 40 ciclos para snail (a 95°C 1 min, 53°C 30 seg y 72°C 1 min), y 32 ciclos para E-caderina (94°C 30 seg, 60°C 30 seg, 72°C 1 min) (*Kim et al., 2007*). Los oligos para amplificar a los distintos RhoGEFs ARHGEF1, ARHGEF2, ARHGEF11, ARHGEF12, Net1, Farp1, Lbc, Vav1, NGEF, Dbl-1 fueron proporcionados gentilmente por el Dr. José Vázquez Prado (Cinvestav, IPN); la amplificación se realizó de 25 a 30 ciclos (94°C 15 seg, 61°C 30 seg, 72°C 1 min). Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1%, el gel fue teñido con bromuro de etidio y después visualizado y fotografiado bajo luz UV.

## ***10. Transfección***

Las células AD293, A549 y L17 se transfectaron usando lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células se sembraron en cajas de 100mm de diámetro, cuando alcanzaron una confluencia del 70% se transfectaron con los plásmidos pCEFL, pCDNA3-G13WT ( $G\alpha 13$  wild-type), pCDNA3/G13QL ( $G\alpha 13$  constitutivamente activa), ambas proteínas con el epítoto HA; pCEFL-RhoA DN-AU1, pCEFL-C3-AU1, pCEFL-RGS p115-AU1, pCEFL-RGS PDZ- AU1 o pCEFL RGS LARG-AU1. Para cada transfección, en un tubo se diluyó el DNA en 0.5 ml de medio DMEM (sin suero y sin antibióticos); en otro tubo se diluyó 10  $\mu$ l de lipofectamina en 0.5 ml de medio. Después de 5 min de incubación, se combinaron la lipofectamina y el DNA, esta mezcla se incubó por 20 min más y posteriormente se añadió a la caja de cultivo celular que contenía medio sin suero, para incubarse por 4 h. Posteriormente, a las células se les cambio el medio sin suero por medio fresco con suero y antibióticos. 48 h post-transfección las células se trataron con TGF- $\beta$  para continuar con los distintos protocolos.

## ***11. Ensayo de genes reporteros***

Para ensayos de genes reporteros, células AD293 (células epiteliales de riñón) se transfectaron con 0.4  $\mu$ g del plásmido reportero 3TP-lux, el cual responde a las Smads activadas por TGF- $\beta$ ; junto con 0.4 $\mu$ g de  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) como control de expresión, por el método de precipitación de DNA con fosfato de calcio. Las HSC cultivadas se ayunaron mínimo por 6 h y tratadas con AII 1  $\mu$ M a distintos tiempos, además las HSC se pretrataron con DPI 1  $\mu$ M, APO 10  $\mu$ M o N-AC 5 mM por 30 min, después se incubaron con AII 1  $\mu$ M por 6 h. El sobrenadante de esos cultivos fue trasladado a las células AD293 transfectadas 24 h antes para observar la presencia o ausencia de TGF- $\beta$  activo. Además, células AD293 transfectadas con el reportero se trataron con AII y con distintas dosis de TGF- $\beta$  por 24 h. La actividad de luciferasa presente en los lisados celulares se detectó usando el kit Luciferase Reporter System (Promega), y la emisión de luz se cuantifico usando un luminómetro Modulus™ (Turner BioSystems, Inc.). La actividad de  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) se detectó adicionando el sustrato ONPG (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido), el producto o-nitrofenol produce un color amarillo el cual se monitoreo por un lector óptico a 415 nm. Los datos se normalizaron con la actividad de  $\beta$ -gal y se representan como número de veces de inducción de actividad de luciferasa con respecto al control.

## ***12. Bioinformática***

Se realizó una búsqueda de las proteínas que pudieran interaccionar con el receptor tipo I T $\beta$ RI (ALK5), específicamente factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) y GTPasas de la

familia de Rho, en 2 bases de datos principalmente: LUMIER (específica para la vía de señalización del TGF- $\beta$ ) y OPHID.

LUMIER es una base de datos que contiene información sobre la interacción de proteínas involucradas en la señalización canónica del TGF- $\beta$  (proteínas Smads y receptores de la familia del TGF- $\beta$ ) con proteínas que provienen de una biblioteca de ratón (FANTOM1). Los datos se almacenan en la siguiente página de Internet: <http://ophid.utoronto.ca/LUMIER/>.

OPHID (<http://ophid.utoronto.ca/ophid/>) es una base de datos sobre predicción de interacciones proteína-proteína (IPP) humanas. En esta base se agrupan los datos de IPP humanas de la literatura recopilados a su vez en otras bases de datos (BIND, HPRD y MINT), y se combinan con los datos de IPP encontrados en organismos modelo como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y *Mus musculus*, y de donde se pueden hacer predicciones de IPP en humano. Las 23,889 interacciones predichas que se enlistan en OPHID son evaluadas por el análisis de dominios, la co-expresión de genes y en términos de ontología de genes.

### ***13. Análisis estadístico***

Los resultados son expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar. Se utilizó el Análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar diferencias significativas. Un valor de  $<0.05$  se consideró como significativo..

## VI. RESULTADOS

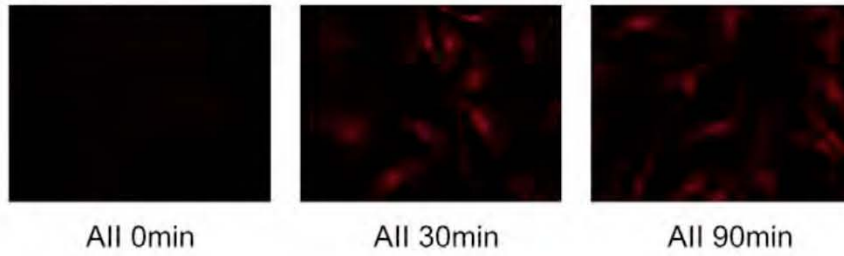
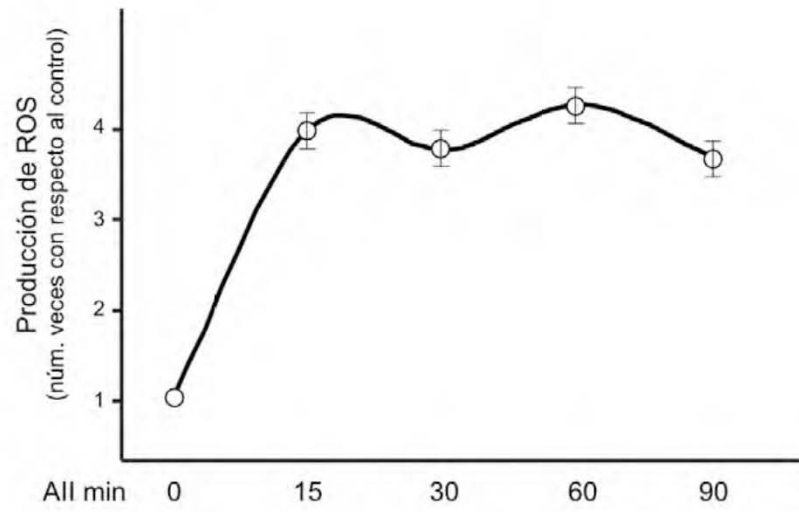
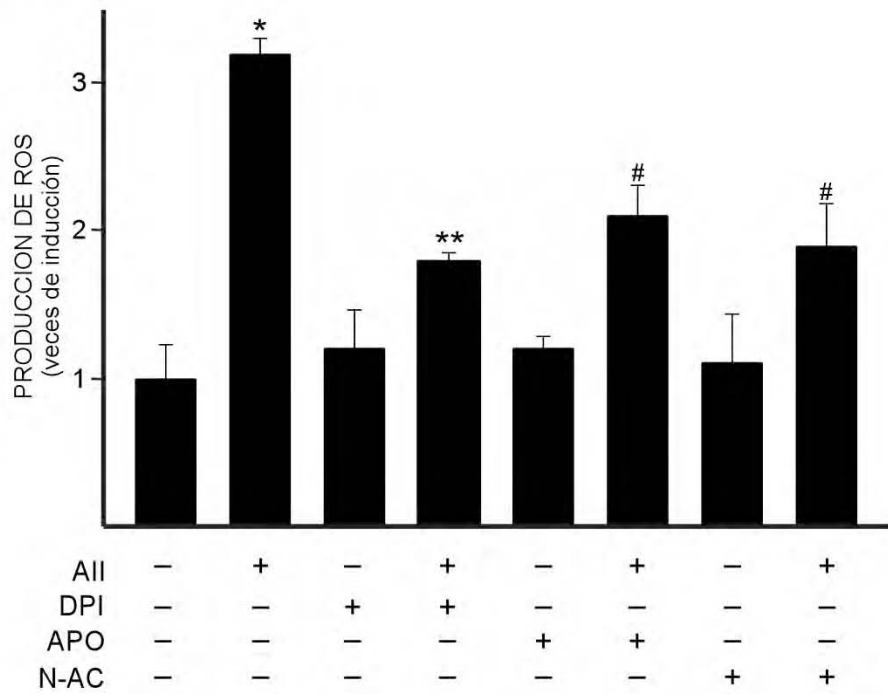
Los resultados del objetivo particular 1 se presentan en el Anexo I.

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

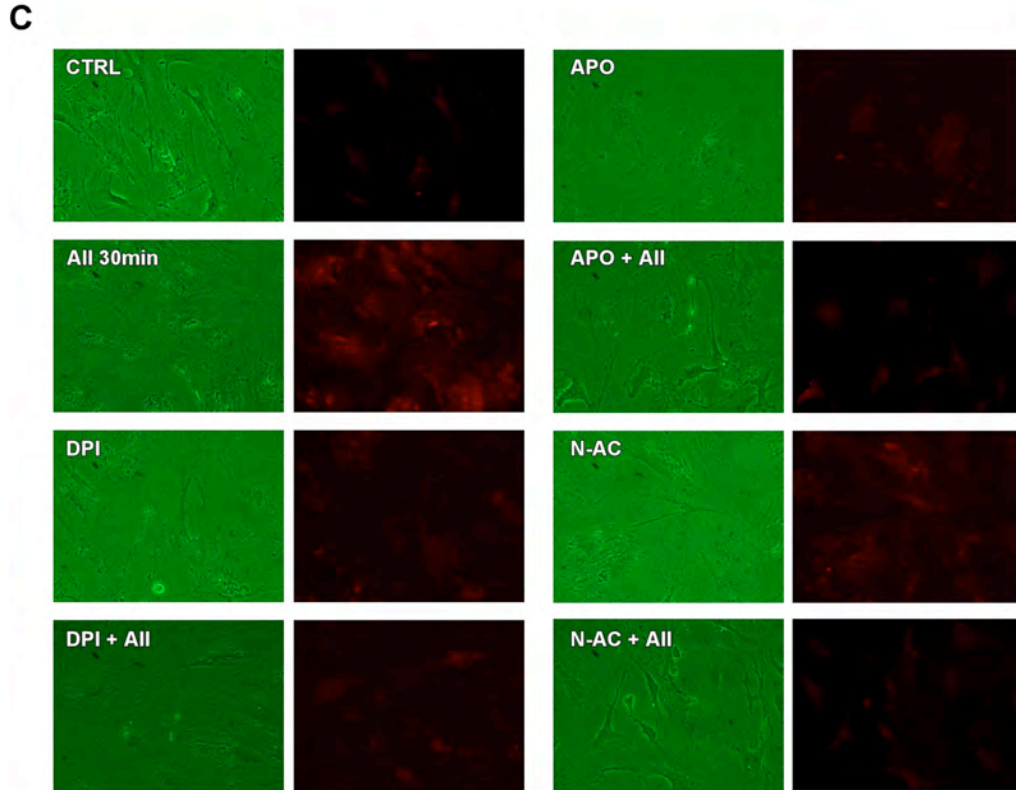
**Anexo I.** Paola Moreno-Alvarez, Marcela Sosa-Garrocho, Claudia González-Espinosa, Jaciel Medina-Tamayo, Eduardo Molina-Jijón, José Pedraza-Chaverri, and Marina Macías-Silva. (2010) Angiotensin II increases mRNA levels of all TGF- $\beta$  isoforms in quiescent and activated Rat Hepatic Stellate Cells. **Cell Biology International** (En prensa).

#### *Resultados complementarios*

La AII es capaz de activar varias vías de señalización como Ca<sup>2+</sup>-PKC, MAPK y la producción de especies reactivas de oxígeno a través de Nox. Estudiamos la producción de ROS por AII utilizando el compuesto DHE en HSC de rata, que al ser oxidado tiñe a la célula de color rojo. En la figura 8A, se observa el curso temporal de producción de ROS por la estimulación de AII 1 $\mu$ M, desde los 5 min se observa un aumento en la intensidad de la señal donde el punto mas alto se encuentra a los 60 min (figura 8A). Esto concuerda con otros estudios (*Bataller et al., 2003b*) donde se demuestra que las AII induce la producción de ROS, y que pueden ser relevantes en la señalización celular e incluso participar en la fibrosis hepática. Las principales fuentes de ROS son la mitocondria (a través de la cadena respiratoria), las xantinas oxido-reductasas, citocromos P450, Nox y enzimas involucradas en el metabolismo del ácido araquidónico, como lipooxigenasas y ciclooxigenasas (*Hancock et al., 2001*). En las HSC la principal fuente de ROS es la Nox que puede ser activada por AII, así que utilizamos distintos inhibidores de esta enzima como difenileneiodonio (DPI), Apocinina (APO) y un antioxidante la N-acetil cisteína (N-AC). Como se observa en la figura 8B y 8C, la preincubación con los inhibidores de la Nox, 1 h antes del tratamiento con AII por 30 min, bloquea la producción de ROS en HSC activadas de rata. Así podemos concluir que la principal fuente de ROS en HSC es generada por la Nox.

**A****B**





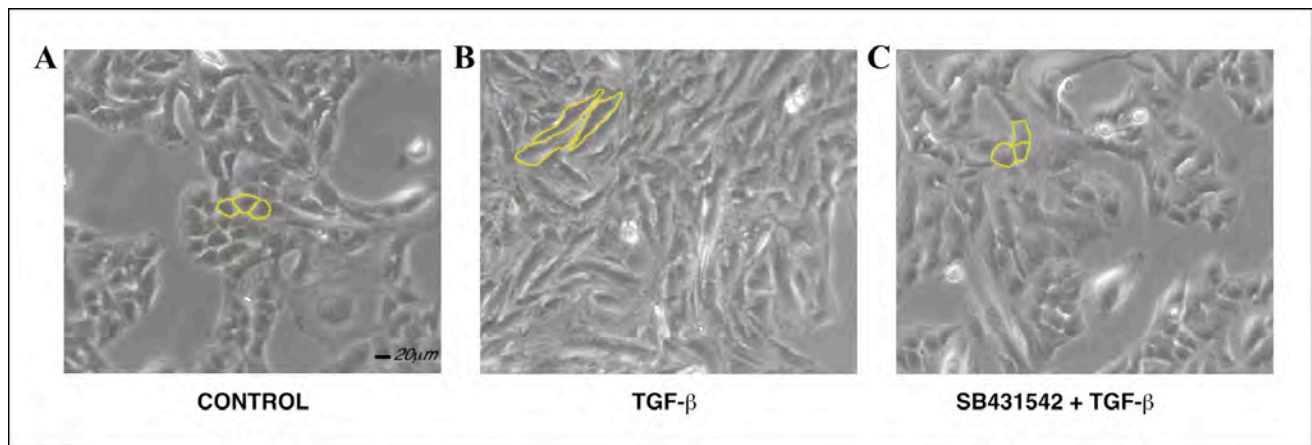
**Figura 8. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por AII a través de la Nox en HSC activadas de rata. A)** HSCs activadas de rata tratadas con  $1 \mu\text{M}$  de AII por los tiempos indicados. Después de este tiempo se incubaron con DHE que tiñe a la célula de color de rojo al ser oxidado. La intensidad de la señal fue comparada con el control y se expresa como el número veces de incremento con respecto al control. En el panel inferior se observar fotos representativas de 3 experimentos. **B)** Gráfica representativa de la producción de ROS en HSC pretratadas con distintos inhibidores de la Nox: DPI  $1 \mu\text{M}$ , APO  $10 \mu\text{M}$  y un antioxidante N-AC  $5 \text{mM}$ . **C)** Microfotografías representativas de los experimentos realizados en B. \* $p < 0.01$ , versus control; \*\* $p < 0.01$  y # $p < 0.05$  versus células tratadas con AII;  $n = 3$ .

## RESULTADOS DEL OBJETIVO PARTICULAR 2

### 2. El TGF- $\beta$ y la transición Epitelio-Mesénquima en células A549

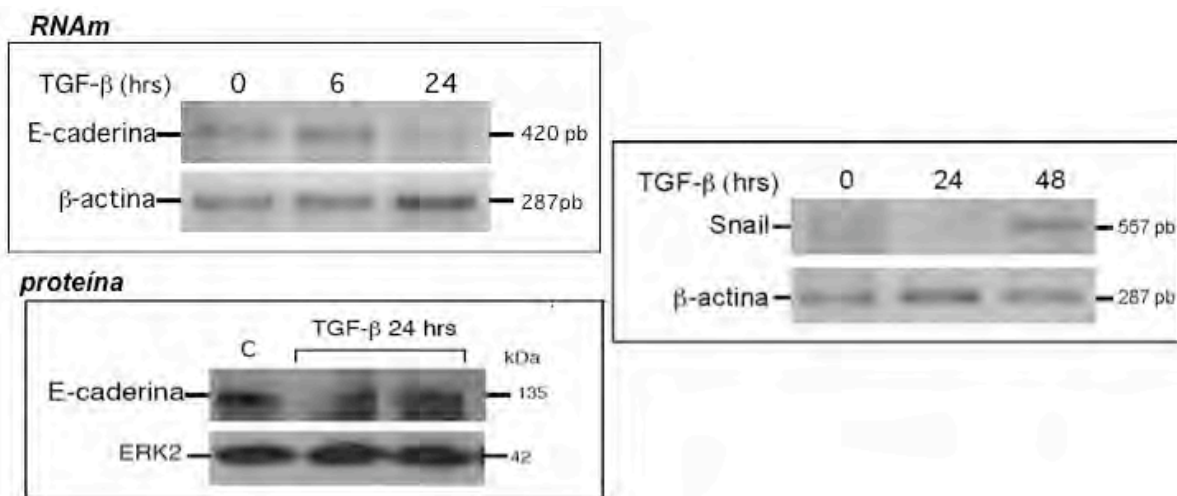
La generación de fibroblastos a partir de la EMT durante la fibrogénesis es una hipótesis que ayudaría a explicar el mecanismo de amplificación del depósito de ECM y de la presencia de un número considerable de fibroblastos en el tejido dañado (Kalluri & Weinberg, 2009). El estudio de la EMT en un proceso fibrogénico *in vivo* es difícil, pero existen varias líneas celulares donde este proceso ocurre *in vitro* por la adición de diversos agentes, entre ellos el TGF- $\beta$ . Las principales acciones de TGF- $\beta$  en diversos modelos de EMT son mediados a través de las proteínas Smads, aunque existe evidencia de que el TGF- $\beta$  puede activar vías de transducción alternas como RhoA. La línea A549 es una línea celular epitelial alveolar derivada de un carcinoma de pulmón humano, que presenta un fenotipo característico de

epitelio, y en presencia de TGF- $\beta$  por tiempos prolongados sufre una EMT (Kasai *et al.*, 2005; Ando *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007). Así, decidimos trabajar con las células A549, para realizar estudios de activación de vías alternas por TGF- $\beta$ . Se cultivaron las células A549 hasta alcanzar un 90% de confluencia, después en medio sin suero se adicionó TGF- $\beta$  0.2 nM, y se observaron los cambios morfológicos en estas células, por medio de microscopía de contraste de fases. En la figura 9, se observa que a diferencia del control (figura 9A), en la presencia del TGF- $\beta$  las células pierden su fenotipo epitelial, pierden los contactos célula-célula, y se convierten en células alargadas tipo fibroblasto (figura 9B) presentándose sin un orden aparente (fenotipo clásico de la EMT). Se ha reportado que la EMT es dependiente de la actividad del receptor T $\beta$ RI y de las Smads, al utilizar un inhibidor específico de T $\beta$ RI, el SB431542, se impide que el TGF- $\beta$  pueda ocasionar los cambios morfológicos característicos de la EMT en A549 (figura 9C).



**Figura 9. Cambios morfológicos inducidos por TGF- $\beta$  en células A549, dependientes de la actividad de cinasa de T $\beta$ RI.** Células A549 se arrestartaron por 12 h y tratadas con TGF- $\beta$  0.2nM con o sin el inhibidor de T $\beta$ RI (SB431542) como se indica por 24 h, en medio F12 sin suero. Las imágenes se captaron a las 24 h (aumento 10X). A) control, B) TGF- $\beta$  0.2nM y C) SB431542 10 $\mu$ M + TGF- $\beta$  0.2nM. n=4

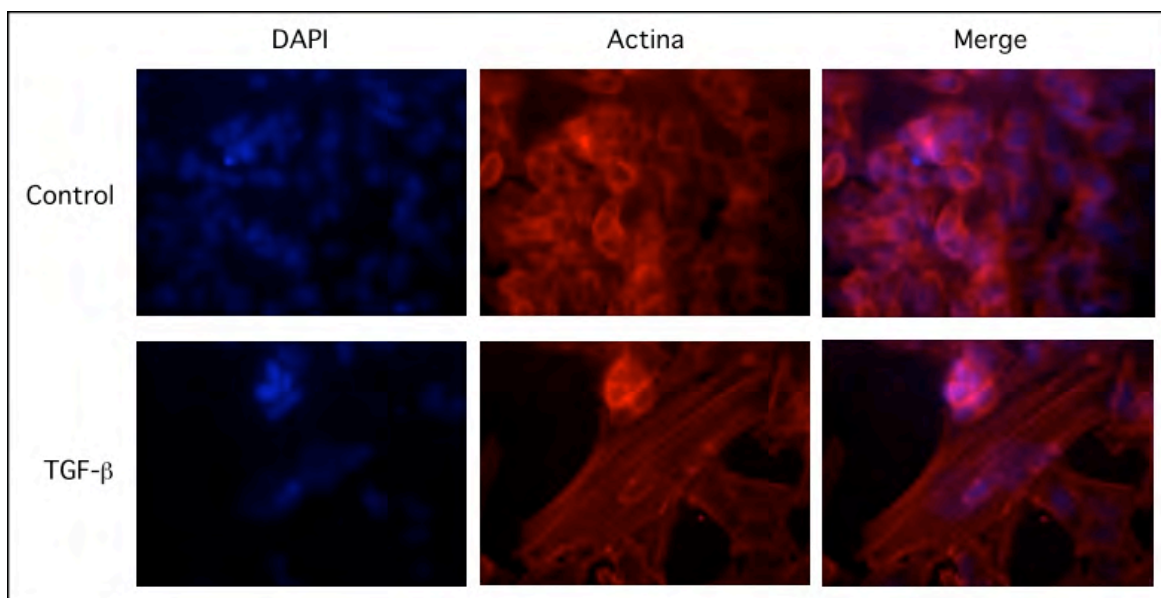
La pérdida de polaridad y de los contactos célula-célula, son algunos de los cambios iniciales en la EMT, y se presentan también cambios en la expresión y represión de ciertos genes que se consideran marcadores de la EMT, como la represión de E-caderina la proteína que forma las uniones adherentes y una alta expresión de Snail, un factor de transcripción con dedos de zinc. Por medio de RT-PCR, buscamos la represión de E-caderina y la expresión de Snail en células A549 tratadas con TGF- $\beta$  0.2 nM por 6 y 24 h. Como se observa en la figura 10, el RNAm de E-caderina deja de expresarse después de 24 h del tratamiento con TGF- $\beta$ , lo que también se refleja en la cantidad de proteína, mientras que el RNAm del co-represor Snail se expresa a las 48 h (figura 10).



**Figura 10. Represión de E-caderina y expresión de Snail por TGF- $\beta$  en A549.** RT-PCR realizado a partir de RNA total de células A549 tratadas con TGF- $\beta$  0.2 nM en los tiempos indicados. Se utilizaron los niveles del RNAm de  $\beta$ -actina y de la proteína ERK2 como controles. n=2

Además de los cambios en la morfología de las células A549, buscamos por medio de inmunofluorescencia cambios en el citoesqueleto inducidos por TGF- $\beta$ , principalmente la polimerización de actina para la formación de fibras de estrés, inducidos por TGF- $\beta$ . Para esto, se cultivaron células A549 sobre cubreobjetos cubiertos con fibronectina, y después de alcanzar la confluencia las células se trataron en medio sin suero en presencia de TGF- $\beta$  0.2 nM, y el control sin la citocina.

En la figura 11, se presentan las imágenes de fluorescencia, en donde en color rojo se muestra la actina y en azul el núcleo. En las células control, se observa claramente la formación de un cinturón de actina en la periferia de la célula (figura 11, control) y en los contactos entre las células, ambas características de un epitelio. En cambio, el tratamiento con TGF- $\beta$  0.2 nM, induce la formación de fibras a lo largo de la célula y la pérdida de los contactos celulares (figura 11, TGF- $\beta$ ), lo que correlaciona con los cambios morfológicos observados (fenotipo tipo fibroblasto). Con esto podemos concluir que el TGF- $\beta$  provoca cambios en el citoesqueleto, que hacen que las células epiteliales A549 pierdan su polaridad apico-basal, y que quizás en estos cambios este muy probablemente involucrada la GTPasa Rho, que forma parte de una de las principales vía de señalización involucradas en la remodelación del citoesqueleto.



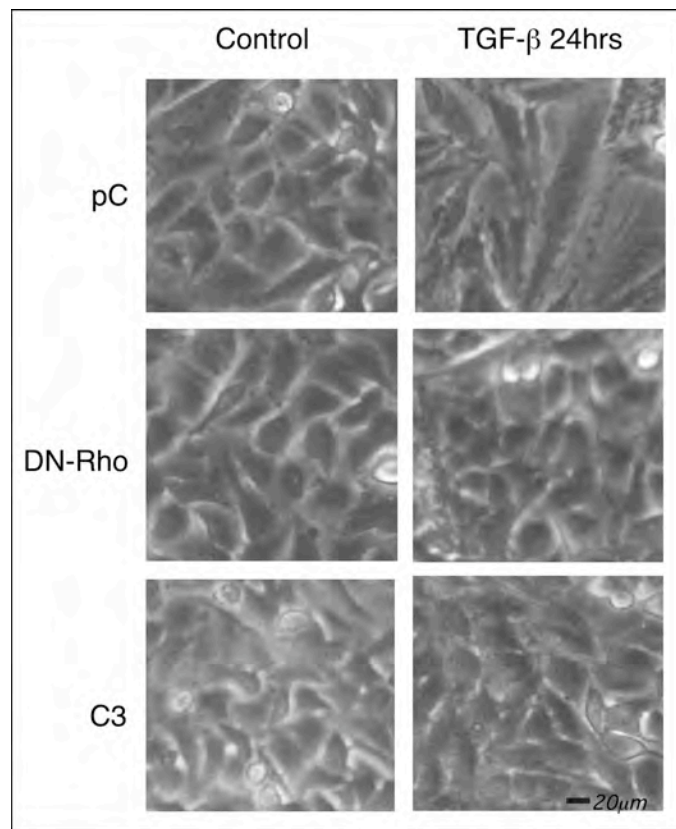
**Figura 11. Formación de fibras de estrés en células A549 por TGF-β.** Imágenes de inmunofluorescencia para F-actina (rodamina, rojo) y núcleo (DAPI, azul) capturadas con un microscopio confocal. Las células A549 sin TGF-β (control) tratadas con TGF-β 0.2 nM, por 48 hrs en medio sin suero y teñidas para F-actina y núcleo.

Bhowmick y col., encontraron que el TGF-β podía activar a RhoA en un modelo de EMT de células de glándula de mama de ratón y que al transfectar la dominante negativa de RhoA se bloqueaban los efectos de TGF-β (*Bhowmick et al., 2001*). Así que decidimos transfectar en células A549 la dominante negativa de RhoA (DN-RhoA) y a C3, una enzima que ADP-ribosila a las GTPasas de la familia de Rho. Después de 48h, las células se trataron con TGF-β por 24 h y observamos los cambios morfológicos (figura 12); en células transfectadas con el vector vacío (pC) y tratadas con TGF-β se observan células alargadas que han perdido su fenotipo epitelial, mientras que en células transfectadas con DN-Rho y C3 la mayor parte mantiene su forma epitelial después del tratamiento con TGF-β. Nuestros datos preliminares muestran que RhoA es necesaria para los cambios morfológicos en la EMT inducidos por TGF-β en células A549.

### 3. Activación de RhoA por TGF-β en células A549

Después de observar el proceso de EMT en células A549, demostrado por los cambios en la morfología, la represión de E-caderina, la expresión de Snail y la presencia de fibras de estrés, buscamos las vías de señalización activadas por TGF-β en estas células. Las vías de señalización alternas a las Smads pueden contribuir al proceso de EMT inducido por TGF-β, ayudando a la remodelación en la arquitectura celular y a la expresión de diversos genes. En las células A549, conjuntamente con la

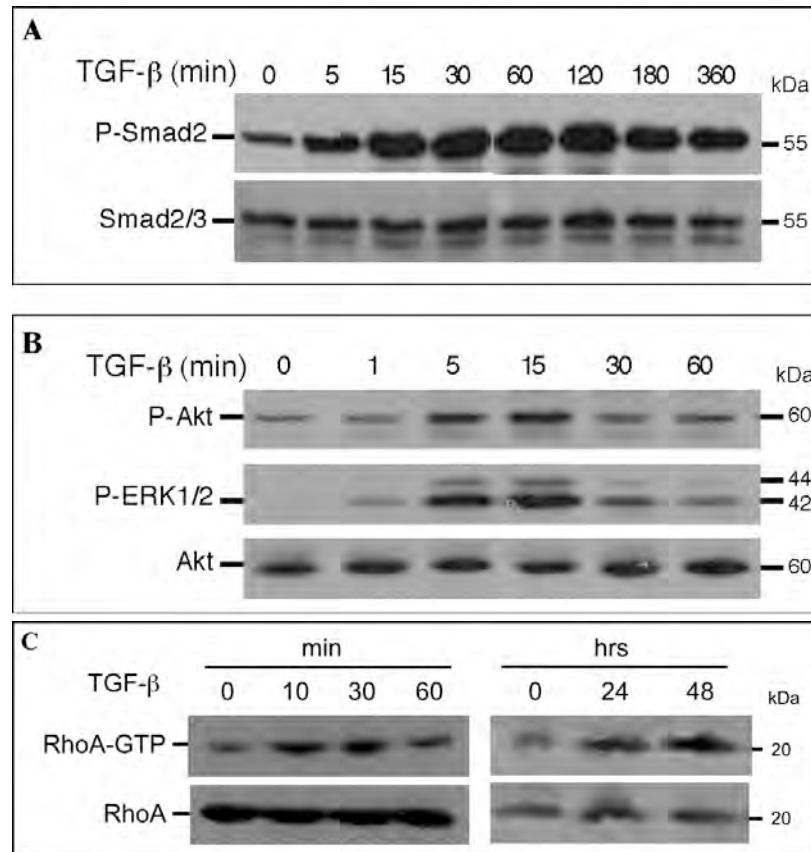
activación de Smads, el TGF- $\beta$  es capaz de activar las vías de RhoA, MAPK-ERK y la vía de Akt (figura 13). Para establecer la cinética de activación de cada una de estas vías en células A549, se realizó un curso temporal con TGF- $\beta$  y se detectó por medio de inmunoblots la forma activa de estas proteínas. Principalmente, las proteínas Smads se encuentran activas desde los 5 min hasta 6 h después del tratamiento con TGF- $\beta$  (figura 13A). En el caso de Akt y ERK1/2, estas se activan a los 5 min de forma similar a Smads, aunque su duración es menor, hasta 1 h (figura 13B). También, detectamos que TGF- $\beta$  es capaz de activar a RhoA en tiempos cortos de 5 y 10 min, y en períodos más largos de 24 y 48 h (figura 13C).



**Figura 12. La activación de RhoA es necesaria para los cambios morfológicos inducidos por TGF- $\beta$  en células A549.** Células A549 se transfectaron con un vector vacío (pC), la dominante negativa de RhoA (DN-Rho) y C3, una proteína inhibidora de GTPasas monoméricas; 48 h de la transfección se trataron con TGF- $\beta$  200pM por 48 h con. Las imágenes se captaron a las 24 h de tratamiento (aumento 10X).

Para conocer si la activación de vías alternas previamente observadas en células A549 eran dependientes de la actividad de cinasa del receptor T $\beta$ RI, pre-tratamos a las células con el inhibidor SB431542 10  $\mu$ M por 30min. Como se observa en la figura 14A, la activación de Smad2 en las células A549 es abatida por tratamiento con el inhibidor de T $\beta$ RI. Es muy interesante que la activación de ERK1/2 o de RhoA por TGF- $\beta$  en las células A549 no sea afectada por el SB431542 (figura 14A y 14B), lo que sugiere que en estas células no se requiere la actividad de cinasa de T $\beta$ RI para activar a MAPK y a

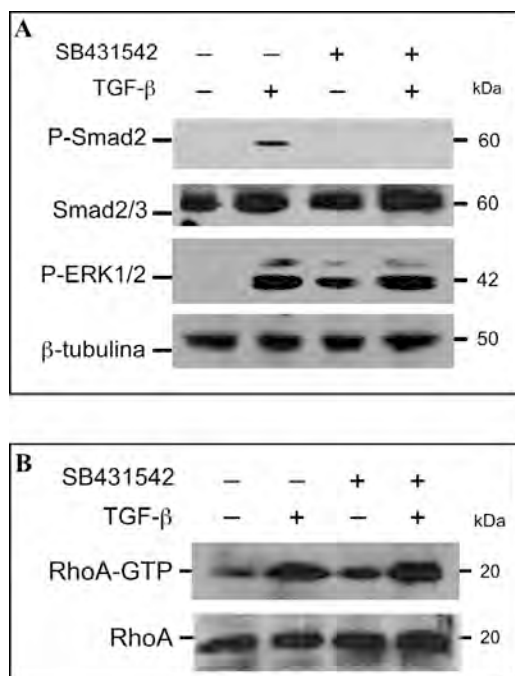
RhoA. Es posible que en las células A549 los receptores a TGF- $\beta$  estén asociados a proteínas tanto adaptadoras como efectoras que no necesiten ser fosforiladas por T $\beta$ RI para activar a MAPK y a RhoA. Este es el caso de Par6, una proteína adaptadora que es fosforilada por el receptor tipo II cuando se une el ligando, lo que lleva al desensamblaje de las uniones celulares en las células NMuMG (Ozdamar *et al.*, 2005).



**Figura 13. Activación de vías de señalización por TGF- $\beta$  en células A549.** **A)** Fosforilación de Smad2, células A549 se trataron con TGF- $\beta$  0.3 nM en los tiempos indicados, de los extractos celulares se inmunoprecipito a Smad2/3 y se realizó el blot para detectar a Smad2 fosforilado (P-Smad2). **B)** Fosforilación de Akt y ERK, de los extractores celulares se realizaron los inmunoblot para las formas fosforiladas y totales de estas proteínas. **C)** Activación de RhoA, ensayo de pull-down con GST-RBD e inmunoblot para detectar RhoA-GTP y RhoA total. n=3

#### 4. Interacción de G $\alpha$ 13 y de los receptores a TGF- $\beta$

En la activación de RhoA se necesita la participación de algún Rho-GEF; como se mencionó anteriormente, existen alrededor de 70 GEFs para la familia de GTPasas de Rho. Los receptores a TGF- $\beta$  podrían asociarse a alguna de estas proteínas, así que se realizó una búsqueda *in silico* para encontrar GEFs candidatos que pudieran asociarse a T $\beta$ RI. Las bases de datos empleadas son las conocidas como LUMIER (*luminescence-based mammalian interactome mapping*) y OPHID (*Online Predicted Human Interaction Database*).



**Figura 14. La activación de ERK1/2 y RhoA por TGF- $\beta$  en A549 no depende de la actividad de cinasa de T $\beta$ RI.** **A)** Fosforilación de Smad2, células A549 se pretrataron con SB431542 10  $\mu$ M y después con TGF- $\beta$  0.3 nM por 15min como se indica, de los extractos celulares se inmunoprecipitó a Smad2/3 y se realizó el inmunoblot para detectar a Smad2 fosforilada (P-Smad2). De los mismos extractos celulares se realizaron los inmunoblot para las formas fosforiladas y totales de ERK1/2. **B)** Activación de RhoA detectada por un ensayo de pull-down con GST-RBD e inmunoblot para detectar RhoA-GTP y RhoA total, las células A549 se pretrataron con SB431542 10  $\mu$ M y después con TGF- $\beta$  0.3 nM por 10 min. n=2

En esta búsqueda se encontraron varios GEFs que regulan la actividad de GTPasas que forman parte de la familia de Rho. Entre las vías de señalización independientes a Smads, que pueden ser activadas por TGF- $\beta$ , no se ha descrito o caracterizado aún la interacción de este tipo de GEFs con la vía del TGF- $\beta$ . A continuación se enlistan los GEFs candidatos en la Tabla IV.

Es de notar que estos GEFs reportados en Lumier se unen a las Smads, y que existen dos GTPasas: RhoA y G $\alpha$ 13, que estarían asociadas al receptor. Las proteínas p115-RhoGEF y a PDZ-RhoGEF, junto con otro GEF denominado LARG, pertenecen a una familia de RhoGEFs, estos RhoGEF, son regulados por receptores asociados a proteínas G heterotriméricas de la familia G $\alpha$ 12/13, como por ejemplo receptores a el ácido lisofosfatídico (LPA) y a Trombina. Como característica principal, estos RhoGEFs contienen dominios RGS, que establecen la unión de estas proteínas con G $\alpha$ 12/13 y a la vez regulan su actividad de GTPasa (Vázquez-Prado *et al.*, 2004). Estas proteínas tienen diversos dominios estructurales que permiten la interacción con otras proteínas, así como la regulación de su actividad. Los dominios DH y PH son necesarios para regular el intercambio de GDP por GTP, el dominio PDZ y la región carboxilo



terminal permiten la interacción con semaforinas (como plexina B) y con PAK4 respectivamente (figura 15).

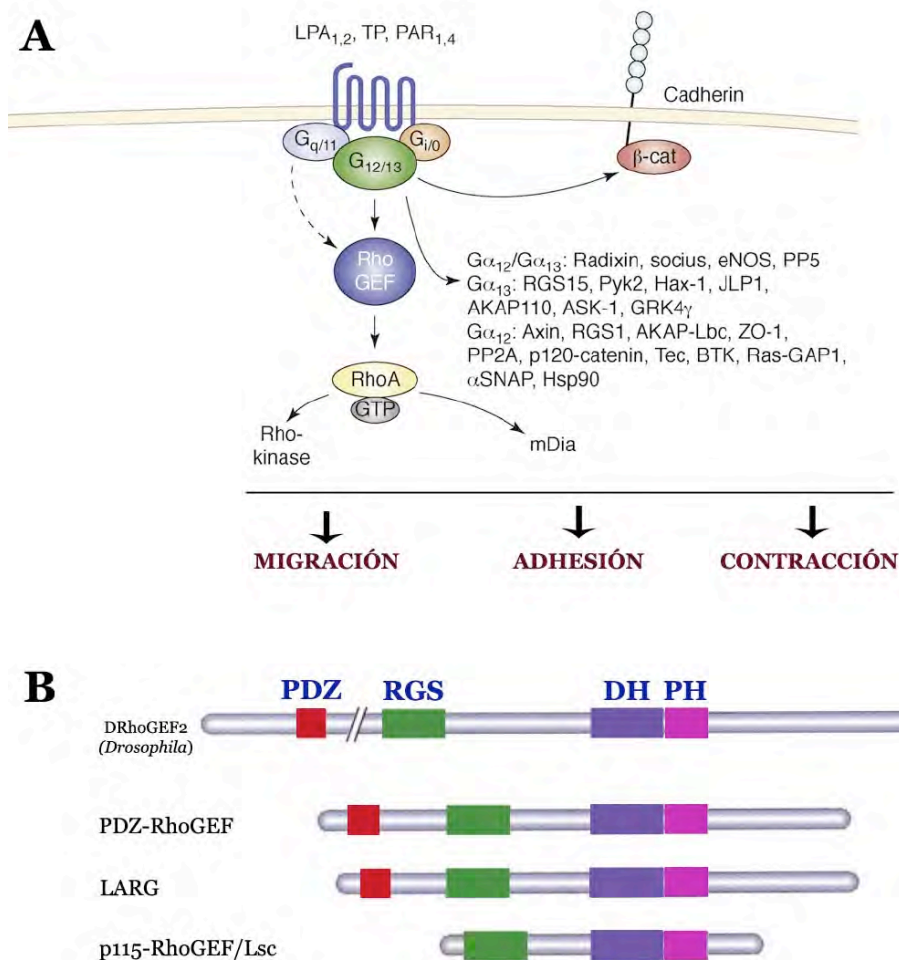
**Tabla IV.** GEFs candidatos que regulan la función de GTPasas de la familia de Rho encontrados en LUMIER y OPHID

<i>GEF</i>	<i>CARACTERÍSTICAS</i>	<i>COMPONENTE DE LA VÍA DEL TGF-β AL QUE SE UNE</i>
ARHGEF1 (p115-RhoGEF)	GEF - RhoA	SMAD2, SMURF1/2
ARHGEF11 (PDZ-RhoGEF)	GEF - RhoA	SMAD4, SMURF1
ARHGEF7 (β-Pix)	GEF - Rac1	SMAD2/3/4, SMURF1
ARHGEF6 (α-Pix)	GEF - Rac1/Cdc42	SMAD2/3/1, <b>TGFβRI</b>
<b><i>GTPasa</i></b>		
RhoA (H12)	GTPasa	<b>TGFβRI</b>
RAC1	GEF-independiente	SMURF2
Gα13	GTPasa	<b>TGFβRI</b>

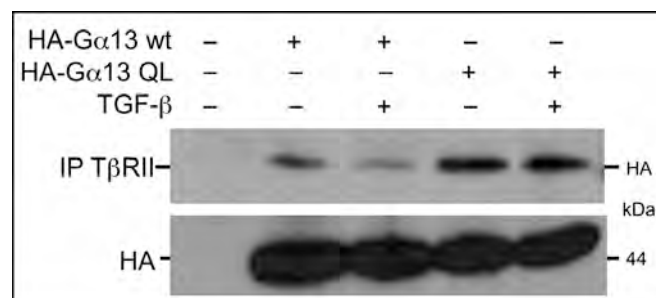
TGFβRI = Receptor tipo I del TGF-β

Utilizamos células AD293 para transfectar los plásmidos pCDNA3/G13WT (Gα13 wild-type) y pCDNA3/G13QL (Gα13 constitutivamente activa), ambas proteínas con el epítoto HA, y poder así realizar ensayos de inmunoprecipitación con un anticuerpo que reconoce la región carboxilo del receptor tipo II de TGF-β, de manera que cuando se adiciona TGFβ es posible capturar los complejos de receptores I y II junto con alguna proteína de señalización. En células transfectadas con Gα13, se realizó un tratamiento con TGF-β 0.3 nM por 15 min, 48 h post-transfección, luego las células se lisaron, y los extractos proteicos se inmunoprecipitaron para obtener los complejos de receptores. Como se observa en la figura 16, los receptores de TGFβ pueden interaccionar con la proteína Gα13, tanto wild-type como constitutivamente activa. Cabe mencionar que no es posible descartar una interacción con el receptor tipo I con Gα13, ya que se conoce que bajo ciertas condiciones se pueden formar complejos de receptores I y II aún en ausencia de TGF-β.



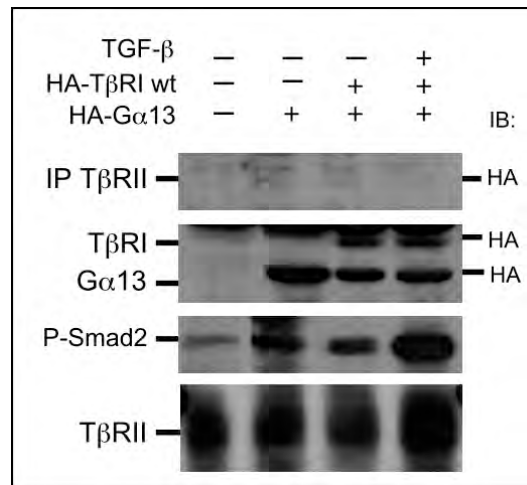


**Figura 15. Esquema representativo de la subfamilia de RhoGEFs con dominios RGS.** A) Los dominios RGS en esta familia permiten la interacción con las proteínas G $\alpha_{12/13}$ , los dominios DH-PH regulan a actividad de RhoA y los dominios PDZ intervienen en interacciones proteína-proteína. La activación de esta vía regula procesos como migración, adhesión y contracción celulares. B) En el esquema se representa a PDZ-RhoGEF (ARHGEF11), LARG (ARHGEF12) y p115-RhoGEF (ARHGEF1); y sus dominios estructurales PDZ, RGS y DH-PH. Tomado de Fukuhara *et al.*, 2001.



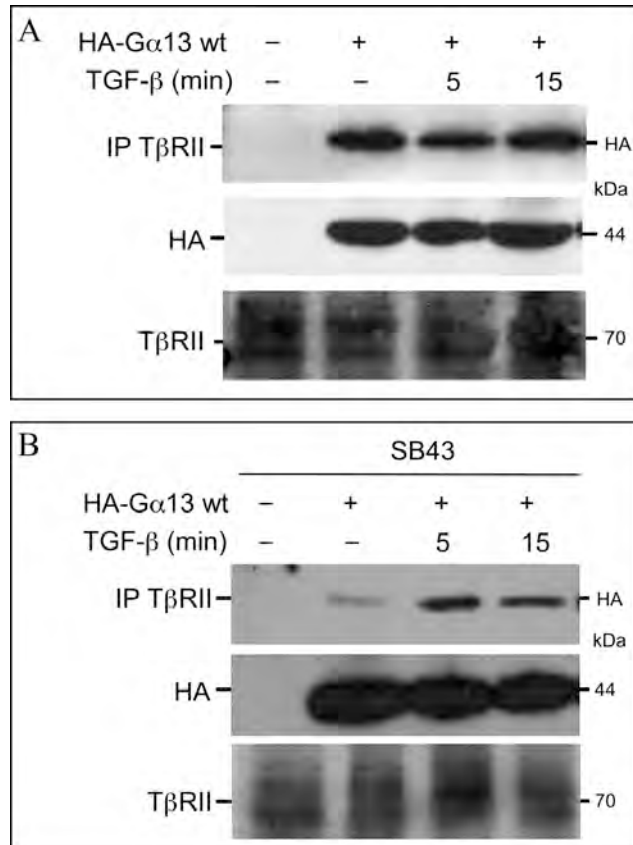
**Figura 16. G $\alpha_{13}$  interactúa con los receptores  $\alpha$  TGF- $\beta$ .** AD293 se transfectaron con HA-G $\alpha_{13}$ wt o HA-G $\alpha_{13}$ -QL, después de 48h las células se trataron con TGF $\beta$  como se indica. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpo contra el receptor tipo II. El inmunoblot se realizó contra el epítopo HA. n=3

Es posible que la interacción de  $G\alpha 13$  con los receptores a TGF- $\beta$  sea exclusivamente a través del receptor tipo II. Utilizamos células L17, una clona de células epiteliales Mv1Lu (epitelio pulmonar de visón), que carece del receptor tipo I. Las células se transfectaron con  $G\alpha 13$ -wt y/o con el T $\beta$ RI, realizando la inmunoprecipitación de los receptores después de 48 h de transfección. Como se observa en la figura 17, en células L17  $G\alpha 13$  no es capaz de interactuar con el receptor tipo II como ocurre en las células AD293, además de que cuando se transfecta al receptor T $\beta$ RI, observamos que tampoco es capaz de interactuar con el complejo de receptores. Con estos datos, podemos sugerir que en las células L17 es posible que se necesite de algún otro elemento que permita la interacción de  $G\alpha 13$  con los receptores.



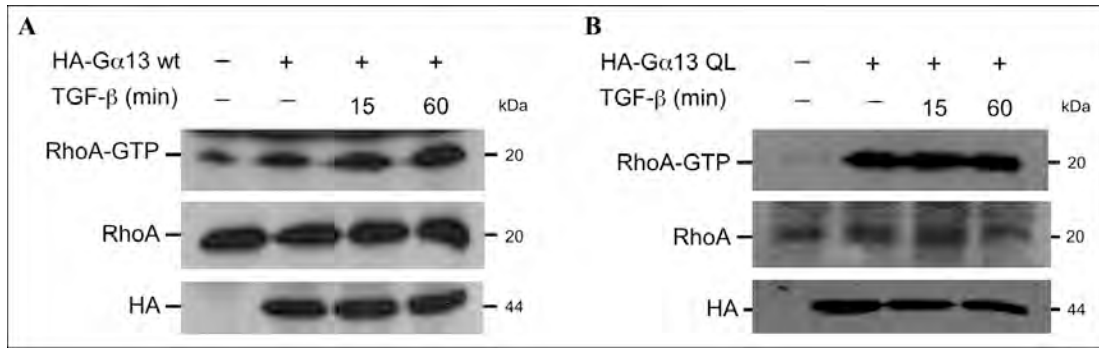
**Figura 17. En células L17,  $G\alpha 13$  no interactúa con los receptores a TGF- $\beta$ .** L17 que no expresan el receptor tipo I a TGF $\beta$  se transfectaron transitoriamente con HA- $G\alpha 13$  wt y/o con HA-T $\beta$ RI, después de 48 h las células se trataron con TGF $\beta$  como se indica. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpo contra el receptor tipo II y contra smad2/3. El inmunoblot se realizó contra el epítotope HA y contra Smad2 fosforilada.

Después de observar la interacción de  $G\alpha 13$  con los receptores de TGF- $\beta$ , se realizó un curso temporal para estimar el tiempo de interacción entre ambos componentes. En células AD293 transfectadas, 48 h post-transfección con  $G\alpha 13$ -wt, se realizó un curso temporal con TGF- $\beta$  por 5 y 15 min, además en otros experimentos se utilizó el inhibidor del dominio de cinasa de T $\beta$ RI el SB431542 por 30 min antes del estímulo, y después se realizó la co-inmunoprecipitación de los complejos de receptores. En la figura 18A y 18B, se observa una importante acumulación de  $G\alpha 13$  con los receptores 15 min después del tratamiento con TGF- $\beta$ , y al parecer no es necesario el dominio de cinasa de T $\beta$ RI para esta asociación (figura 18B).



**Figura 18. Curso temporal de asociación entre G $\alpha$ 13 y los receptores a TGF- $\beta$ .** AD293 se transfectaron con HA-G $\alpha$ 13wt, después de 48h las células se trataron con TGF- $\beta$  con y sin SB431542 un inhibidor de la cinasa ALK5 o T $\beta$ R1 como se indica. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpo contra el receptor tipo II. El inmunoblot se realizó contra el epítopo HA y contra el receptor tipo II. n=3

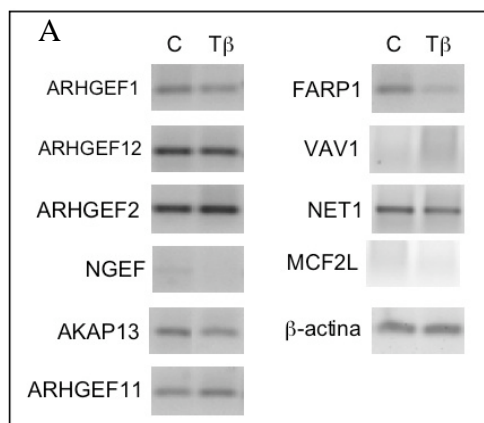
G $\alpha$ 13 interacciona con diversas proteínas de señalización como PP5 (proteína fosfatasa 5), AKAP (proteína de andamiaje importante en migración), y los RhoGEFs: LARG, PDZ o P115, que activan a RhoA (figura 15) (*Kelly et al., 2007*). Un método indirecto para saber si TGF- $\beta$  regula a G $\alpha$ 13 de manera positiva o negativa, es estudiando la activación de RhoA. En ensayos de inmunoprecipitación de RhoA-GTP, observamos que en células transfectadas con G $\alpha$ 13 wt, el TGF- $\beta$  aumenta muy poco la activación de RhoA (~0.6 veces) a los 15 min de la adición de la citocina (figura 19A). De igual forma, en células transfectadas con G $\alpha$ 13 QL, el TGF- $\beta$  no afecta la activación de RhoA inducida por G $\alpha$ 13QL (figura 19B). Se necesitaran ensayos directos para observar la posible activación de G $\alpha$ 13 por TGF- $\beta$ , por ejemplo ensayos de pull-down con el dominio TPR o ensayos con GTP $\gamma$ S un análogo del GTP no hidrolizable.

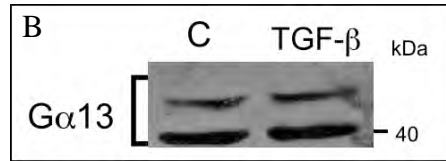


**Figura 19. Activación de RhoA por Gα13 en AD293.** Células AD293 se transfectaron con HA-Gα13wt (A) o HA-Gα13-QL (B), después de 48h las células se trataron con TGFβ como se indica. Con lisados celulares se realizó el ensayo de pull-down con GST-RBD e inmunoblot para detectar RhoA-GTP y RhoA total. Se realizó el inmunoblot contra el epítipo HA para ver la expresión de Gα13. n=3

### 5. Participación de Gα13 en la activación de RhoA por TGF-β

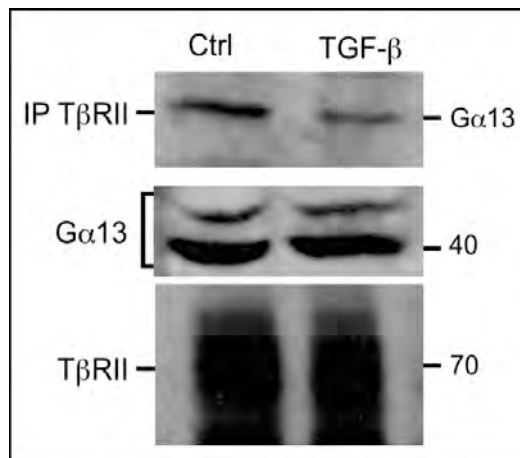
Como se mencionó anteriormente, en la base de datos de Lumier encontramos varios RhoGEFs candidatos que pudieran estar asociados con las proteínas Smads y Smurf1/2 (Tabla IV), además existen dos GTPasas RhoA y Gα13 que podrían estar asociadas al receptor. Existen alrededor de 40 GEFs para RhoA y específicamente en el tejido pulmonar se expresan ~20 GEFs (Schiller, 2006), así que lo siguiente fue conocer si los RhoGEFs candidatos se expresaban en las células A549. Se realizó un RT-PCR para al menos 10 RhoGEFs que se sabe se expresan en tejido pulmonar y que activan exclusivamente a RhoA. Además de conocer su nivel de expresión, se estudio si podían ser regulados por TGF-β (figura 20A). Como se observa en la figura 20A, los RhoGEF encontrados en las bases de datos: ARHGEF1 y ARHGEF11, se expresan en las células A549, además de ARHGEF12 (LARG) que pertenece a esta misma familia de GEFs. Gα13 es una proteína que se expresa en todos los tejidos, y en células A549 esta proteína también esta presente (figura 20B).





**Figura 20. Expresión de RhoGEFs y Gα13 en células A549.** A) RT-PCR realizado a partir de RNA total de células A549 tratadas con TGF-β 0.2 nM por 24h para observar la expresión del RNAm de distintos RhoGEFs. Se utilizó el gen de β-actina como control de expresión. B) Extractos proteicos de células A549 tratadas con TGFβ se separaron por SDS-PAGE y después se realizó el inmunoblot para Gα13.

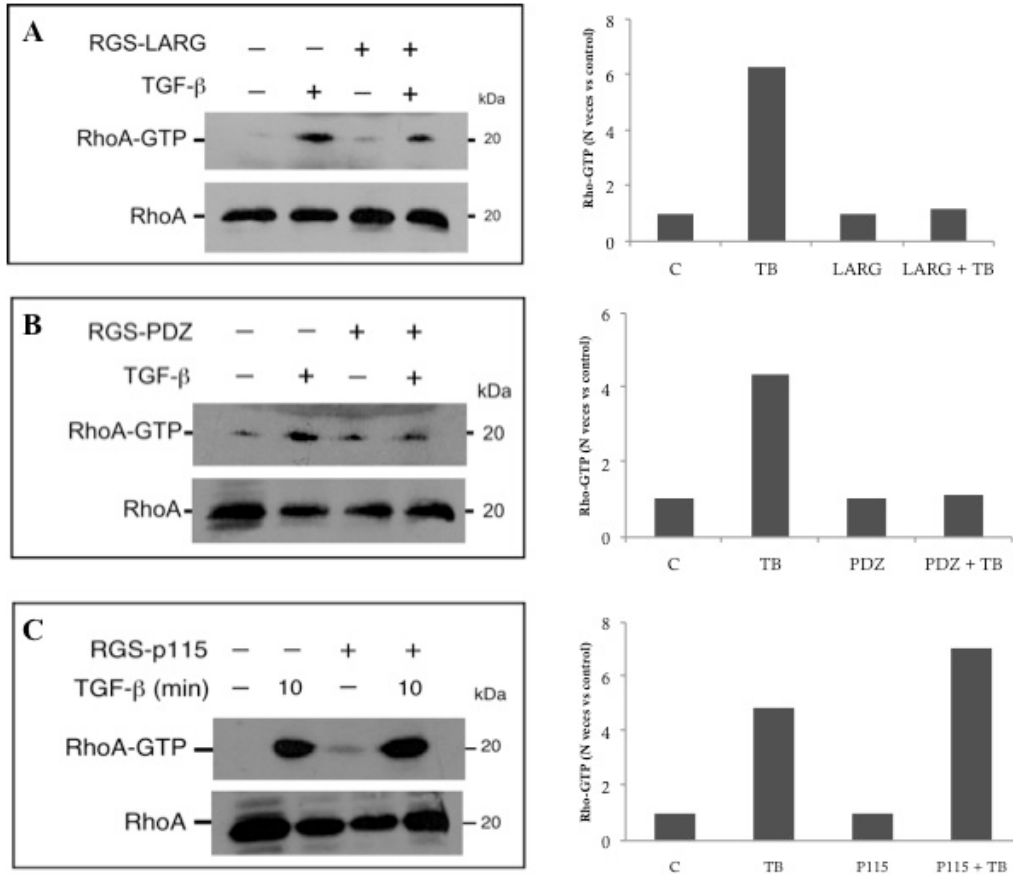
En este trabajo al transfectar Gα13 tanto wild-type como la forma constitutivamente activa (Gα13-QL) en células AD293, observamos la interacción de los receptores de TGF-β con Gα13 en condiciones basales y esta interacción aumenta cuando se adiciona TGF-β. Así decidimos buscar esta interacción en células A549 (figura 21), al inmunoprecipitar al receptor tipo II y utilizar el anticuerpo contra Gα13 se observa la interacción de ambas proteínas, aunque la adición de TGF-β por 1 h parece disminuir su interacción.



**Figura 21. Gα13 interactúa con los receptores a TGF-β de manera endógena en células A549.** Células A549 se arrestartaron por 18 h en medio sin ayuno y tratadas con TGF-β 0.3 nM por 1 hora como se indica. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpo contra el receptor tipo II. El inmunoblot se realizó contra Gα13.

Las proteínas con dominios RGS regulan la actividad de las proteínas G heterotriméricas, aumentando la tasa de hidrólisis de GTP por Gα (Hains *et al.*, 2004), utilizando estos dominios como herramienta se puede estudiar la participación de algún miembro de las distintas familias de Gα en un evento de señalización particular. Como se indicó anteriormente, las RhoGEFs reguladas por Gα12/13 contienen dominios RGS que les ayudan a interactuar con esta Gα; así se utilizaron estos dominios para saber si la activación de RhoA observada en células A549 por TGF-β era a través de Gα13. En la figura 22, se muestran resultados preliminares de ensayos de activación de RhoA por TGF-β en células transfectadas con los dominios RGS-PDZ, RGS-LARG y RGS-p115. En células transfectadas con los dominios RGS de PDZ y RGS de LARG (figura 22A y 22B), la activación de RhoA por TGF-β disminuye

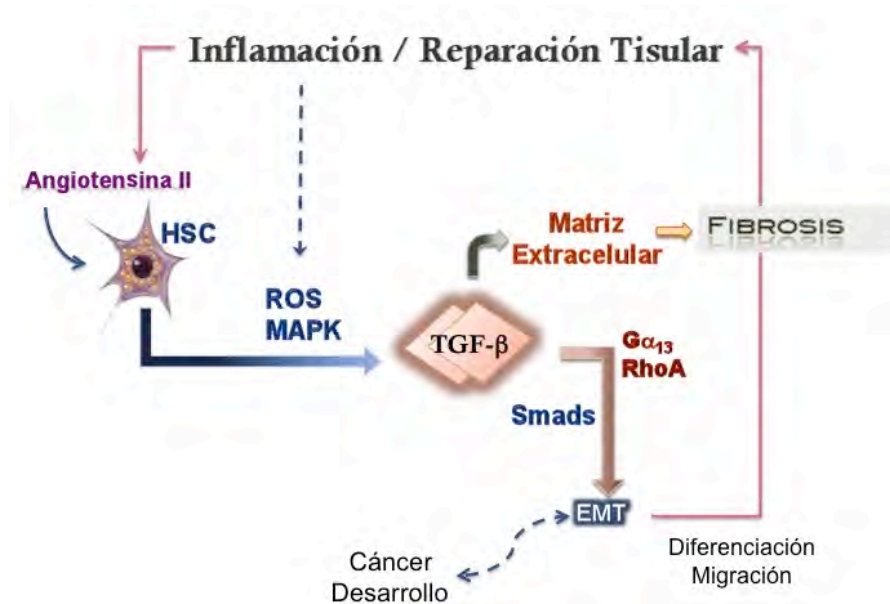
aproximadamente un 80%, mientras que en células transfectadas con RGS-p115 no hay una disminución de la actividad de Rho inducida por TGF- $\beta$  (figura 22C). Con estos últimos datos podemos estimar que TGF- $\beta$  a través de  $G\alpha_{13}$  y de los RhoGEFs PDZ y LARG activa a RhoA en un modelo de EMT.



**Figura 22. Participación de PDZ- y LARG-RhoGEFs en la activación de RhoA por TGF- $\beta$  en células A549.** Células A549 se transfectaron con los dominios RGS de PDZ (A), LARG (B) y p115-RhoGEFs (C). Después de 48 h, se trataron con TGF- $\beta$  0.3 nM por 10min y se realizaron ensayos de activación de RhoA por pull-down con GST-RBD e inmunoblot para detectar RhoA-GTP y RhoA total.

## VII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudio la función y la regulación de la citocina TGF- $\beta$  en dos procesos importantes que se presentan durante la remodelación tisular, primero en su papel como factor pro-fibrogénico al ser regulado por AII en las HSC activadas, principales células que participan en el desarrollo de la fibrosis hepática; y segundo, como inductor de la EMT un proceso relevante tanto en fibrosis como en cáncer, evaluando principalmente nuevos efectores de los receptores para TGF- $\beta$  (figura 23).



**Figura 23. Modelo integrativo del papel del TGF- $\beta$  durante la reparación tisular.** El TGF- $\beta$  es el principal regulador de ECM en un proceso fibrogénico, factores vasomoduladores como la AII participan activamente en el desarrollo de fibrosis hepática, ya que regula positivamente la producción de las isoformas del TGF- $\beta$ . Además esta citocina controla la EMT, a través de las proteínas Smads y RhoA, proceso que participa en la generación de MFB que amplifican el proceso de fibrosis.

### ***LA ANGIOTENSINA II REGULA LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL TGF- $\beta$ EN HSC DE RATA***

La AII es un importante regulador de la homeostasis y del balance electrolítico, además de ser un factor de riesgo para la fibrosis hepática. Estudios previos muestran que la isoforma 1 del TGF- $\beta$  puede ser regulada por AII en células mesangiales (Weigert *et al.*, 2002). Desde hace varios años se ha descrito una interrelación entre la AII y el TGF- $\beta$ : en diferentes tipos celulares y condiciones patológicas AII regula la expresión y la activación de TGF- $\beta$ ; así, esta citocina mediaría algunas acciones de la AII (Ruiz-Ortega *et al.*, 2007). El bloqueo de la producción de AII o la activación de sus receptores inhibe la secreción de TGF- $\beta$  y la fibrosis; igualmente al bloquear a TGF- $\beta$  con anticuerpos neutralizantes o con

una mutante de su receptor tipo II, la AII ya no es capaz de modular eficientemente la síntesis de ECM.

El TGF- $\beta$  tiene 3 isoformas (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3), siendo la más estudiada TGF- $\beta$ 1 y poco se conoce de las acciones de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. La diferencia más clara entre ellas, es su expresión regulada de forma tejido-específica, y en el desarrollo embrionario en distintas etapas (*Roberts, 1998*). De hecho cada isoforma puede inducir la expresión de las otras dos, por lo que se cree que las acciones de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 parecen ser mediadas por el TGF- $\beta$ 1; ya que al adicionar un anticuerpo específico contra la isoforma 1, el 80% de las acciones de TGF- $\beta$ 3 disminuyen (*Yu et al., 2003*).

El papel de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 en la fibrosis ha sido poco estudiado y al parecer no existen diferencias importantes entre ellas, en experimentos *in vitro* con células de riñón las 3 isoformas se comportan de la misma manera: regulan el recambio de la ECM, es decir aumentan su síntesis y reducen su degradación, y además la combinación de las 3 isoformas tiene un efecto aditivo (*Yu et al., 2003*), aunque poco se sabe de su efecto *in vivo*. La concentración de TGF- $\beta$ 1 aumenta en la mayoría de las patologías inflamatorias, tanto en su forma activa como latente, y en muchos casos de manera muy similar el TGF- $\beta$ 2 también aumenta. En cambio la expresión de TGF- $\beta$ 3 varía: su expresión es baja en reparación tisular y en la enfermedad de Crohn, permanece igual (aunque en concentraciones altas) en artritis reumatoide y colitis ulcerativa, mientras que su expresión aumenta en nefropatía diabética, de hecho se piensa que TGF- $\beta$ 3 tiene efectos antifibróticos (*Pohlers et al., 2009*). Aunque las 3 isoformas tienen efectos similares en la expresión de ECM, existen variaciones entre ellas en cuanto a su acción antiproliferativa en queratinocitos 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*). Mientras que en procesos de reparación de epitelio bronquial, TGF- $\beta$ 1 es la isoforma principal en la migración celular y no el TGF- $\beta$ 2, pero ambas se producen cuando inician los mecanismos de reparación tisular (*Howat et al., 2002*).

Estos antecedentes nos dan un indicio de las acciones de las isoformas del TGF- $\beta$ , por lo tanto es importante evaluar la producción de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 en hígado, ya que ambas isoformas podrían estar participando en la amplificación del evento fibrogénico en el hígado.

Como observamos en este estudio, en las HSC de rata, la AII es capaz de modular la transcripción de los RNAm de las isoformas 2 y 3 del TGF- $\beta$  a diferentes tiempos. En procesos de reparación de epidermis de ratón se ha estudiado un poco más la regulación de estas isoformas, éstas se regulan de manera



diferente conforme pasa el tiempo de reparación. La primera en ser regulada es el TGF- $\beta$ 1 a partir del día 1° hasta el 5° cuando sus niveles bajan, y a partir del día 3 tanto TGF- $\beta$ 2 como TGF- $\beta$ 3 aumentan sus niveles (hasta 12 veces con respecto al control) lo que coincide con la re-epitelización del tejido (*Frank et al., 1996*).

En HSCs activadas, el TGF- $\beta$ 3 es la primera isoforma en ser expresada por la señalización de AII, seguida del TGF- $\beta$ 2 a partir de las 6 h, pero curiosamente la isoforma 1 no parece ser regulada positivamente por 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 diversos sitios regulatorios los cuales pueden ser activados por genes de respuesta temprana: presenta varias cajas GC que son sitios de unión para SP1 y Zf9/CBP, sitios para AP-1, entre otros; aunque en este estudio solo se observa una ligera regulación positiva de esta isoforma por AII. El TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, 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, además están altamente conservados entre especies (*Roberts, 1998*). En el promotor de TGF- $\beta$ 2 existen motivos E-box, elementos de unión para USF1 y USF2, y a diferencia de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 no es regulado por SP-1 (*O'Reilly et al., 1992*). Mientras que en TGF- $\beta$ 3, se presentan sitios para AP-2 y SP-1 además del ya mencionado CRE (*Lafyatis et al., 1990*). 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*).

En un hígado normal, las HSC se encuentran en un estado quiescente y cuando existe un proceso inflamatorio se activan y empiezan a proliferar y producir gran cantidad de factores. Las HSC activadas son una de las células más importantes en el proceso fibrogénico, ya que son las principales productoras de factores proinflamatorios y de componentes de matriz. Debido a esto, las HSC se encuentran entre los diversos blancos de estudio para el tratamiento de la fibrosis hepática (*Bedossa et al., 2003; Lotersztajn et al., 2004*). En este estudio observamos que en un estado quiescente o activado, AII es capaz de regular positivamente la transcripción de las isoformas TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. En su estado quiescente las HSC no son responsivas a muchas citocinas (*Wei et al., 2001*), y también es el caso de AII, donde en HSC quiescentes AII no puede inducir proliferación ni la contracción celulares (*Bataller et al., 2000*); pero nuestros resultados muestran que responden a AII al regular al TGF- $\beta$  y activar la vía de ERK.

La regulación de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 por AII en HSC de rata necesita de las vías de señalización de MAPK-ERK y la producción de ROS, ya que al utilizar inhibidores específicos de estas vías se abate la acción de AII. Las ROS, además de ser moléculas dañinas para las células, también se consideran de señalización ya que pueden activar varios factores de transcripción de manera directa o indirecta, como AP-1 y NF- $\kappa$ B, entre otros.

Un aspecto importante en la regulación del TGF- $\beta$  es su disponibilidad como forma activa que pueda unirse a sus receptores y regular sus genes blanco. Las 3 isoformas expresadas en mamíferos del TGF- $\beta$  son sintetizadas como formas latentes que necesitan de la acción de proteasas o de algún otro mecanismo para liberar la forma activa. De hecho, una diferencia entre las 3 isoformas es la secuencia de residuos de aminoácidos del LAP, ya que solo comparten alrededor del 30% de identidad y esto es importante para los mecanismos de liberación de la forma activa. En HSC activadas de rata, observamos que AII puede producir no solo el RNAm de TGF- $\beta$  sino también la forma activa.

Para conocer si las HSC secretaban TGF- $\beta$  activo en respuesta a AII, utilizamos células AD293 que expresan un gen reportero, el 3TP-Lux que se activa en presencia de TGF- $\beta$  ya que contiene sitios de unión para las Smads, una método fácil para detectar la presencia de esta citocina. El medio condicionado en donde se cultivaron y trataron con AII a las HSC, fue capaz de activar al reportero. Esto nos indica que las HSC liberan al TGF- $\beta$  latente en respuesta a AII. Los mecanismos para liberar al TGF- $\beta$  son diversos, pero es posible que las HSC a través de proteasas o por la modificación oxidativa del LAP, se libere al TGF- $\beta$ . En varios estudios se ha demostrado que las ROS pueden liberar al TGF- $\beta$  de su complejo latente al oxidar a LAP y al activar indirectamente a MMP-2 y MMP-9 (*Liu et al., 2010*), y al realizar estudios con antioxidantes o con enzimas que metabolizan a las ROS, la activación o liberación del TGF- $\beta$  fue abatida. En el presente estudio, al utilizar inhibidores de la Nox en las HSC tratadas con AII, se observa una reducción de la liberación de TGF- $\beta$ ; así que podemos concluir que las ROS participan en la producción de TGF- $\beta$  tanto en la transcripción como en la producción de la forma activa.

Las HSC al transdiferenciarse en MFB constituyen la principal fuente de ECM; aunque existe la hipótesis de que algunas células hepáticas pueden sufrir una EMT y ayudar al proceso de fibrogenesis (*Kalluri & Weinberg, 2009*). Este proceso es reconocido ampliamente en desarrollo embrionario y en cáncer (*Hay, 2005*). El TGF- $\beta$  es el principal inductor de esta transformación, a través de la regulación epigenética por las Smads; aunque también a través de vías como MAPK y RhoA. En nuestro estudio evaluamos nuevos efectores de la señalización por TGF- $\beta$  en un modelo de EMT específicamente de tipo 3, ya que aunque

ahora se reconocen tres tipos de EMT, es notable la similitud entre los procesos, lo que sugiere un mismo mecanismo (Weinberg, 2007), aunado a la facilidad de estudiar EMT *in vitro*. Seguir la EMT *in vivo*, es un proceso complicado, reportes recientes hacen uso de ratones transgénicos para seguir la transformación celular durante la fibrosis hepática, aunque han sido muy controversiales los marcadores de EMT utilizados (FSP-1, albúmina, colágena I) y la observación de cambios morfológicos en los hepatocitos (Kaimori *et al.*, 2007; Zeisberg *et al.*, 2007; Taura *et al.*, 2010).

### ***PARTICIPACIÓN DE Ga13 EN LA ACTIVACIÓN DE RHOA POR TGF-β EN UN MODELO DE EMT***

El TGF-β, principal inductor de EMT, puede activar vías de señalización alternas que ayudan a regular sus acciones. Dependiendo del contexto celular, el TGF-β puede activar la vía de MAPK: ERKs, JNK y p38; GTPasas como Ras, RhoA, Rac y Cdc42, y la vía de PI3K y su efector Akt (Derynck *et al.*, 2003; Moustakas & Heldin, 2005). Nuestros estudios preliminares muestran que las células A549 son un buen modelo de EMT que concuerdan con lo ya publicado (Kim *et al.*, 2007). Estas células al ser tratadas con TGF-β por periodos largos pierden su morfología epitelial y se transforman en células tipo fibroblasto, pierden la expresión de E-caderina y expresan al correpresor Snail. Además, RhoA parece ser importante en los cambios morfológicos. La importancia de la señalización de la GTPasa RhoA en la transformación epitelial en NmuMG, inducida por TGF-β fue demostrada por Bhowmick y col. (2002); ya que al bloquear la señal de JNK, Rac y RhoA, solo esta última proteína era importante, junto con las Smads, para los efectos de TGF-β. En un modelo de diferenciación de músculo liso vascular por TGF-β, la inhibición de la actividad de RhoA bloquea los efectos de TGF-β particularmente inhibiendo a la fosforilación de las Smads y su translocación al núcleo (Chen *et al.*, 2006).

La activación de las GTPasas de la familia de RhoA se da a través de los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina o RhoGEFs. Hasta la fecha, no se conoce como los receptores a TGF-β pueden activar a RhoA. En las células A549, TGF-β activa a RhoA de manera rápida, 5 min, lo que sugiere que es de una forma directa por los receptores y no por regulación transcripcional. La activación de RhoA a tiempos largos, concuerda con la aparición de fibras de estrés en estas células (figura 11). Mientras que la cinética rápida de activación sugiere que algún efector que activa a RhoA podría estar asociado a los receptores. Recientemente se ha demostrado que RhoA no solo participa en la remodelación del citoesqueleto, sino que también es capaz de activar factores de transcripción como los factores relacionados a miocardina (MRFT), y de manera particular junto con Smad3 pueden regular la EMT a través de la regulación del gen *slug* un factor perteneciente a la misma familia que Snail. Otra vía alterna activada por TGF-β que se observó en las células A549, fue la vía de ERK. Esta vía junto con RhoA ayudan a regular

las acciones de TGF- $\beta$  en EMT (Zavadil & Böttinger, 2005) al inducir genes del citoesqueleto y de matriz extracelular. Dada la diversidad de GEFs para Rho y la regulación de la actividad de los mismos, podría plantearse que la activación de estas vías alternas junto con las proteínas Smads, podrían modular la actividad de estas GEFs. Por ejemplo, la fosforilación de fosfoinosítidos por PI3K podría ser importante al reclutar GEFs hacia la membrana plasmática.

En este estudio, en las células A549 ambas vías son activadas por TGF- $\beta$  independientemente de la actividad de cinasa de T $\beta$ RI, por lo tanto algún otro efector esta involucrado en esta activación. Dependiendo el tipo celular, la activación de vías alternas es dependiente de la cinasa de T $\beta$ RI (Lee *et al.*, 2007) o puede ser independiente (Han *et al.*, 2005), estas diferencias radican en el tipo celular estudiado. En su estudio Han y col., observan que la activación de Rac, RhoA y MAPK por TGF- $\beta$  en un modelo de EMT es independiente de la activación de T $\beta$ RI, estas vías contribuyen al incremento de la migración celular pero no a la transformación epitelial. Así, tanto las vías T $\beta$ RI/smads y vías alternas (Rho, Rac y MAPK) participan en el proceso de EMT inducido por TGF- $\beta$ : en la reprogramación epigenética y en la alta tasa de motilidad celular. Las vías alternas activadas por los receptores a TGF- $\beta$  en diversos tipos celulares dependen de la actividad de cinasa del receptor tipo I, pero en algunas otras líneas celulares los receptores están asociados a integrinas o moléculas de adhesión que reclutan diversas proteínas para la activación de vías alternas. Por ejemplo, en células de cáncer de mama 4T1 la integrina  $\beta$ 3 interactúa físicamente con el receptor tipo II de TGF $\beta$ , permitiendo que la cinasa Src fosforile al receptor en la tirosina 284, subsecuentemente, esta fosforilación permite el reclutamiento de proteínas adaptadoras como Grb2 y ShcA lo que conlleva a la activación de MAPK (Gallier *et al.*, 2007).

Estudios recientes han demostrado nuevas interacciones de los receptores con efectores que activan estos módulos de señalización (Lee *et al.*, 2007, Sorrentino *et al.*, 2008). Con base en los estudios publicados por Barros-Rodiles y col. (2005), la base de datos Lumier representa una herramienta útil para encontrar nuevas interacciones dentro de la vía de señalización de TGF- $\beta$ . En sus datos se predice que la proteína G $\alpha$ 13 puede interactuar con el receptor tipo I T $\beta$ RI de TGF- $\beta$ , aunque sus valores relativos de interacción son bajos comparados con los valores de otras interacciones (ver tabla IV).

Nuestros resultados indican que en células AD293 transfectadas con G $\alpha$ 13wt o G $\alpha$ 13QL (constitutivamente activa), los receptores a TGF- $\beta$  pueden interactuar con esta proteína, independientemente del estado de activación de G $\alpha$ 13. Incluso el estado de activación de T $\beta$ RI tampoco parece ser importante, ya que cuando se utiliza el inhibidor de la actividad de cinasa de T $\beta$ RI, la

interacción de ambos componentes no cambia. En varios estudios se ha resaltado el papel de cinasa de T $\beta$ RI en la activación de vías alternas como por ejemplo la vía de ERK: al fosforilar y reclutar ShcA para activar a Ras (Lee *et al.*, 2007) o al utilizar inhibidores específicos para T $\beta$ RI que también bloquean la activación de ERK (DaCosta Byfield *et al.*, 2004). Aunque hay algunos reportes donde la activación de p38 es independiente de la cinasa del receptor T $\beta$ RI, principalmente a través del reclutamiento de la ligasa TRAF6 y la ubiquitinación de TAK1 (Sorrentino *et al.*, 2008).

La vía de señalización de G $\alpha$ 13 incluye la activación de RhoA a través de la familia de RhoGEFs que contienen dominios RGS: PDZ, p115 y LARG. Para analizar los efectos de TGF- $\beta$  sobre G $\alpha$ 13, en células AD293 evaluamos la activación de RhoA, pero no encontramos ningún efecto del TGF- $\beta$  sobre esta GTPasa en estas células,; en cambio en las células A549 encontramos una activación de RhoA por TGF- $\beta$  y también observamos la interacción de los receptores con G $\alpha$ 13. Un estudio de Lee y col. (2009), demuestra que la familia de G $\alpha$ 12/13 y la activación de la vía de RhoA y Rac, es necesaria para activar al gen de *tgf- $\beta$ 1* por la misma señal de TGF- $\beta$  en fibroblastos embrionarios y HSC de ratón. Pero curiosamente, el TGF- $\beta$  no activa a G $\alpha$ 12/13. Este reporte confirma la importancia de nuestro hallazgo y por lo tanto es necesario realizar más estudios sobre la interacción entre los receptores a TGF- $\beta$  y G $\alpha$ 13, posiblemente en otro modelo celular.

La interacción de G $\alpha$ 13 con los receptores a TGF- $\beta$  podría ser una vía de activación de RhoA en nuestro modelo de EMT. Es importante mencionar que encontramos esta interacción de manera endógena en células A549 y en nuestros resultados preliminares se muestra que los RhoGEFs PDZ y LARG, también están involucrados en la activación de RhoA. Es necesario profundizar en este hallazgo ya que no se conocen con detalle los efectos de la activación de RhoA por TGF- $\beta$  y sus implicaciones en la transformación epitelial.

## VIII. CONCLUSIONES

En el presente trabajo, observamos que:

1) la AII regula positivamente a las 3 isoformas del TGF- $\beta$  e induce su activación en cultivos de HSC activadas (MFB). La regulación positiva de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 por AII, podría representar la amplificación del proceso fibrogénico en el hígado. Si tomamos en cuenta que el TGF- $\beta$  también regula la transformación epitelial (EMT), esta citocina participaría en la generación de más MFB modulando así otro aspecto del proceso fibrogénico.

2) El TGF- $\beta$  a través de las Smads y de la activación de otras vías de señalización regula la síntesis de ECM y la EMT, en este trabajo encontramos un nuevo efector en su señalización que interactúa directamente con los receptores, la proteína G $\alpha$ 13.

## 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 al 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.
- El papel de RhoA en la señalización de TGF- $\beta$  ha sido demostrado en varios reportes, junto con las Smads ayuda a regular genes en la transformación epitelial, además es uno de los principales reguladores del citoesqueleto. Pero aun no se conoce con detalle como los receptores a TGF- $\beta$  inducen su activación. En este trabajo, describimos que G $\alpha$ 13, quien regula a RhoGEFs con dominios RGS, interacciona con los receptores a TGF- $\beta$  en un modelo de transformación epitelial. Se necesitaran más estudios para comprobar esta interacción y la importancia de esta en EMT.

## X. REFERENCIAS

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York: Garland Science.
2. Ando S, Otani H, Yagi Y, Kawai K, Araki H, Fukuhara S, Inagaki C (2007). Proteinase-activated receptor 4 stimulation-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells. *Respir Res* 8:31.
3. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB (2003). Making sense of latent TGF- $\beta$  activation. *J Cell Sci*. 116, 217–224.
4. Bataller R, Gabele E, Schoonhoven R, Morris T, Lehnert M, Yang L, Brenner DA, Rippe RA (2003a). Prolonged infusion of angiotensin II into normal rats induces stellate cell activation and proinflammatory events in liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285(3):G642-51.
5. Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbis MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J (2000). Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 118(6):1149-56.
6. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, Qian T, Schoonhoven R, Hagedorn CH, Lemasters JJ, Brenner DA (2003b). NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 112(9):1383-94.
7. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005 Feb;115(2):209-18.
8. Bedard K, Krause K-H (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245-313.
9. Bedossa P, Paradis V (2003). Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol* 200(4):504-15.
10. Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL, Moses HL (2001). Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12(1):27-36.
11. Blomhoff R, Wake K (1991). Perinusoidal cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J* 5(3): 271-277.
12. Border WA, Noble NA (1997). TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int* 51(5):1388-96.
13. Bosch J, Arroyo V, Betriu A, Mas A, Carrilho F, Rivera F, Navarro-Lopez F, Rodes (1980) J. Hepatic hemodynamics and the renin angiotensin system in cirrhosis. *Gastroenterology* 78(1): 92–9.
14. Bottari SP, de Gasparo M, Steckelings UM, Levens NR. Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications. *Front Neuroendocrinol*. 1993 Apr;14(2):123-71.
15. Boyer AS, Erickson CP, Runyan RB (1999). Epithelial-mesenchymal transformation in the embryonic heart is mediated through distinct pertussis toxin-sensitive and TGFbeta signal transduction mechanisms. *Dev Dyn* 214(1):81-91.
16. Branton MH, Kopp JB (1999). TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect* 1(15):1349–1365.
17. Chen S, Crawford M, Day RM, Briones VR, Leader JE, Jose PA, Lechleider RJ (2006). RhoA Modulates Smad Signaling during Transforming Growth Factor- $\beta$ -induced Smooth Muscle Differentiation. *J Biol Chem* 281(3): 1765–1770.
18. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E (2005). Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit* 11(6):RA194-205.
19. Chang H, Brown CW, Matzuk MM (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 23(6):787-823.
20. DaCosta Byfield S, Major C, Laping NJ, Roberts AB (2004). SB-505124 is a selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* 65(3):744-52.
21. de Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors (2004). *Cytokine Growth Factor Rev* 15(1):1-11.
22. Derynck R, Zhang YE (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature* 425(6958):577-84.
23. Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME (2001). Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)* 100(5):481-92.
24. Dorsky RI, Moon RT, Raible DW (2000). Environmental signals and cell fate specification in premigratory neural crest. *Bioessays* 22(8):708-16.
25. Ellenbroek SI, Collard JG (2007). Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis* 24(8):657-72.
26. Frank S, Madlener M, Werner S (1996). Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 271(17):10188-93.
27. Friedman SL (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275(4):2247-50.

28. Fukuhara S, Chikumi H, Gutkind JS (2001). RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene* 20:1661-8.
29. Galliher AJ, Schiemann WP (2007). Src phosphorylates Tyr284 in TGF-beta type II receptor and regulates TGF-beta stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Res* 67(8):3752-8
30. Ganong, W (2002). Fisiología médica. México: El Manual Moderno.
31. Gotzmann J, Huber H, Thallinger C, Wolschek M, Jansen B, Schulte-Hermann R, Beug H, Mikulits W (2002). Hepatocytes convert to a fibroblastoid phenotype through the cooperation of TGF- $\beta$ 1 and Ha-Ras: steps towards invasiveness. *J Cell Sci* 15;115(Pt 6):1189-202.
32. Gressner AM, Weiskirchen R (2006). Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 10(1):76-99.
33. Gressner OA, Rizk MS, Kovalenko E, Weiskirchen R, Gressner AM (2008). Changing the pathogenetic roadmap of liver fibrosis? Where did it start; where will it go? *J Gastroenterol Hepatol* 23(7 Pt 1):1024-35.
34. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140(6):883-99.
35. Guarino M, Tosoni A, Nebuloni M (2009). Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol* 40(10):1365-76.
36. Hains MD, Siderovski DP, Harden TK (2004). Application of RGS box proteins to evaluate G-protein selectivity in receptor-promoted signaling. *Methods Enzymol* 389:71-88
37. Han G, Lu SL, Li AG, He W, Corless CL, Kulesz-Martin M, Wang XJ (2005). Distinct mechanisms of TGF-beta1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis. *J Clin Invest* 115(7):1714-23
38. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 29(Pt 2):345-50.
39. Hay E (2005). The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* 233(3):706-20.
40. Hernández-Fonseca K, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J, Massieu L (2008). Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 86(8):1768-80
41. Herpin A, Lelong C, Favrel P (2004). Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp Immunol* 28(5):461-85.
42. Howat WJ, Holgate ST, Lackie PM (2002). TGF-beta isoform release and activation during in vitro bronchial epithelial wound repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282(1):L115-23.
43. Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, Beug H, Grünert S (2002). Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol* 156(2):299-313.
44. Kaimori A, Potter J, Kaimori JY, Wang C, Mezey E, Koteish A (2007). Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 282(30):22089-101.
45. Kalluri R, Weinberg RA (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119(6):1420-8.
46. Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z (2005). TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res* 9;6:56.
47. Kim JH, Jang YS, Eom KS, Hwang YI, Kang HR, Jang SH, Kim CH, Park YB, Lee MG, Hyun IG, Jung KS, Kim DG (2007). Transforming growth factor beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition of A549 cells. *J Korean Med Sci* 22(5):898-904.
48. Kelly P, Casey PJ, Meigs TE (2007). Biologic functions of the G12 subfamily of heterotrimeric g proteins: growth, migration, and metastasis. *Biochemistry* 46(23):6677-87.
49. Kinbara T, Shirasaki F, Kawara S, Inagaki Y, de Crombrughe C, Takehara K (2002). Transforming growth factor-beta isoforms differently stimulate proalpha2 (I) collagen gene expression during wound healing process in transgenic. *J Cell Physiol* 190(3):375-81.
50. Kurikawa N, Suga M, Kuroda S, Yamada K, Ishikawa H (2003). An angiotensin II type 1 receptor antagonist, olmesartan medoxomil, improves experimental liver fibrosis by suppression of proliferation and collagen synthesis in activated hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol* 139(6):1085-94.
51. Lafyatis R, Lechleider R, Kim SJ, Jakowlew S, Roberts AB, Sporn MB (1990). Structural and functional characterization of the transforming growth factor beta 3 promoter. A cAMP-responsive element regulates basal and induced transcription. *J Biol Chem* 265(31):19128-36.
52. Laverty HG, Wakefield LM, Occlleston NL, O'Kane S, Ferguson MWJ (2009). TGF-b3 and cancer: A review. *Cytokine Growth Factor Rev* 20:305-317.
53. Leask A, Abraham DJ (2004). TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 18(7):816-27.
54. Lee MK, Pardoux C, Hall MC, Lee PS, Warburton D, Qing J, Smith SM, Derynck R (2007). TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J* 26(17):3957-67.
55. Lee SJ, Yang JW, Cho IJ, Kim WD, Cho MK, Lee CH, Kim SG (2009). The gep oncogenes, Galpha(12) and Galpha(13), upregulate the transforming growth factor-beta1 gene. *Oncogene* 28(9):1230-40.



56. Liu RM, Gaston Pravia KA (2010). Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med* 48(1):1-15.
57. López-Casillas F (1998). El lado oscuro y el lado brillante del TGF- $\beta$ . Mensaje bioquímico XXII 137-161.
58. López-Novoa JM, Nieto MA (2009). Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med* 1(6-7):303-14.
59. Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, Grenard P, Mallat A (2005). Hepatic Fibrosis: Molecular mechanisms and Drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 605-28.
60. Lu D, Giguere V (2001). Requirement of Ras-dependent pathways for activation of the transforming growth factor beta3 promoter by estradiol. *Endocrinology* 142(2):751-9.
61. Malliri A, Collard JG (2003). Role of Rho-family proteins in cell adhesion and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 15(5):583-9.
62. Massagué J, Attisano L, Wrana JL (1994). The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 4(5):172-8.
63. Massagué J (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-91.
64. Mehra A, Wrana JL (2002). TGF- $\beta$  and the Smad signal transduction pathway. *Biochem Cell Biol* 80(5):605-22.
65. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J (2001). Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 38(3 Pt 2):635-8.
66. Mizuarai S, Yamanaka K, Kotani H (2006). Mutant p53 induces the GEF-H1 oncogene, a guanine nucleotide exchange factor-H1 for RhoA, resulting in accelerated cell proliferation in tumor cells. *Cancer Res* 66(12):6319-26.
67. Moustakas A, Heldin CH (2005). Non-Smads TGF- $\beta$  signals. *J Cell Sci* 118(Pt 16):3573-84.
68. Nawshad A, LaGamba D, Hay ED. Transforming growth factor beta (TGFbeta) signalling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT) (2004). *Arch Oral Biol* 49(9):675-89.
69. Neilson EG (2007). Plasticity, nuclear diapause, and a requiem for the terminal differentiation of epithelia. *J Am Soc Nephrol* 18(7):1995-8.
70. O'Kane S, Ferguson MW (1997). Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 29(1):63-78.
71. O'Reilly MA, Geiser AG, Kim SJ, Bruggeman LA, Luu AX, Roberts AB, Sporn MB (1992). Identification of an activating transcription factor (ATF) binding site in the human transforming growth factor-beta 2 promoter. *J Biol Chem* 267(28):19938-43.
72. Oft M, Akhurst RJ, Balmain A (2002). Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels. *Nat Cell Biol* 4(7):487-94.
73. Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL (2005). Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 307(5715):1603-9.
74. Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW, Wolf G (2009). TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta* 1792(8):746-56.
75. Parola M, Pinzani M (2009). Hepatic wound repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2(1):4.
76. Quilliam LA, Rebhun JF, Castro AF (2002). A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 71:391-444.
77. Ratzliff V., Friedman S (1997). Pathobiology of Hepatic Stellate Cells. En: "Functional heterogeneity of liver tissue: from cell lineage to sublobular compartment-specific pathogenesis". Texas, EU: Vidal-Vanaclocha F. RG Landes Company and Chapman & Hall.
78. Roberts AB (1998). Molecular and Cell biology of TGF- $\beta$ . *Miner Electrolyte Metab* 24(2-3):111-9.
79. Savagner P (2001). Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 23(10):912-23.
80. Schiller MR (2006). Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases-GEFs what's the link. *Cell Signal* 18(11):1834-43.
81. Shen X, Li J, Hu PP, Waddell D, Zhang J, Wang XF (2001). The activity of guanine exchange factor NET1 is essential for transforming growth factor-beta-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem* 276(18):15362-8.
82. Shi Y, Massagué J (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113(6):685-700.
83. Sorrentino A, Thakur N, Grimsby S, Marcusson A, von Bulow V, Schuster N, Zhang S, Heldin CH, Landström M (2008). The type I TGF- $\beta$  receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat Cell Biol* 10(10):119-1207.
84. Taura K, Miura K, Iwaisako K, Österreicher CH, Kodama Y, Penz-Österreicher M, Brenner DA (2010). Hepatocytes Do Not Undergo Epithelial-Mesenchymal Transition in Liver Fibrosis in Mice. *Hepatology* 51:1027-1036.
85. Thiery JP (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 15(6):740-6.

86. Ueki M, Koda M, Yamamoto S, Matsunaga Y, Murawaki Y (2006). Preventive and therapeutic effects of angiotensin II type 1 receptor blocker on hepatic fibrosis induced by bile duct ligation in rats. *J Gastroenterol* 41: 996–1004.
87. Vázquez-Prado J, Basile J, Gutkind JS (2004). Modular architecture and novel protein-protein interactions regulating the RGS-containing Rho guanine nucleotide exchange factors. *Methods Enzymol.* 390:259-85.
88. Warner FJ, Lubel JS, McCaughan GW, Angus PW (2007). Liver fibrosis: a balance of ACEs? *Clin Sci (Lond)* 113(3):109-18.
89. Wei H, Lu H, Li D, Zhan Y, Wang Z, Huang X (2001). The expression of AT1 receptor on hepatic stellate cells in rat fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>. *Chin Med J (Engl)* 114(6):583-7.
90. Weigert C, Brodbeck K, Klopfer K, Häring HU, Schleicher ED (2002). Angiotensin II induces human TGF-beta 1 promoter activation: similarity to hyperglycaemia. *Diabetologia* 45(6):890-8.
91. Weinberg RA (2007). *The biology of Cancer*. NY: Garland Science.
92. Wu LL, Cox A, Roe CJ, Dziadek M, Cooper ME, Gilbert RE (1997). Transforming growth factor beta 1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Kidney Int* 51(5):1553-67.
93. Yamada T, Kuno A, Masuda K, Ogawa K, Sogawa M, Nakamura S, Ando T, Sano H, Nakazawa T, Ohara H, Nomura T, Joh T, Itoh M (2003). Candesartan, an angiotensin II receptor antagonist, suppresses pancreatic inflammation and fibrosis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 307(1):17-23.
94. Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS (2004). Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 3(12):1011-22.
95. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H (2001). Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 34(4 Pt 1):745-50.
96. Yu L, Border WA, Huang Y, Noble NA (2003). TGF-beta isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int* 64(3):844-856.
97. Zavadil J, Böttinger EP (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24(37):5764-5774.
98. Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang YC, Massimi A, Kneitz S, Piek E, Bottinger EP (2001). Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(12):6686-6691.
99. Zeisberg M, Neilson EG (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119(6):1429-37.
100. Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R (2007). Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 282(32):23337-47.
101. Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokoloski EA, Levine RL, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B (2005). Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. April 19; 102(16): 5727–5732.

## ANEXO

**Paola Moreno-Alvarez, Marcela Sosa-Garrocho, Claudia González-Espinosa, Jaciel Medina-Tamayo, Eduardo Molina-Jijón, José Pedraza-Chaverri, and Marina Macías-Silva (2010). Angiotensin II increases mRNA levels of all TGF- $\beta$  isoforms in quiescent and activated Rat Hepatic Stellate Cells. *Cell Biology International* (En prensa).**

# Angiotensin II increases mRNA levels of all TGF- $\beta$ isoforms in quiescent and activated rat hepatic stellate cells

Paola Moreno-Alvarez\*, Marcela Sosa-Garrocho\*, Marco A. Briones-Orta\*, Claudia González-Espinosa†, Jaciel Medina-Tamayo‡, Eduardo Molina-Jijón‡, José Pedraza-Chaverri‡ and Marina Macías-Silva\*<sup>1</sup>

\* Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico

† Departamento de Farmacobiología, Cinvestav-IPN, Sede Sur, México, D.F. 14330, Mexico

‡ Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico

## Abstract

All (angiotensin II) is a vasoactive peptide that plays an important role in the development of liver fibrosis by mainly regulating profibrotic cytokine expression such as TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ). Activated HSCs (hepatic stellate cells) are the major cell type responsible for ECM (extracellular matrix) deposition during liver fibrosis and are also a target for All and TGF- $\beta$  actions. Here, we studied the effect of All on the mRNA levels of TGF- $\beta$  isoforms in primary cultures of rat HSCs. Both quiescent and activated HSCs were stimulated with All for different time periods, and mRNA levels of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 isoforms were evaluated using RNase1 protection assay. The mRNA levels of all TGF- $\beta$  isoforms, particularly TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3, were increased after All treatment in activated HSCs. In addition, activated HSCs were able to produce active TGF- $\beta$  protein after All treatment. The mRNA expression of TGF- $\beta$  isoforms induced by All required both ERK1/2 and Nox (NADPH oxidase) activation but not PKC (protein kinase C) participation. ERK1/2 activation induced by All occurs via AT1 receptors, but independently of either PKC and Nox activation or EGFR (epidermal growth factor receptor) transactivation. Interestingly, All has a similar effect on TGF- $\beta$  expression in quiescent HSCs, although it has a smaller but significant effect on ERK1/2 activation in these cells.

Keywords: angiotensin II; hepatic stellate cell; liver; MAPK; Nox; TGF- $\beta$

## 1. Introduction

All (angiotensin II) is an important octapeptidic hormone of the rennin–angiotensin system that regulates vascular homeostasis as well as renal water and sodium reabsorption. All has multiple cellular actions: it induces cell growth and proliferation and also controls ECM (extracellular matrix) formation in several tissues (De Gasparo et al., 2000). Alterations in All signals are involved in the development of some diseases. For instance, a long-term exposure to All promotes cardiovascular remodelling as well as renal and liver fibrosis mainly by promoting ECM production and deposition (Mezzano et al., 2001; Mehta and Griendling, 2007). All signals through at least four different G protein-coupled receptors: AT1, AT2, AT3 and AT4. AT1 receptors activate several downstream effectors, which include PKC, ERK1/2, p38 and JNK, as well as tyrosine kinases such as Src and JAK (De Gasparo et al., 2000; Mehta and Griendling, 2007; Olivares-Reyes, et al., 2009). Furthermore, All can induce Nox (NADPH oxidase) activation to generate ROS (reactive oxygen species), which are potent modulators of signalling pathways causing hypertension and vessel inflammation (Mehta and Griendling, 2007; Garrido and Griendling, 2009).

In the normal liver, quiescent HSCs (hepatic stellate cells) play an important role in retinoid storage, ECM turnover, and

production of homeostatic factors (Geerts, 2001; Friedman, 2008). In liver fibrosis, HSCs are the major cell type responsible for ECM deposition and inflammatory cytokine production (Friedman, 2000, 2008; Gressner and Weiskirchen, 2006). HSCs undergo a transdifferentiation process known as activation after hepatic injury; activated HSCs lose retinoid, increase  $\alpha$ -sma expression and acquire a myofibroblast phenotype (Friedman, 2000, 2008; Geerts, 2001). Activated HSCs also become responsive to several growth factors and cytokines; for instance, they are contractile in response to endothelin and produce several ECM proteins in response to TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) (Friedman, 2000, 2008; Pinzani and Marra, 2001). Notably, HSCs can also display the activation process when they are cultured for a few days in uncoated plastic dishes, showing phenotypic changes similar to those occurring *in vivo* (Friedman, 2000).

TGF- $\beta$  is a key mediator of liver fibrosis as demonstrated by the presence of high TGF- $\beta$  levels at sites of ECM deposition, the development of fibrosis in animals that overexpress TGF- $\beta$  and the decrease of fibrosis with anti-TGF- $\beta$  therapies (De Bleser et al., 1997; Qi et al., 1999; Schuppan et al., 2003). The increased expression of all three TGF- $\beta$  isoforms in liver cirrhosis suggests all of them may participate in fibrosis development; they also have additive effects regarding ECM production *in vitro* and *in vivo* (Baer et al., 1998; Ledbetter et al., 2000; Yu et al., 2003; Fukumura

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (email mmacias@ifc.unam.mx).

**Abbreviations:** All, angiotensin II; AG, AG1478; BIM, bis-indolylmaleimide; CHX, cycloheximide; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DPI, diphenylene iodonium; ECM, extracellular matrix; EGFR, epidermal growth factor receptor; Et, ethidium; HO-1, heme oxygenase-1; HSCs, hepatic stellate cells; LOS, losartan; NAC, *N*-acetyl-cysteine; Nox, NADPH oxidase; PD, PD123177; PKC, protein kinase C; RAS, rennin–angiotensin system; ROS, reactive oxygen species; RPA, RNase1 protection assay; SB, SB202190; SP, SP600125; STA, staurosporine; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; U0126, 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(methylthio)butadiene.

et al., 2006). Furthermore, the mechanisms involved in the differential expression of TGF- $\beta$  isoforms have been an intriguing issue for a long time, and the regulation of TGF- $\beta$  isoform expression seems to be different depending on stimulus and cell type (O’Kane and Ferguson, 1997; Roberts, 1998; McKaig et al., 2002; Wickert et al., 2002).

All is also an important mediator in liver fibrosis that functions as a proinflammatory factor contributing also to increased ECM synthesis, oxidative stress and the production of proinflammatory cytokines (Warner et al., 2007; Moreno and Bataller, 2008). All serum levels have been found elevated in patients with cirrhosis and chronic hepatitis C (Bosch et al., 1980). In animal models of hepatic fibrosis, prolonged systemic infusion of All induces HSCs activation along with an increase in AT1 receptor content in fibrotic areas (Bataller et al., 2003b). Notably, the inhibition of All production or AT1 receptor blockade with specific antagonists decrease hepatic inflammation and fibrosis, suggesting a direct link between All signal and fibrosis development (Yoshiji et al., 2001; Bataller et al., 2003a; Ueki et al., 2006). Nevertheless, the molecular mechanisms underlying the action of All in hepatic fibrosis are not completely understood.

Several reports indicate that All promotes some of its proinflammatory effects in liver through targeting HSCs (Pinzani and Marra, 2001; Wynn, 2008). Intriguingly, a previous report showed that human activated HSCs are more responsive than human quiescent HSCs to All actions (Bataller et al., 2000), suggesting the absence of All receptors in the quiescent HSCs and a possible up-regulation of AT1 receptor levels during HSC activation (Wei et al., 2001). HSCs are also the target of many profibrogenic cytokines such as TGF- $\beta$  (Hellerbrand et al., 1999; Bataller et al., 2000; Friedman, 2000; Gressner and Weiskirchen, 2006), and some reports suggest a close relationship between All actions and TGF- $\beta$  production in the development of liver fibrosis, suggesting that TGF- $\beta$  can function as a mediator of All profibrogenic actions.

All seems to use different signalling pathways in HSCs such as MAPK and phosphoinositides/ $\text{Ca}^{++}$  pathway activation, and ROS production. Recently, it was described that All induces the activation of a non-phagocytic isoform of Nox in HSCs in order to activate gene transcription of genes related with fibrosis onset (Bataller et al., 2003b). HSCs express key components ( $\text{p}22^{\text{phox}}$ ,  $\text{gp}91^{\text{phox}}$ ,  $\text{p}47^{\text{phox}}$ ,  $\text{p}67^{\text{phox}}$  and Rac) of non-phagocytic forms of Nox (Adachi et al., 2005), mainly Nox1 and Nox2 in HSCs (Bataller et al., 2003b; Adachi et al., 2005; Choi et al., 2006; Bedard and Krause, 2007). Nox is induced during HSCs activation and produces superoxide ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) in response to All; All effects on phosphorylation of the  $\text{p}47^{\text{phox}}$  subunit of Nox, increase of ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) production, and HSCs activation, are blunted in  $\text{p}47^{\text{phox}} -/-$  mice (Bataller et al., 2003b). These  $\text{p}47^{\text{phox}}$  knockout mice show reduced fibrosis after liver injury, disclosing the relevance of Nox pathway (Bataller et al., 2003b). ROS and oxidative stress has been implicated in regulation of tyrosine kinases, expression of inflammatory genes and in the origin of diverse pathologies such as liver fibrosis (Bataller et al., 2003a; Czaja, 2005; De Minicis et al., 2006; Bedard and Krause, 2007; De Minicis and Brenner, 2007). Further, All signalling through AT1 receptors seems to participate in the ROS generation through Nox activation (Bataller et al., 2003b).

Here, we investigate if All regulates the expression of the mRNA of all three TGF- $\beta$  isoforms in quiescent and activated rat HSCs and which signalling pathway is involved. We observed that mRNA levels of all TGF- $\beta$  isoforms are up-regulated by All in both activated and quiescent rat HSCs and that All is able to induce active TGF- $\beta$  secretion from HSCs. Interestingly, TGF- $\beta$  isoform expression induced by All was dependent on ERK1/2 and Nox activation but independent of PKC. We also observed that quiescent HSCs are responsive but less sensitive to All signals in order to activate ERK1/2 than activated HSCs.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Rat HSCs primary culture

HSCs were isolated from male Wistar rats (>500 g) as previously described (Friedman and Roll, 1987). In brief, liver was perfused and digested with 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pronase and 0.15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  collagenase type IV. Liver was then minced and incubated at 37°C for 15 min. The hepatic cell suspension was centrifuged at 21400 rev./min for 40 min through a density gradient of 8.2% Nycodenz. After HSC isolation,  $4\text{--}5 \times 10^6$  cells were cultured in DMEM (Dulbecco’s modified Eagle’s medium) with 10% FBS (fetal bovine serum) plus 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin and 0.1 mg/ml gentamicin. HSC cultured for 2 days maintained a quiescent phenotype, whereas after 7 to 13 days of primary culture, they were activated and transdifferentiated to myofibroblast (Ballardini et al., 1988). Animals were maintained and used following the Federal Regulations for Animal Experimentation and Care (Ministry of Agriculture, SAGARPA, Mexico).

### 2.2. Western blotting

Whole-cell protein extracts were obtained from cells lysed in TNTE buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 5 mM EDTA) containing a protease- and phosphatase-inhibitor cocktail. Total protein (25  $\mu\text{g}$ ) was separated by SDS/PAGE and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked with 5% fat-free milk for 1 h and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies (1:1000 dilutions). Membranes were incubated 1 h at room temperature with an HRP (horseradish peroxidase)-linked secondary antibody (1:10000 dilution), followed by detection with enhanced chemiluminescence assay kit. Densitometry was carried out with the Kodak electrophoresis documentation and analysis system (EDAS 290).

### 2.3. RPA (RNaseI protection assay)

Total RNA was isolated from both quiescent and activated HSCs using TRIzol according to the manufacturer’s instructions. In order to accumulate total mRNA yield and decrease its degradation, HSCs were pretreated with 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CHX (cycloheximide) before All stimulation, and TGF- $\beta$  mRNA expression was assessed by RPA as described previously (González-Espinosa et al., 2003). Total RNA was hybridized with commercially available multiprobe template sets. Riboprobes were synthesized with RiboQuant<sup>TM</sup> *in vitro* Transcription



Kit using 100  $\mu\text{Ci}$  of ( $^{33}\text{P}$ )-UTP, and following the manufacturer's protocol (BD Biosciences). Hybridization of 5–10  $\mu\text{g}$  of total RNA and  $10^6$  cpm of labelled probe was incubated in 13  $\mu\text{l}$  of hybridization buffer overnight at  $56^\circ\text{C}$ . RNaseI digestion and subsequent steps were done following manufacturer's instructions. Precipitation of protected fragments was performed in the presence of 1.5  $\mu\text{g}$  of GlycoBlue used as a carrier. Fragment resolution was carried out on a denaturing 6% polyacrylamide gel, followed by autoradiography. Densitometry was obtained by using EDAS 290. Data were normalized using L32 and GAPDH mRNA expression levels as controls.

## 2.4. Luciferase reporter assay

For TGF- $\beta$ -inducible luciferase reporter assay, AD293 cells (human kidney epithelial cells) were transiently transfected with the reporter plasmid 3TP-lux and pCMV/ $\beta$ -gal. Cells were seeded to 50% confluence in 12-well plates and transfected overnight with 0.4  $\mu\text{g}$  DNA per well using the calcium phosphate–DNA precipitation method. To induce the luciferase reporter, cells were treated overnight with 1  $\mu\text{M}$  All or with different TGF- $\beta$  concentrations. In order to determine if All induces active TGF- $\beta$  secretion from HSCs, AD293 cells transfected with the reporter plasmid were treated overnight with conditioned media obtained from activated HSCs cultures previously treated in the absence (control) or the presence of 1  $\mu\text{M}$  All for different time points. Luciferase activity was measured using the luciferase assay system (Promega) in a Turner Biosystems (20/20) luminometer. To determine transfection efficiency,  $\beta$ -galactosidase activity assay was performed as described (Sambrook et al., 1989). The luciferase assay results were normalized for  $\beta$ -galactosidase activity.

## 2.5. Determination of ROS production

The fluorescent marker DHE (dehydroergosterol) was used to measure ROS production, as previously described (Bindokas et al., 1996; Orozco-Ibarra et al., 2009). DHE enters the cells and is oxidized mainly by  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (superoxide) to Et (ethidium) in the cytosol, and then, it is retained within cell nuclei by interacting with DNA, staining the nuclei with a bright red fluorescence. In order to block ROS effects, we used two Nox inhibitors: 1  $\mu\text{M}$  DPI (diphenylene iodonium) and 10  $\mu\text{M}$  APO (apocynin); in addition, we also used 5 mM NAC (*N*-acetyl-cysteine, an antioxidant/radical scavenger). In brief, after activated HSC incubation with All or Nox inhibitors, fluorescent probe was loaded in DMEM without Phenol Red during 20 min. Cells were examined under an epifluorescence microscope (using the fluorescent cubes G-2A (excitation 510 to 560 nm) from Nikon Co. for the Et detection). The intensity of Et fluorescence was measured in five different fields per well per condition in three independent experiments using the NIS elements Imaging software (Nikon Co). Data were normalized as fold increase of fluorescence relative to control.

## 2.6. Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. One-way ANOVA (analysis of variance) was used to calculate statistical significance. A *P* value  $<0.05$  was considered to be significant.

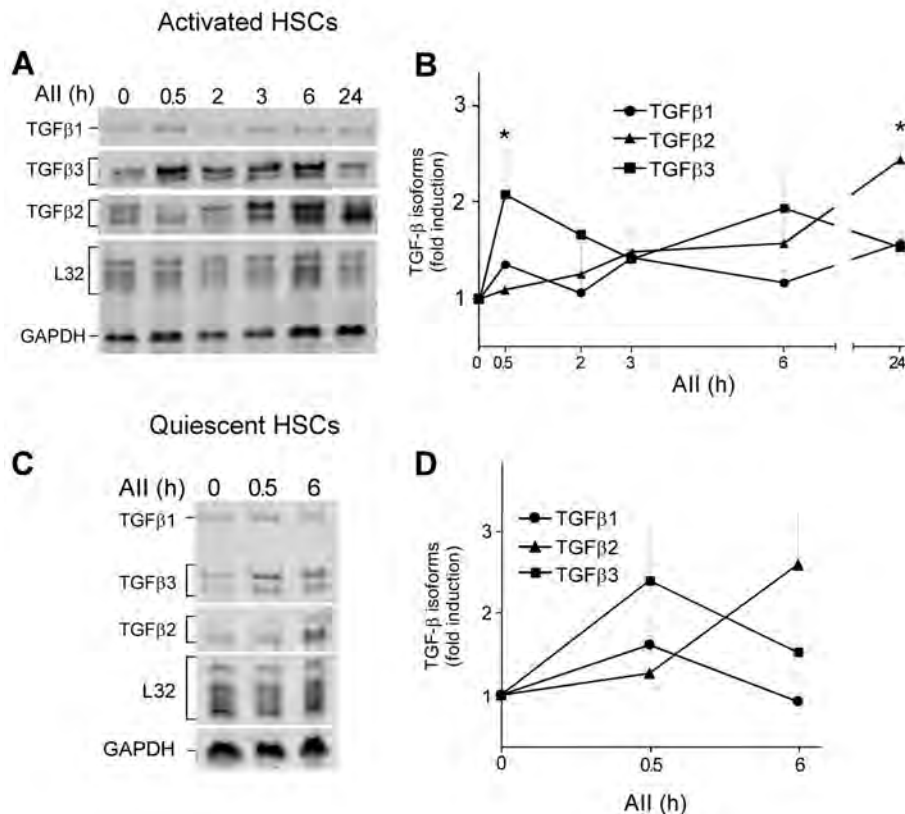
# 3. Results

## 3.1. All increases mRNA levels of TGF- $\beta$ isoforms in rat HSCs

All participates in hepatic fibrosis development probably by up-regulating profibrotic cytokines such as TGF- $\beta$ . Interestingly, because all TGF- $\beta$  isoforms have been involved in the fibrotic process, we were interested in studying if All was able to regulate expression of all TGF- $\beta$  isoforms in HSCs. We pretreated both quiescent and activated HSCs with 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CHX for 20 min, then cells were incubated in the absence (0) or presence of 1  $\mu\text{M}$  All during the indicated time periods (Figure 1). Total RNA was isolated, and TGF- $\beta$  isoform mRNA levels were evaluated by RPA. All increased all TGF- $\beta$  isoforms in activated rat HSCs, although the effect was higher on TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 mRNA levels. TGF- $\beta$ 3 mRNA levels were increased 2.1-fold over basal after All treatment for 30 min ( $P<0.05$ , Figures 1A and 1B), and TGF- $\beta$ 2 mRNA levels gradually increased to reach a peak at 24 h of treatment (2.4-fold over basal). In contrast, TGF- $\beta$ 1 isoform mRNA levels were only slightly increased after 30 min of All treatment. Interestingly, the mRNA levels of all TGF- $\beta$  isoform were also up-regulated by All in quiescent HSCs (Figure 1C); TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3 mRNA levels were increased 1.6- and 2.4-fold over basal, respectively, after 30 min of All treatment, while TGF- $\beta$ 2 mRNA levels were increased 2.6-fold over basal after 6 h of All treatment (Figures 1C and 1D). Data show that All is able to increase the mRNA levels of all three TGF- $\beta$  isoforms in both activated and quiescent HSCs.

## 3.2. All induces the secretion of active TGF- $\beta$ from HSCs

To examine if All was able to induce the secretion of active TGF- $\beta$  from HSCs, serum-deprived activated HSCs were treated in the absence (control) or presence of 1  $\mu\text{M}$  All for different time periods: 30 min, 6 h or 24 h; conditioned media was then recovered from the HSCs culture dishes and used to stimulate AD293 cells transiently transfected with 3TP-lux reporter gene. This reporter contains a TGF- $\beta$ -responsive promoter that drives the expression of luciferase, and it is a very sensitive assay to detect the presence of active TGF- $\beta$  at a low concentration (Macias-Silva et al., 1996). Data showed that all conditioned media, obtained from activated HSCs stimulated with All, contained active TGF- $\beta$ , as they were able to induce 3TP-lux reporter gene expression  $\sim$ 2-fold over control at 30 min ( $P<0.01$ ) in AD293 cells (Figure 2A). TGF- $\beta$  and All treatments were used as a control, and data showed that TGF- $\beta$  increased 3TP-lux expression in a concentration–response manner, the maximal effect was  $\sim$ 10-fold over basal ( $P<0.01$ ), whereas All alone was unable to induce the gene reporter expression in AD293 cells (Figure 2B). We estimated that All induced the secretion of  $\sim$ 10 pM TGF- $\beta$  by comparing the effect of conditioned media with the concentration–response curve for TGF- $\beta$ . This demonstrates that All is able to induce the secretion of active TGF- $\beta$  from activated HSCs.



**Figure 1** All increases TGF- $\beta$  isoform mRNA levels in rat HSCs

TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 isoform mRNA levels are increased by All in both activated HSCs (A and B), and in quiescent HSCs (C and D). Serum-deprived quiescent and activated HSCs were treated with 1  $\mu$ M All for the indicated time periods. Total RNA was isolated, and mRNA levels were evaluated by RPA (A and C). Time course analysis for activated HSCs (B) and quiescent HSCs (D) are shown in graphics. TGF- $\beta$  isoform mRNA levels were normalized using L32 mRNA and then compared with the control. Quantitation of mRNA levels by RPA was assessed using EDAS 290. Data are mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=3$ . \* $P<0.05$  compared with 0 h.

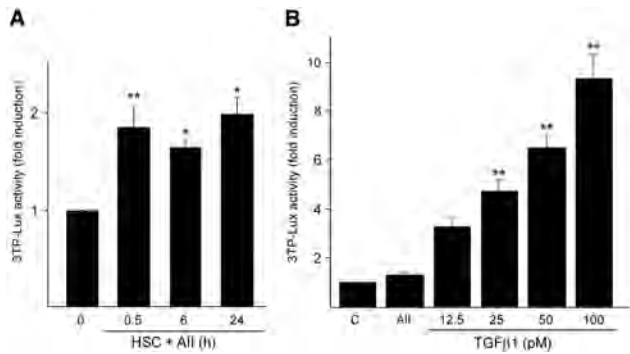
### 3.3. ERK1/2 and Nox pathways are required by All to increase mRNA levels of TGF- $\beta$ isoforms

TGF- $\beta$  isoforms can be up-regulated by different signalling pathways including PKC, ERK1/2, p38 MAPK and Smad pathways (Bascom et al., 1989; Kim et al., 1989, 1990; O'Reilly et al., 1992; Roberts, 1998; Lu and Giguere, 2001; Weigert et al., 2002). Here, we investigated which pathway was used by All to increase mRNA levels of TGF- $\beta$  isoforms in activated HSCs. Cells were pretreated for 30 min with 1  $\mu$ M BIM (bis-indolylmaleimide, a PKC inhibitor), 10  $\mu$ M U0126 [1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(-methylthio)butadiene, a MEK1/2 inhibitor] or 10  $\mu$ M DPI prior to be stimulated with 1  $\mu$ M All for 6 h, the optimal time to detect TGF- $\beta$  mRNA accumulation (see Figure 2), and then total RNA was isolated to analyse TGF- $\beta$  isoform levels by RPA (Figure 3). Data showed that predominantly TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 mRNA levels were increased after All treatment, even in the presence of BIM. Interestingly, the pretreatments with either U0126 or DPI fully blocked All-dependent induction of TGF- $\beta$ -isoform mRNA levels (Figures 3A and 3B). Data showed that All required ERK1/2 and Nox signalling to increase mRNA levels of TGF- $\beta$  isoforms but not PKC activation.

In addition, serum-deprived activated HSCs were pretreated with DPI (1  $\mu$ M), APO (10  $\mu$ M) and NAC (5 mM) 1 h before 1  $\mu$ M All treatment. Conditioned media was then recovered from cell culture dishes and used to stimulate TGF- $\beta$ -responsive 3TP-lux reporter gene expression in transiently transfected AD293 cells (Figure 3C). Data showed that Nox inhibition impairs TGF- $\beta$  secretion induced by All in HSCs. TGF- $\beta$ , All and Nox inhibitor treatments were used as controls to stimulate 3TP-lux reporter gene expression in transiently transfected AD293 cells; we observed that only TGF- $\beta$  was able to induce 3TP-lux expression (Figure 3D). Quantitation of luciferase levels was assessed using a luminometer. Luciferase activity was normalized using  $\beta$ -gal expression, and it was then compared with the control. Data showed that All required Nox activation to induce active TGF- $\beta$  secretion in HSCs.

### 3.4. All increased ROS production via Nox in activated HSC

We tested if ROS production is increased by All and attenuated by Nox inhibitors in HSCs. Serum-deprived HSCs were pretreated with DPI (1  $\mu$ M), APO (10  $\mu$ M) and NAC (5 mM) 30 min before 1  $\mu$ M

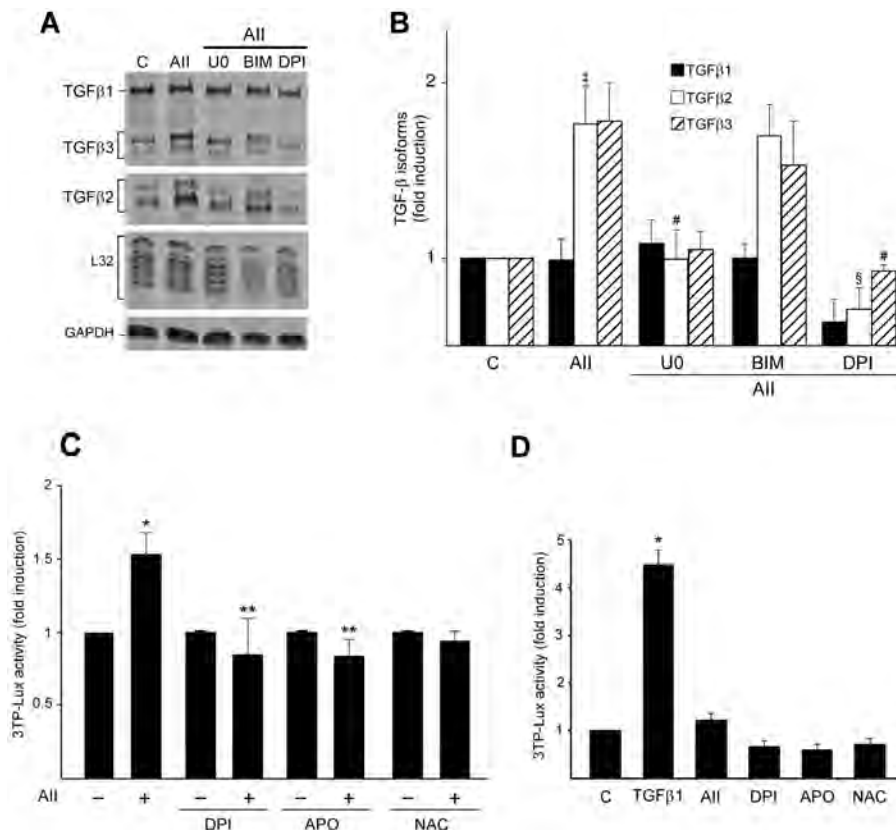


**Figure 2 All induces the secretion of active TGF- $\beta$  in rat activated HSCs**  
**(A)** Serum-deprived activated HSCs were treated with 1  $\mu$ M All for the indicated time periods. Conditioned media was then recovered from cell culture dishes and used to stimulate TGF- $\beta$ -responsive 3TP-lux reporter gene expression in transiently transfected AD293 cells. **(B)** TGF- $\beta$  and All treatments were used as controls to stimulate 3TP-lux reporter gene expression in transiently transfected AD293 cells. Quantitation of luciferase levels was assessed using a luminometer. Luciferase activity was normalized using  $\beta$ -gal expression, and it was then compared with the control [C] without treatment. Data are mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=12$ . \* $P<0.01$  compared with 0 h, \*\* $P<0.05$  compared with 0 h or C.

All treatment. ROS production was assessed 30 min after All treatment, using a fluorescent marker that is mainly oxidized to Et by  $O_2^{\cdot-}$ . Fluorescence in the control condition was normalized to 1 unit, and the change in fluorescence was expressed as fold increase relative to control (Figure 4A). In addition, HO-1 (heme oxygenase-1) protein expression was used as a marker of oxidative stress. Serum-deprived HSCs were pretreated with DPI (1  $\mu$ M) and APO (10  $\mu$ M) 1 h before 1  $\mu$ M All treatment for 12 h, and HO-1 protein levels were assessed by immunoblotting. We detected that HO-1 protein levels were increased by All and attenuated by Nox inhibitors (Figure 4B). Data showed that All induces  $O_2^{\cdot-}$  production and causes oxidative stress in activated rat HSCs.

### 3.5. All induces ERK1/2 phosphorylation in both quiescent and activated HSCs

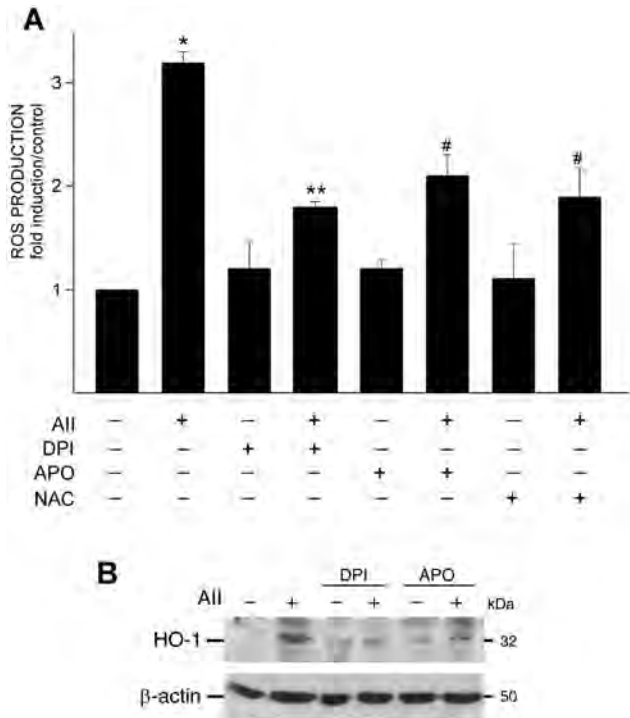
All can activate both PKC and MAPK signalling pathways in activated HSCs (Bataller et al., 2000), but particularly, the ERK1/2 activation induced by All seems to participate in cell proliferation



**Figure 3 ERK1/2 and Nox pathways are required by All to increase TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 mRNA levels**

**(A)** Serum-deprived activated HSCs were pretreated in the absence or presence of 10  $\mu$ M MEK1/2 inhibitor (U0126), 1  $\mu$ M PKC inhibitor (BIM) or 10  $\mu$ M Nox inhibitor (DPI) and then stimulated with 1  $\mu$ M All for the indicated time periods. Total RNA was isolated, and the RPA was performed. Densitometry was assessed using EDAS 290. **(B)** Graphic of the analysis of TGF- $\beta$  isoform mRNA levels with respect to control and normalized with L32 mRNA levels. Data are mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=3$ . ‡ $P<0.05$  compared with control; # $P<0.05$  and § $P<0.01$  compared with All. **(C)** Serum-deprived activated HSCs were treated with DPI (1  $\mu$ M), APO (10  $\mu$ M) and NAC (5 mM) 1 h before 1  $\mu$ M All treatment. Conditioned media was then recovered from cell culture dishes and used to stimulate TGF- $\beta$ -responsive 3TP-lux reporter gene expression in transiently transfected AD293 cells. Data are mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=6$ . \* $P<0.05$  compared with control, \*\* $P<0.01$  compared with All-treated cells. **(D)** TGF- $\beta$ , All and Nox inhibitor treatments were used as controls to stimulate 3TP-lux reporter gene expression in transiently transfected AD293 cells. Quantitation of luciferase levels was assessed using a luminometer. Luciferase activity was normalized using  $\beta$ -gal expression, and it was then compared with the control. Data are mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=3$ . \* $P<0.01$  compared with control.





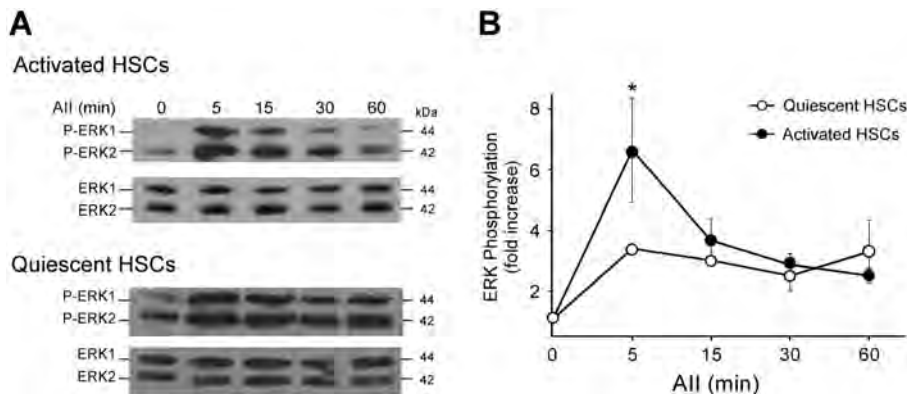
**Figure 4 All induces ROS production via Nox activation in activated rat HSCs** (A) ROS production is increased by All and attenuated by DPI, APO y NAC pretreatment. Serum-deprived HSCs were treated with DPI (1  $\mu$ M), APO (10  $\mu$ M) and NAC (5 mM) 30 min before 1  $\mu$ M All treatment. ROS production was assessed 30 min after All treatment. Quantitative data of Et fluorescence is shown. The intensity of Et fluorescence was measured using an image analyser in five different fields per well per condition in three independent experiments. Fluorescence in the control condition was normalized to 1 unit, and the change in fluorescence was expressed as fold increase relative to control. Data are mean  $\pm$  S.E.M.  $n=3$ . \* $P < 0.01$  compared with control, \*\* $P < 0.01$  and # $P < 0.05$  compared with All-treated cells. (B) HO-1 protein levels were increased by All and attenuated by DPI and APO pretreatment. Serum-deprived HSCs were treated with DPI (1  $\mu$ M) or APO (10  $\mu$ M) 1 h before 1  $\mu$ M All treatment. HO-1 protein levels were assessed 12 h after All treatment by immunoblotting, and  $\beta$ -actin was used as a loading control.

and collagen type I synthesis (Zhang et al., 2003). We investigated if All caused activation of different MAPK pathway such as ERK1/2, p38 and JNK in HSCs. Both quiescent and activated HSCs were incubated in the absence (0) or presence of 1  $\mu$ M All for 5, 15, 30 or 60 min, then cells were lysed, and 25  $\mu$ g of whole-cell protein extracts were analysed by SDS/PAGE and immunoblotting using specific anti-phospho-ERK1/2 or anti-ERK1/2 antibodies. All induced a major activation of ERK1/2 (~6.5-fold over basal) after 5 min of treatment in activated HSCs, whereas it caused a smaller activation of ERK1/2 (~3.3-fold over basal) in quiescent HSCs (Figures 5A and 5B). We observed that All caused activation of different MAPK pathways, although All induced a major activation of ERK1/2 in activated HSCs than in quiescent HSCs. In addition, we observed that All only caused a slight activation of p38 and no JNK activation (data not shown).

Intriguingly, previous reports indicate that All is unable to stimulate cell proliferation and calcium signalling in human quiescent HSCs, suggesting that these cells seems to be insensitive to All (Bataller et al., 2000). In contrast, our data demonstrate that quiescent HSCs are responsive to All but to a lesser extent than activated HSCs, particularly on ERK1/2 activation. In order to test if both quiescent and activated HSCs express AT1 receptor, we performed RT-PCR using total RNA and observed that AT1 as well as AT2 receptor mRNA were expressed in both cell types (data not shown). AT1 mRNA levels were also similar in both cell types, although it remains possible that rat quiescent and activated HSCs express different AT1 protein levels.

### 3.6. All induces ERK1/2 phosphorylation through AT1 receptor but independently of EGFR (epidermal growth factor receptor) transactivation

We used two specific antagonists to identify the All receptor subtype involved in ERK1/2 activation in HSCs: LOS (losartan, an AT1 receptor antagonist) and PD (PD123177, an AT2 receptor



**Figure 5 ERK1/2 phosphorylation induced by All in both quiescent and activated HSCs is time-dependent** (A) Serum-deprived quiescent and activated HSCs were treated with 1  $\mu$ M All for the indicated time periods. Total protein extracts (25  $\mu$ g) was separated by SDS/PAGE, and phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1 and p-ERK2) proteins as well ERK1/2 total protein were detected by immunoblotting using specific antibodies, and densitometry analysis was performed using EDAS 290. ERK1/2 proteins served as loading control. (B) Comparative analysis of time courses of ERK1/2 phosphorylation induced by All in both quiescent and activated HSCs is shown in the graphics. Data are mean  $\pm$  S.E.M.  $n=4$ . \* $P < 0.01$  compared with 0 min.

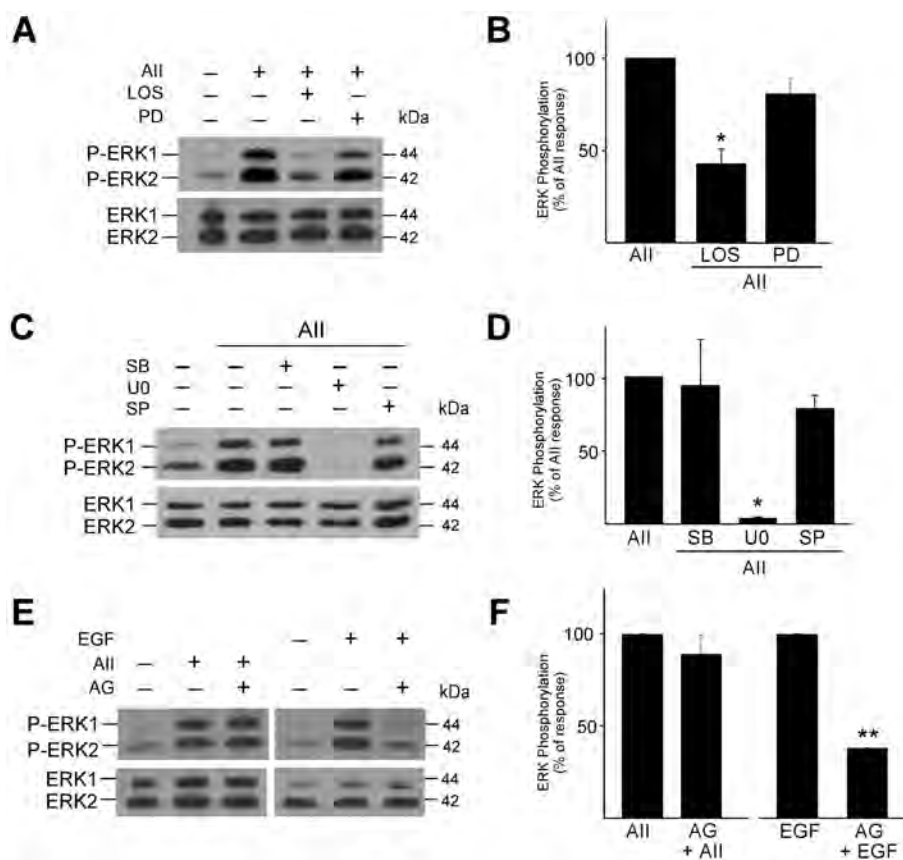
antagonist) (García-Sáinz and Macías-Silva, 1990). Activated HSCs were pretreated in the absence (–) or presence (+) of 10  $\mu$ M LOS or 10  $\mu$ M PD for 20 min, then with 1  $\mu$ M All for 5 min. Cells were lysed, and whole-cell protein extracts were analysed by SDS/PAGE and immunoblotting using specific anti-ERK1/2 and anti-phospho-ERK1/2 antibodies. We observed that only LOS blocked All-induced ERK1/2 activation (Figure 6A). These results show that the AT1 receptor mediates ERK1/2 activation induced by All in activated HSCs.

All is able to activate ERK1/2 in many cell lines by different mechanisms, such as EGFR transactivation, PKC activation or through calcium-dependent tyrosine kinases (Zou et al., 1996; Dinh et al., 2001; Andresen et al., 2003; Shah et al., 2004). Thus, we also studied how All can activate the canonical ERK1/2 pathway. Activated HSCs were pretreated for 20 min in the absence (–) or presence (+) of different MAPK inhibitors: 10  $\mu$ M SB (SB202190) (p38 inhibitor), 10  $\mu$ M U0126 (MEK1/2 inhibitor) or 10  $\mu$ M SP (SP600125) (JNK inhibitor), and then cells were stimulated with 1  $\mu$ M All for 5 min. Data show that solely U0126 blocked All-induced ERK1/2 phosphorylation (Figure 6B), indi-

cating that the AT1 receptor activates the canonical ERK1/2 activation pathway through MEK1/2. In order to test if any EGFR transactivation induced by All occurs in activated HSCs, cells were pretreated with or without 1  $\mu$ M AG (AG1478), a specific inhibitor of EGFR kinase, and then cells were incubated in the absence or presence of 1  $\mu$ M All or 50 ng/ml EGF (epidermal growth factor). Pretreatment with AG markedly blocked ERK1/2 activation induced by EGF but did not have any effect on All-induced ERK1/2 activation (Figure 6C). Thus, ERK1/2 activation induced by All is independent of EGFR transactivation in activated HSCs.

### 3.7. PKC and Nox are not implied in ERK1/2 activation induced by All

In some cell types, PKC activated by AT1 receptor is involved in ERK1/2 activation (Zou et al., 1996; De Gasparo et al., 2000; Touyz and Berry, 2002; Mehta and Griendling, 2007). In order to test a PKC role in All-induced ERK1/2 phosphorylation, activated HSCs were preincubated for 30 min in the absence or presence of 1  $\mu$ M STA (staurosporine) or 1  $\mu$ M BIM, and then cells were treated



**Figure 6** All induces ERK1/2 phosphorylation through the AT1 receptor but independently of EGFR transactivation

(A, B) Serum-deprived activated HSCs were preincubated 30 min in the absence (–) or presence (+) of All receptor antagonists: 10  $\mu$ M LOS or 10  $\mu$ M PD, before stimulation with 1  $\mu$ M All for 5 min. (C, D) Activated HSCs were incubated in the absence (–) or presence (+) of 10  $\mu$ M SB, 10  $\mu$ M U0 (U0126) or 10  $\mu$ M SP (SP600125) for 30 min, then cells were incubated with 1  $\mu$ M All for 5 min. (E, F) Serum-deprived activated HSCs were pretreated with 1  $\mu$ M AG before stimulation with 1  $\mu$ M All or 50 ng/ml EGF for 5 min. Total protein extracts were separated in SDS/PAGE, and phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1 and p-ERK2) proteins were detected by immunoblotting using specific antibodies. ERK1/2 proteins served as loading control. Densitometric analysis was performed using EDAS 290. Graphics on the right panels (B, D and F) show the ratio of phosphorylated ERK1/2 proteins with respect to control. Data are mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=3$ . \* $P<0.01$  compared with All response (100%), \*\* $P<0.01$  compared with EGF.

with 1  $\mu$ M All for 5 min. We observed that ERK1/2 activation induced by All was decreased  $\sim$ 75% with STA pretreatment, whereas no changes were observed with BIM pretreatment (Figure 7A). Data exclude a participation of PKC in All-mediated ERK1/2 activation but suggest a possible role for kinases sensitive to STA.

Interestingly, ROS are also able to induce ERK1/2 phosphorylation in renal mesangial cells as well as in HSCs (Frank et al., 2000; Bataller et al., 2003b; Gorin et al., 2004; De Minicis and Brenner, 2007). In order to explore if Nox plays a role in the ERK1/2 activation caused by All, activated HSCs were pretreated in the absence or presence of 10  $\mu$ M DPI. Cells were then incubated with 1  $\mu$ M All for 5 min. Cells were lysed, and protein extracts were analysed by SDS/PAGE and immunoblotting using specific anti-ERK1/2 or anti-phospho-ERK1/2 antibodies. We observed that DPI treatment did not decrease ERK1/2 phosphorylation induced by All in activated HSCs (Figure 7B). Therefore, All stimulation of ERK1/2 is independent of Nox activation in activated HSCs.

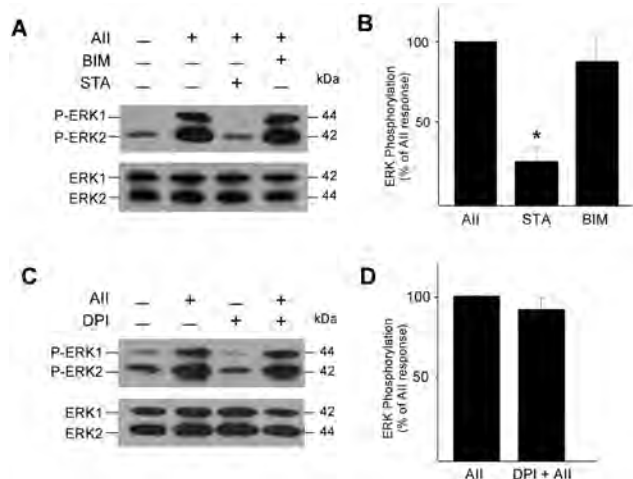
## 4. Discussion

The molecular mechanisms exerted by All on liver fibrosis are not fully understood; however, there is evidence that All may perform its profibrogenic actions by up-regulating some cytokines such as TGF- $\beta$ , which is considered one of the most important signals involved in the process of fibrosis. All increases TGF- $\beta$  mRNA expression, and TGF- $\beta$ -neutralizing antibodies cause a marked reduction in All-induced ECM production in cultured mesangial cells (Weigert et al., 2002). In liver, All is able to induce mainly TGF- $\beta$ 1 isoform expression in activated HSCs, and AT1A-deficient

mice showed significantly lower expression of hepatic TGF- $\beta$ 1 than wild-type mice, suggesting that the AT1A receptor may be involved in the production of TGF- $\beta$ 1 (Kanno et al., 2003). However, because all TGF- $\beta$  isoforms have been involved in the process of fibrosis, we were interested in studying if All was able to regulate expression of all three TGF- $\beta$  isoforms in HSCs.

Here, we show that All is also able to increase the mRNA levels of TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 isoforms in addition to TGF- $\beta$ 1 in both activated and quiescent HSCs. The fact that All is able to up-regulate the mRNA of all three TGF- $\beta$  isoforms in HSCs is notable. For a long time, TGF- $\beta$ 1 has been the main isoform studied in liver fibrosis, whereas a precise role for TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 has not been established, although both isoforms appear to have similar effects to those of TGF- $\beta$ 1 at least *in vitro* (Yu et al., 2003; Leask and Abraham, 2004). Moreover, in some organs such as the lung and kidney, all three TGF- $\beta$  isoforms separately produce fibrosis and all together have additive effects regarding matrix production (Ledbetter et al., 2000; Hill et al., 2001; Yu et al., 2003; Lu et al., 2005; Fukumura et al., 2006). Because TGF- $\beta$  is the key profibrogenic cytokine in several fibrosis models, it has been proposed that the blockade of all TGF- $\beta$  isoforms may yield a major therapeutic effect to reduce fibrosis (Yu et al., 2003; Yingling et al., 2004; Lu et al., 2005). Intriguingly, all TGF- $\beta$  isoform mRNAs are overexpressed in cirrhotic human liver in comparison with liver from normal individuals, and notably, the most abundant transcript is TGF- $\beta$ 3 mRNA ( $\sim$ 8-fold over normal livers) (Baer et al., 1998). Therefore, our observation that All is able to up-regulate all TGF- $\beta$  isoforms in HSCs, mainly TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 isoforms, is significant; however, it remains to be determined if this occurs *in vivo* and if this is relevant for the development of liver fibrosis. Moreover, it is known that non-parenchymal hepatic cells like Kupffer and endothelial cells, from either normal or fibrotic liver, are also able to produce all three TGF- $\beta$  isoforms, although, thus far, it is unknown if All is able to induce the TGF- $\beta$  isoforms in such cells. Surprisingly, we observed that quiescent HSCs are All responsive but to a lesser extent than activated HSC, and these data appears to contrast with previous reports, where it was showed that quiescent HSCs were insensitive to All (Bataller et al., 2000; Wei et al., 2001).

Mammalian cells express three distinct TGF- $\beta$  isoforms, each one encoded by a unique gene located in a different chromosome. All three genes and the promoter region of each one have been characterized, and several reports show differential regulation of each gene. TGF- $\beta$ 1 gene promoter lacks a TATAA box and is the isoform most acutely regulated in response to stress, injury or inducers of diseases such as oncogenes and viral transactivators, whereas TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 isoforms appears mostly regulated by developmental and hormonal signals, their promoters are more similar to each other, and each contains a TATAA box as well as several sites for different transcription factors (Lafyatis et al., 1990; Roberts, 1998). TGF- $\beta$  isoforms can be up-regulated by different signalling pathways including PKC, ERK1/2, p38 MAPK and Smad pathways (Bascom et al., 1989; Kim et al., 1989, 1990; Lu and Giguere, 2001; O'Reilly et al., 1992; Roberts, 1998; Weigert et al., 2002). All can regulate TGF- $\beta$  gene expression via different pathways; for instance, previous data showed a role for ERK1/2 in All-induced TGF- $\beta$  expression (Hamaguchi et al., 1999; Weigert et al., 2002). All-activated Nox can also induce TGF- $\beta$  expression in human activated HSCs



**Figure 7** PKC and Nox are not implied in ERK1/2 activation induced by All (A) Activated HSCs were preincubated for 30 min in the absence (–) or presence (+) of PKC inhibitors 1  $\mu$ M BIM or 1  $\mu$ M STA before treatment with 1  $\mu$ M All for 5 min. (C) Activated HSCs were preincubated 2 h in the absence (–) or presence (+) of 10  $\mu$ M DPI (Nox inhibitor) before All 1  $\mu$ M treatment for 5 min. Total protein extracts were separated in SDS/PAGE, and phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1 and p-ERK2) proteins were detected by immunoblotting using specific antibodies. Total ERK1/2 proteins were used as a loading control. Densitometry analysis was performed using EDAS 290. Graphics (B and D) represent the ratio of ERK phosphorylation with respect to control. Data are mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=3$ . \* $P<0.01$  compared with All response (100%).



(Bataller et al., 2003b), and several reports showed that All-induced ERK1/2 activation is abolished in cells treated with DPI (Bataller et al., 2003b; Gorin et al., 2004; De Minicis and Brenner, 2007). Our data showed that All required ERK1/2 and Nox signalling to increase mRNA levels of all TGF- $\beta$  isoforms but not PKC activation in HSCs. Interestingly, we observe that All activates ERK1/2 and Nox in activated HSCs through different pathways, although both pathways are required to induce TGF- $\beta$  isoform expression and also to induce active TGF- $\beta$  secretion from activated HSCs.

## 5. Conclusions

All TGF- $\beta$  isoform mRNA levels are increased by All in activated HSCs, which also produce active TGF- $\beta$  protein after All treatment. TGF- $\beta$  isoform expression induced by All requires both ERK1/2 and Nox activation but not PKC participation. This ERK1/2 activation induced by All occurs via AT1 receptors, but independently of either PKC and Nox activation or EGFR transactivation. Interestingly, All has a similar effect on TGF- $\beta$  expression in quiescent HSCs, although it has a smaller but significant effect on ERK1/2 activation in these cells. It would be interesting to investigate how each TGF- $\beta$  isoform expression is regulated and what the role of each isoform during liver fibrosis is.

### Author contribution

Paola Moreno-Alvarez participated in acquiring all data. Marcela Sosa-Garrocho and Marco Briones-Orta participated in isolating and culturing HSCs. Claudia González-Espinosa and Jaciel Medina-Tamayo participated carrying out RPA assays. Eduardo Molina-Jijón and José Pedraza-Chaverri participated by measuring ROS. Paola Moreno-Alvarez and Marina Macías-Silva participated in designing the study, interpreting and analysing data and in preparing the manuscript.

### Acknowledgments

We thank all members of Unidad de Biología Molecular and Unidad de Computo at Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

### Funding

This work was supported by grants to Marina Macías-Silva from Dirección General de Asuntos del Personal Académico/UNAM (IN214206 and IN222909), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (49493-Q), Third World Academy of Science (TWAS, 05-253) and Fundación Miguel Alemán A.C. and to José Pedraza-Chaverri from DGAPA/UNAM (IN201910).

## References

Andresen BT, Linnoila JJ, Jackson EK, Romero GG. Role of EGFR transactivation in angiotensin II signaling to extracellular regulated kinase in preglomerular smooth muscle cells. *Hypertension* 2003;41:781–6.

Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K et al. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005;41:1272–81.

Baer HU, Friess H, Abou-Shady M, Berberat P, Zimmermann A, Gold LI et al. Transforming growth factor betas and their receptors in human liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998;10:1031–9.

Ballardini G, Fallani M, Biagini G, Bianchi FB, Pisi E. Desmin and actin in the identification of Ito cells and in monitoring their evolution to myofibroblasts in experimental liver fibrosis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1988;56:45–9.

Bascom CC, Wolfshohl JR, Coffey RJ, Madisen L, Webb NR, Purchio AR et al. Complex regulation of transforming growth factor  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 3 mRNA expression in mouse fibroblasts and keratinocytes by transforming growth factors  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2. *Mol Cell Biol* 1989;9:5508–15.

Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Görbig MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X et al. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;118:1149–56.

Bataller R, Gabele E, Schoonhoven R, Morris T, Lehnert M, Yang L et al. Prolonged infusion of angiotensin II into normal rats induces stellate cell activation and proinflammatory events in liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003a;285:G642–51.

Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003b;112:1383–94.

Bedard K, Krause KH. The NOX Family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007;87:245–313.

Bindokas V, Jordan J, Lee C, Millar R. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 1996;16:1324–36.

Bosch J, Arroyo V, Betriu A, Mas A, Carrilho F, Rivera F et al. Hepatic hemodynamics and the renin angiotensin system in cirrhosis. *Gastroenterology* 1980;78:92–9.

Choi SS, Sicklick JK, Yang L, Huang J, Qi Y, Chen W et al. Sustained activation of Rac1 in hepatic stellate cells promotes liver injury and fibrosis in mice. *Hepatology* 2006;44:1267–77.

Czaja M. Another way for NADPH oxidase to send a signal for liver injury. *Gastroenterology* 2005;129:2110–13.

De Bleser PJ, Niki T, Rogiers V, Geerts A. Transforming growth factor-beta gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol* 1997;26:886–93.

De Gasparo M, Catt K, Inagami T, Wright JW, Unger T. International Union of Pharmacology XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:415–72.

De Minicis S, Bataller R, Brenner DA. NADPH oxidase in the liver: defensive, offensive or fibrogenic? *Gastroenterol* 2006;131:272–5.

De Minicis S, Brenner DA. Nox in liver fibrosis. *Arch Biochem Biophys* 2007;462:266–72.

Dinh D, Frauman A, Jonhston C, Fabiani M. Angiotensin receptors: distribution, signaling and function. *Clin Sci* 2001;100:481–92.

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;141:3120–6.

Friedman SL, Roll FJ. Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with Stractan. *Anal Biochem* 1987;161:207–18.

Friedman S. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247–50.

Friedman S. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008;88:125–72.

Fukumura Y, Kumasaka T, Mitani K, Karita K, Suda K. Expression of transforming growth factor beta1, beta2, and beta3 in chronic, cancer-associated, obstructive pancreatitis. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:356–61.

García-Sáinz JA, Macías-Silva M. Angiotensin II stimulates phosphoinositide turnover and phosphorylase through All-1 receptors in isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;172:780–5.

Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol* 2009;302:148–58.

- Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:311–35.
- González-Espinosa C, Odom S, Olivera A, Hobson JP, Martínez ME, Oliveira-Dos-Santos A et al. Preferential signaling and induction of allergy-promoting lymphokines upon weak stimulation of the high affinity IgE receptor on mast cells. *J Exp Med* 2003;197:1453–65.
- Gorin Y, Ricono JM, Wagner B, Kim NH, Bhandari B, Choudhury GG et al. Angiotensin II-induced ERK1/ERK2 activation and protein synthesis are redox-dependent in glomerular mesangial cells. *Biochem J* 2004;381:231–9.
- Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006;10:76–99.
- Hamaguchi A, Kim S, Izumi Y, 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* 1999;34:126–31.
- Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA. The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J Hepatol* 1999;30:77–87.
- Hill C, Flyvbjerg A, Rasch R, Bak M, Logan A. Transforming growth factor-beta2 antibody attenuates fibrosis in the experimental diabetic rat kidney. *J Endocrinol* 2001;170:647–51.
- Kanno K, Tazuma S, Chayama K. AT1A-deficient mice show less severe progression of liver fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:177–83.
- Kim SJ, Denhez F, Kim KY, Holt JT, Sporn MB, Roberts AB. Activation of the second promoter of the transforming growth factor- $\beta$ 1 gene by transforming growth factor- $\beta$ 1 and phorbol ester occurs through the same target sequences. *J Biol Chem* 1989;264:19373–8.
- Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB et al. Autoinduction of transforming growth factor 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol* 1990;10:1492–7.
- Lafyatis R, Lechleider R, Kim SJ, Jakowlew S, Roberts AB, Sporn MB. Structural and functional characterization of the transforming growth factor beta 3 promoter. A cAMP-responsive element regulates basal and induced transcription. *J Biol Chem* 1990;265:19128–36.
- Leask A, Abraham DJ. TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 2004;18:816–27.
- Ledbetter S, Kurtzberg L, Doyle S, Pratt BM. Renal fibrosis in mice treated with human recombinant transforming growth factor-beta2. *Kidney Int* 2000;58:2367–76.
- Lu L, Saulis AS, Liu WR, Roy NK, Chao JD, Ledbetter S et al. The temporal effects of anti-TGF- $\beta$ 1, 2, and 3 monoclonal antibody on wound healing and hypertrophic scar formation. *J Am Coll Surg* 2005;201:391–7.
- Lu D, Giguere, V. Requirement of ras-dependent pathways for activation of the transforming growth factor  $\beta$ 3 promoter by estradiol. *Endocrinology* 2001;142:751–9.
- Macías-Silva M, Abdollah S, Pirone R, Hoodless PA, Attisano L, Wrana JL. MADR2 is a substrate of the TGF- $\beta$  receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 1996;87:1215–24.
- 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;282:C172–82.
- Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signalling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C82–97.
- Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 2001;38:635–8.
- Moreno M, Bataller R. Cytokines and rennin-angiotensin system signaling in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008;12:825–52.
- O’Kane S, Ferguson MWJ. Transforming growth factor  $\beta$ s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;1:63–78.
- Olivares-Reyes JA, Arellano-Plancarte A, Castillo-Hernández JR. Angiotensin II and the development of insulin resistance: Implications for diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 2009;302:128–39.
- Orozco-Ibarra M, Estrada-Sánchez AM, Massieu L, Pedraza-Chaverri J. Heme oxygenase-1 induction prevents neuronal damage triggered during mitochondrial inhibition: role of CO and bilirubin. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1304–14.
- O’Reilly MA, Geiser AG, Kim SJ, Bruggeman LA, Luu AX, Roberts AB et al. Identification of an activating transcription factor (ATF) binding site in the human transforming growth factor-beta 2 promoter. *J Biol Chem* 1992;267:19938–43.
- Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:397–416.
- Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H. Blockade of type b transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2345–9.
- Roberts A. Molecular and cell biology of TGF- $\beta$ . *Miner Electrolyte Metab* 1998;24:111–9.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press;1989
- Schuppan D, Krebs A, Bauer M, Hahn EG. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ* 2003;10 Suppl 1:S59–67.
- 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* 2004;18:2035–48.
- Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1001–15.
- Ueki M, Koda M, Yamamoto S, Matsunaga Y, Murawaki Y. Preventive and therapeutic effects of angiotensin II type 1 receptor blocker on hepatic fibrosis induced by bile duct ligation in rats. *J Gastroenterol* 2006;41:996–1004.
- Warner FJ, Lubel JS, McCaughan GW, Angus PW. Liver fibrosis: a balance of ACEs? *Clin Sci* 2007;113:109–18.
- Wei H, Lu H, Li D, Zhan Y, Wang Z, Huang X. The expression of AT1 receptor on hepatic stellate cells in rat fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>. *Chin Med J (Engl)* 2001;114:583–7.
- Weigert C, Brodbeck K, Klopfer K, Häring HU, Schleicher ED. Angiotensin II induces TGF- $\beta$ 1 promoter activation: similarity to hyperglycemia. *Diabetologia* 2002;45:890–8.
- Wickert L, Steinkrüger S, Abiaka M, Bolkenius U, Purps O, Schnabel C et al. Quantitative monitoring of the mRNA expression pattern of the TGF- $\beta$  isoforms (b1, b2, b3) during transdifferentiation of hepatic stellate cells using a newly developed real-time SYBR Green PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:330–5.
- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008;214:199–210.
- Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS. Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:1011–22.
- Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T et al. Angiotensin II type I receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001;34:745–50.
- Yu L, Border WA, Huang Y, Noble NA. TGF- $\beta$  isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int* 2003;64:844–56.
- Zhang Y, Yang X, Wu P, Xu L, Liao G, Yang G. Expression of angiotensin II type 1 receptor in rat hepatic stellate cells and its effects on cell growth and collagen production. *Horm Res* 2003;60:105–10.
- Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Aikawa R, Kudoh S, Shiojima I et al. 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* 1996;271:33592–7.

Received 28 May 2010/21 April 2010; accepted 18 June 2010

Published as Immediate Publication 18 June 2010, doi 10.1042/CBI20090074