



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO D FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA

**IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES ALK1
Y ENDOGLINA EN LA FIBROSIS RENAL**

TESiS DOCTORAL

(MENCIÓN "DOCTORADO iNTERNACIONAL")

JOSÉ MANUEL MUÑOZ FÉLIX

Memoria presentada por D. José Manuel Muñoz Félix para optar al
Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Firmado. José Manuel Muñoz Félix

Salamanca, 2 de febrero de 2015

LA DOCTORA DÑA. MARÍA JESÚS MONTE RÍO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, elaborado por el Licenciado en Biotecnología D. **José Manuel Muñoz Félix** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, con el título “**IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES ALK1 Y ENDOGLINA EN LA FIBROSIS RENAL**”, ha sido realizado bajo la dirección de los Doctores D. Carlos Martínez Salgado, D. José Miguel López Novoa y Dña. Nélida Eleno Balboa, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma el presente certificado en Salamanca, a 2 de febrero de 2015

Fdo.: Dra. Dña. María Jesús Monte Río

LOS DOCTORES **D. CARLOS MARTÍNEZ SALGADO**, INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE SALAMANCA (IBSAL), **JOSÉ MIGUEL LÓPEZ NOVOA** Y **DÑA. NÉLIDA ELENO BALBOA**, CATEDRÁTICOS DE FISIOLÓGÍA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo, titulado “**IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES ALK1 Y ENDOGLINA EN LA FIBROSIS RENAL**”, presentado por el Licenciado en Biotecnología **D. José Manuel Muñoz Félix**, ha sido realizado bajo su dirección en el Área de Fisiología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, consideran que cumple las condiciones necesarias y autorizan su presentación con el fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Salamanca, a 2 de febrero de 2015.

Salamanca, a 2 de febrero de 2015.

Fdo: Dr. D. Carlos Martínez Salgado

Fdo: Dr. D. José Miguel López Novoa

Fdo. Dr. Dña. Nélida Eleno Balboa.

CONSIDERACIONES GENERALES

1. TESIS DOCTORAL EN EL FORMATO DE COMPENDIO DE PUBLICACIONES.

La Comisión de Doctorado y Posgrado de la Universidad de Salamanca estableció el 15 de febrero de 2013 el procedimiento para la presentación de la Tesis Doctoral en el Formato de Compendio de Artículos/Publicaciones.

Esta comisión establece como formato de presentación de Tesis Doctoral, *la modalidad de tesis por compendio de artículos/publicaciones, publicados o aceptados en revistas especializadas y de prestigio, siempre que sean resultado de la actividad investigadora desarrollada por el doctorando.*

Esta memoria de tesis doctoral que presento para la obtención de título de doctor por la Universidad de Salamanca se acoge a esta modalidad mencionada anteriormente y se adhiere a las características necesarias para la obtención del grado de doctor mediante este formato de Tesis Doctoral.

Para ello, el requisito que se pide es un *“mínimo de tres artículos o capítulos publicados o aceptados para su publicación, con posterioridad al inicio de los estudios de doctorado, en revistas científicas del ámbito de la especialidad del trabajo desarrollado en la tesis e indexadas en el Science Citation Reports (o equivalente según la CNEAI en los campos científicos en los que dicho criterio no sea aplicable). Excepcionalmente se podrá admitir un número inferior de publicaciones a las tres mencionadas cuando su relevancia y excelencia esté bien documentada.* En mi caso presento ese mínimo de tres publicaciones con las características que se señalan.

Por otro lado, la normativa dice que *“El doctorando deberá ser primer autor de al menos dos de las aportaciones presentadas. En el caso de que no sea primer autor, el doctorando especificará cuál ha sido su aportación científica a la publicación lo que deberá estar certificado por el director de la tesis doctoral.”* En mi caso presento tres publicaciones, en las que firmo como primer autor en 3 de ellas, aunque en la última comparto la primera firma con otro miembro del grupo de investigación:

José M. Muñoz-Félix, José M. López-Novoa, Carlos Martínez-Salgado. Heterozygous disruption of activin receptor-like kinase 1 is associated with increased renal fibrosis in

a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2014 Feb;85(2):319-32. doi: 10.1038/ki.2013.292. Epub 2013 Aug 14.

José M. Muñoz-Félix, Nuria Perretta-Tejedor, Nélida Eleno, José M. López-Novoa, Carlos Martínez-Salgado. ALK1 heterozygosity increases extracellular matrix protein expression, proliferation and migration in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta (Molecular Cell Research)*. 2014 Jun;1843(6):1111-22. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.02.017. Epub 2014 Mar 1.

Bárbara Oujo*, **José M. Muñoz-Félix***¹, Miguel Arévalo, Elena Núñez-Gómez, Lucía Pérez-Roque, Miguel Pericacho, María González-Núñez, Carmen Langa, Carlos Martínez-Salgado, Fernando Perez-Barriocanal, Carmelo Bernabéu, José Miguel Lopez-Novoa. L-Endoglin overexpression increases renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *PLoS One*. 2014 Oct 14;9(10):e110365. doi: 10.1371/journal.pone.0110365. eCollection 2014.

Además, aunque los requisitos mínimos se cumplen con los artículos mencionados anteriormente, presento otro artículo que ha sido enviado para su publicación, y se encuentra actualmente en evaluación.

José M. Muñoz-Félix, Nuria Perretta-Tejedor, Mariela Subileau, Cristina Cuesta, Francisco J. López-Hernández, José M. López-Novoa, Carlos Martínez-Salgado. Identification of bone morphogenetic protein 9 (BMP9) as a novel profibrotic factor in vitro.

Tal y como lo señala la normativa, esta tesis cuenta con una página en la que tanto los directores, la comisión académica del programa de doctorado como el personal responsable de la escuela de doctorado de la Universidad de Salamanca autorizan a que la tesis sea presentada siguiendo esta modalidad. Además se han presentado junto con la solicitud de depósito de esta tesis doctoral las autorizaciones pertinentes.

Cada artículo será prologado con un pequeño resumen en castellano, tal y como señala la normativa vigente para este formato de tesis, que requiere “*Un apartado en castellano*”

¹ * Autores que comparten la primera autoría del artículo.

que refleje la coherencia y relación directa entre los artículos/publicaciones presentados. Dicho apartado incluirá al menos una introducción con los antecedentes del tema objeto de estudio, la hipótesis de trabajo y los objetivos así como las principales conclusiones."

Y también presentamos tres revisiones bibliográficas publicadas como anexo a la introducción, ofreciendo a lo largo de la tesis una visión más amplia sobre el estado de la cuestión en el que se encuentra el tema a estudiar en esta tesis doctoral.

María González-Núñez*, **José M. Muñoz-Félix***, José M. López-Novoa. The ALK-1/Smad1 pathway in cardiovascular physiopathology. A new target for therapy? *Biochim Biophys Acta (Molecular basis of disease)*. 2013 Oct;1832(10):1492-510.

José M. Muñoz-Félix JM*, María González-Núñez*, José M. López-Novoa. ALK1-Smad1/5 signaling pathway in fibrosis development: friend or foe? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013 Dec;24(6):523-37.

José M. Muñoz-Félix*, Bárbara Oujo*, José M. López-Novoa. The role of endoglin in kidney fibrosis. *Expert Rev Mol Med*. 2014 Dec 2;16:e18.

Para concluir la tesis, me extenderé con una discusión general –también en castellano- en la que pretendo integrar los resultados y conclusiones obtenidas en todos los artículos presentados.

2. OBTENCIÓN DE LA MENCIÓN DE DOCTORADO INTERNACIONAL.

Por último presento un pequeño resumen –que llevará el título de Summary- y las conclusiones en inglés para optar asimismo a la mención de “Doctorado Internacional”.

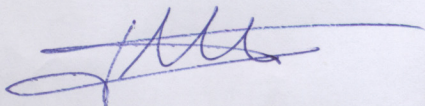
Los doctores D. Carlos Martínez Salgado, Investigador del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), D. José Miguel López Novoa y Doña Nélida Eleno Balboa, Catedráticos de Fisiología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y directores del trabajo de Tesis Doctoral.

La Comisión Académica del Programa de Doctorado (RD. 1393/2007) "FISIOPATOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR Y SUS IMPLICACIONES FARMACOLÓGICAS" –en el cual se ha realizado dicho trabajo de Tesis Doctoral–,

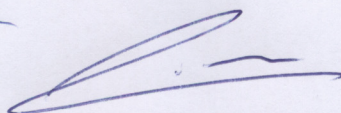
Y asimismo la Comisión de Doctorado y Posgrado de la Universidad de Salamanca,

AUTORIZAN:

Que el trabajo de tesis doctoral titulado "ALK1 Y ENDOGLINA, RECEPTORES DE TGF- β Y BMP, Y SU IMPLICACIÓN EN LA FIBROSIS RENAL", presentado por el Licenciado en Biotecnología D. José Manuel Muñoz Félix, pueda presentarse mediante el formato de tesis por compendio de artículos/publicaciones, según la normativa establecida por la Comisión de Doctorado y Posgrado el 15 de febrero de 2013, para su tramitación en dicha modalidad.

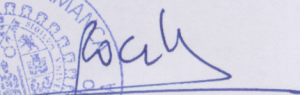


Fdo: Dr. D. Carlos Martínez Salgado,

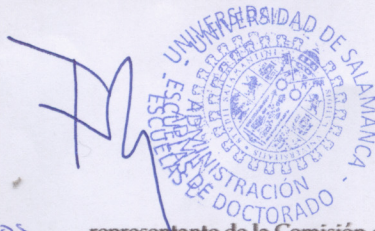
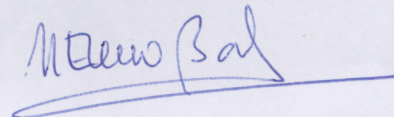


Fdo: Dr. D. José Miguel López Novoa,

Fdo. Dra. Dña. Nélida Eleno Balboa.



Fdo: Dra. Rocio I. Rodriguez Macías, coordinadora del Programa de Doctorado, y representante de la Comisión Académica del mismo.



Fdo. Francisco R. Rivas, representante de la Comisión de Doctorado y Posgrado de la Universidad de Salamanca,

Esta tesis doctoral ha sido financiada por los siguientes organismos:

-El Instituto de Salud Carlos III mediante los proyectos PS09/01067(2009-2012) y PI12/00959 (2013-2015).

-Junta de Castilla y León, Gerencia Regional de Salud, mediante los proyectos 167/A/07 (2007-2009) y BIO/SA87/13.

-La Obra Social Caja de Burgos, mediante las ayudas a la Investigación Clínica.

-La Fundación Muta Madrileña.

-La Red de Investigación Renal (REDINREN) (RETIC RD06/0016/0002) , dentro de las Redes de excelencia del Instituto de Salud Carlos III.

-El Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica de la Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo.

El doctorando fue financiado mediante un contrato de Personal Investigador a cargo de REDINREN, desde octubre de 2010 hasta marzo de 2011 y por un Contrato de Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria (PIRTU), de la Junta de Castilla y León. (BOCYL 29 de Abril de 2011). Durante su estancia en Grenoble (Francia), el doctorando fue beneficiario de una ayuda de la European Molecular Biology Organization (*EMBO-Short term fellowship*).

iNTR0DVCCI0N

1. LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA. Perspectivas generales

La enfermedad renal crónica (ERC) incluye una serie de procesos en los que hay una progresiva e irreversible alteración de la estructura y función del riñón, dando lugar a la “enfermedad renal en estado final”, que hace necesaria una terapia sustitutiva (diálisis o trasplante renal) ¹. La ERC es un problema de salud pública a nivel mundial. La relevancia de esta enfermedad se debe a su alta prevalencia, dado que en torno al 10-20% de la población sufre algún tipo de ERC, lo cual origina un elevado coste en los sistemas de salud. Además, más de un millón de pacientes muere al año debido a la ERC ². En los países en vías de desarrollo, el estadio final de la ERC en muchos casos equivale a la muerte debido al acceso limitado a las terapias de reemplazo renal, que se inician en menos del 25% de pacientes en la etapa terminal de la enfermedad renal.

La ERC se caracteriza por una tasa de filtración glomerular inferior a 60 mL/min/1,73 m² ³. Con el paso del tiempo, una persona con ERC pierde progresivamente su función renal hasta que la tasa de filtración glomerular es menor de 15 mL/min/1,73m², punto definido como “enfermedad renal en estado final”, mencionado anteriormente, ya que este grado de función renal es difícilmente compatible con la vida.

De forma independiente a las causas de la ERC, en los estadios finales tiene lugar un incremento de la matriz extracelular (MEC) en el glomérulo (glomeruloesclerosis), en el intersticio (fibrosis túbulo-intersticial) o en ambos compartimentos. La infiltración de células inflamatorias en el intersticio, así como la atrofia tubular también caracterizan esta enfermedad. Muchas condiciones patológicas, especialmente la diabetes y la hipertensión, pueden favorecer el desarrollo de la ERC. Además, la aterosclerosis, la hipoxia renal, infecciones, enfermedades autoinmunes y la nefropatía obstructiva son también causas importantes de ERC.

Dado que el parénquima renal está compuesto fundamentalmente por túbulos (el 90% aproximadamente) la fibrosis túbulo-intersticial se correlaciona mejor con el grado de daño renal en comparación con la glomeruloesclerosis. Numerosos tipos celulares están implicados en el desarrollo de la fibrosis renal, como miofibroblastos, células mesangiales y células epiteliales tubulares. La mayor fuente de síntesis de proteínas de

MEC son las células mesangiales en el glomérulo y los miofibroblastos en el intersticio tubular.

La evolución del daño renal en la ERC comparte muchas características con otras enfermedades renales como la enfermedad poliquística renal, el rechazo al trasplante renal y la nefropatía obstructiva. La fase fibrótica es muy similar en todas las enfermedades progresivas renales.

1.1. Nefropatías túbulo-intersticiales

Los términos *enfermedades túbulo-intersticiales*, *nefritis tubulointersticiales* o *nefropatías tubulointersticiales* agrupan a un conjunto heterogéneo de alteraciones que de forma primaria afectan al intersticio y a los túbulos renales y solamente de manera secundaria pueden afectar a otras partes del riñón como por ejemplo el glomérulo ^{4, 5}. El componente mayoritario del parénquima renal que sufre la mayor parte del daño en este tipo de enfermedades son los túbulos. Además, la función tubular constituye el componente más llamativo desde el punto de vista clínico, diferenciándose de otras enfermedades renales que son consecuencia de lesiones vasculares o glomerulares ^{4,5}.

El intersticio está constituido por un andamio intercelular, formado por la MEC y las membranas basales, donde se encuentran numerosos tipos celulares: aparte de los vasos sanguíneos y linfáticos se encuentran pericitos microvasculares, células residentes e infiltradas del sistema inmune, fibroblastos y, especialmente bajo condiciones patológicas, miofibroblastos.

Las enfermedades túbulo-intersticiales son idiopáticas, genéticas o debidas a (i) la acción química de tóxicos o fármacos que se acumulan en los túbulos e inducen apoptosis o necrosis de las células tubulares, (ii) infección o inflamación del intersticio tubular, como resultado de reflujo o pielonefritis crónica, (iii) incremento de la presión intratubular, inducida por estrés mecánico, generalmente relacionada con obstrucción, y en el bajo tracto urinario causado por litiasis, prostatitis, fibrosis o tumores retroperitoneales, y (iv) rechazo inmune al trasplante ⁵.

La función renal se deteriora de manera progresiva como consecuencia de procesos disfuncionales de reabsorción y secreción, activación de células tubulares con reclutamiento de mediadores inflamatorios, pérdida de masa tubular, cicatrización del tejido y daño de las estructuras renales.

Estas enfermedades se caracterizan por la presencia de fibrosis intersticial, atrofia tubular e infiltración celular ⁴. La pérdida de la filtración glomerular ocurre lentamente en fases tempranas mientras que la alteración de la función tubular constituye la manifestación más importante de estas enfermedades ^{4 6}. La hipertensión ocurre de forma más tardía –a diferencia de lo que ocurre en la enfermedad glomerular- y siempre después de un descenso significativo de la tasa de filtración glomerular ⁷.

Sin embargo, es en el intersticio donde la patogénesis se perpetúa, y son las alteraciones intersticiales las que contribuyen a la disminución característica de la función tubular ⁸.

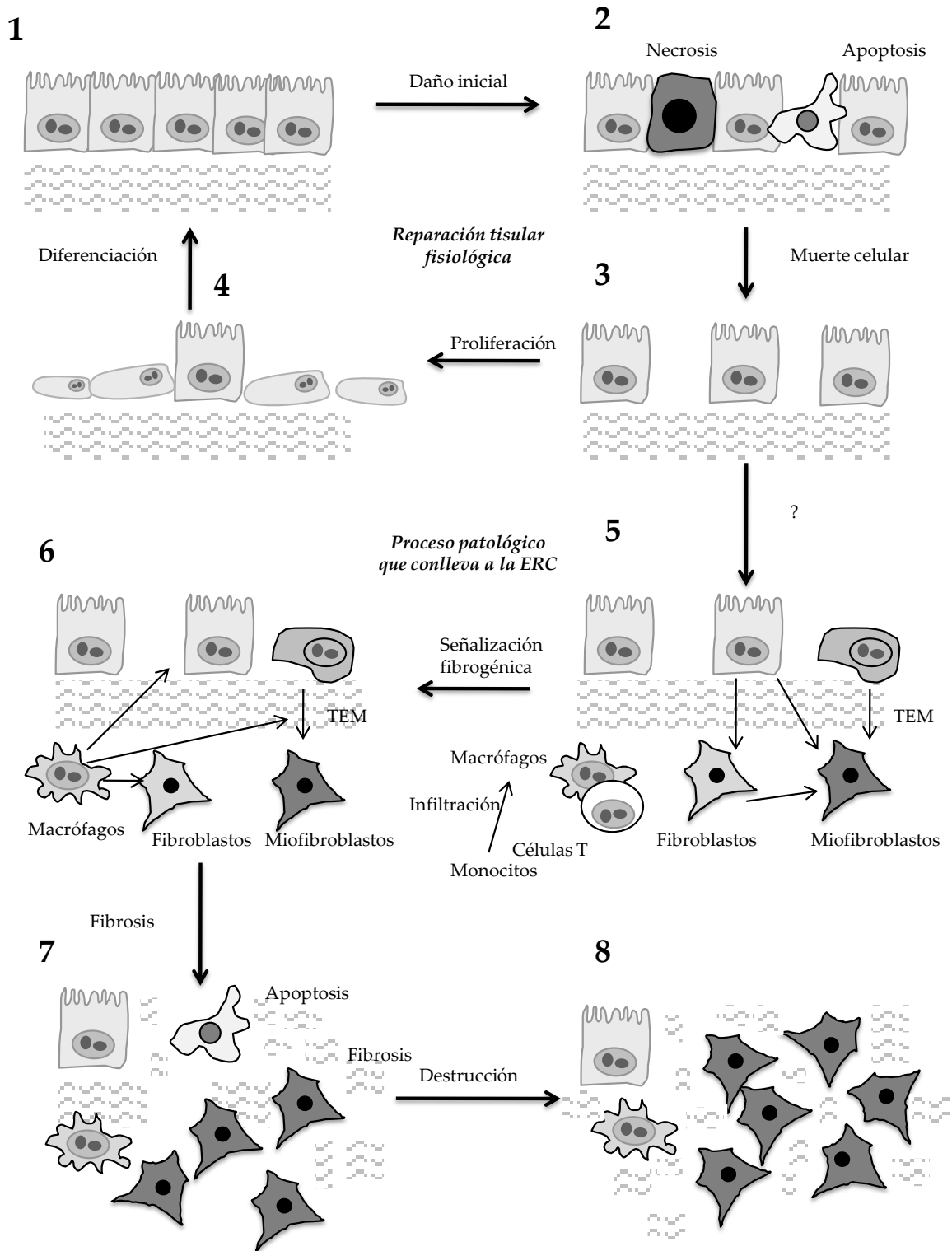


Figura 1: Descripción esquemática del proceso patológico de la degeneración tubular y la fibrosis túbulo-intersticial característica de las enfermedades túbulo-intersticiales y estadios tardíos de enfermedades glomerulares y renovasculares que originan ERC. En respuesta a un daño, se produce la muerte celular –bien mediante necrosis o apoptosis–, pero esa muerte celular se contrarresta con una proliferación y diferenciación de ese tipo celular, en un proceso de reparación tisular fisiológica (1-4). Sin embargo, bajo diversos factores como p.ej. la acción de citoquinas, se producen fenómenos de infiltración de células inflamatorias o TEM, dando lugar a un tipo celular característico: el miofibroblasto, que produce gran cantidad de MEC originando fibrosis túbulo-intersticial. La apoptosis en células epiteliales tubulares da lugar a atrofia en el túbulo (adaptado de López-Novoa y cols, 2011). TEM: Transición epitelio-mesénquima.

1.2. Glomerulopatías

Las glomerulopatías son todas aquellas alteraciones que afectan a la estructura y función del glomérulo. Las glomerulopatías primarias pueden ser de tipo inflamatorio-inmune y están englobadas bajo el término glomerulonefritis, o pueden ser de tipo metabólico ⁹⁻¹¹. Además, las glomerulopatías secundarias son el resultado de enfermedades tubulointersticiales y renovasculares primarias, las cuales contribuyen a la progresión del daño ¹⁰. Las condiciones –primarias- inflamatorias y no inflamatorias dan lugar a los síndromes nefrítico y nefrótico respectivamente ¹¹. La hipertensión, la diabetes y la glomerulonefritis son las mayores causas de fallo renal crónico en enfermedades glomerulares ¹².

Las *glomerulonefritis* reúnen a un amplio grupo de glomerulopatías que conllevan procesos inflamatorios de origen glomerular en los que intervienen de forma relevante mecanismos inmunológicos.

Este grupo de glomerulopatías son debidas normalmente a i) infecciones renales y sistémicas, ii) glomerulonefritis focal y segmental, iii) daños en la membrana basal glomerular resultante de depósitos inmunes en las paredes de los capilares, acumulación de complejos de IgA en el glomérulo (nefropatía por IgA) y otros, y iv) glomerulonefritis por vasculitis ⁵.

La patogenia de la mayoría de las glomerulonefritis se basa en cuatro mecanismos inmunitarios básicos: presencia de inmunocomplejos circulantes, inmunocomplejos formados *in situ*, activación de la vía alternativa del complemento y procesos mediados por células ¹³.

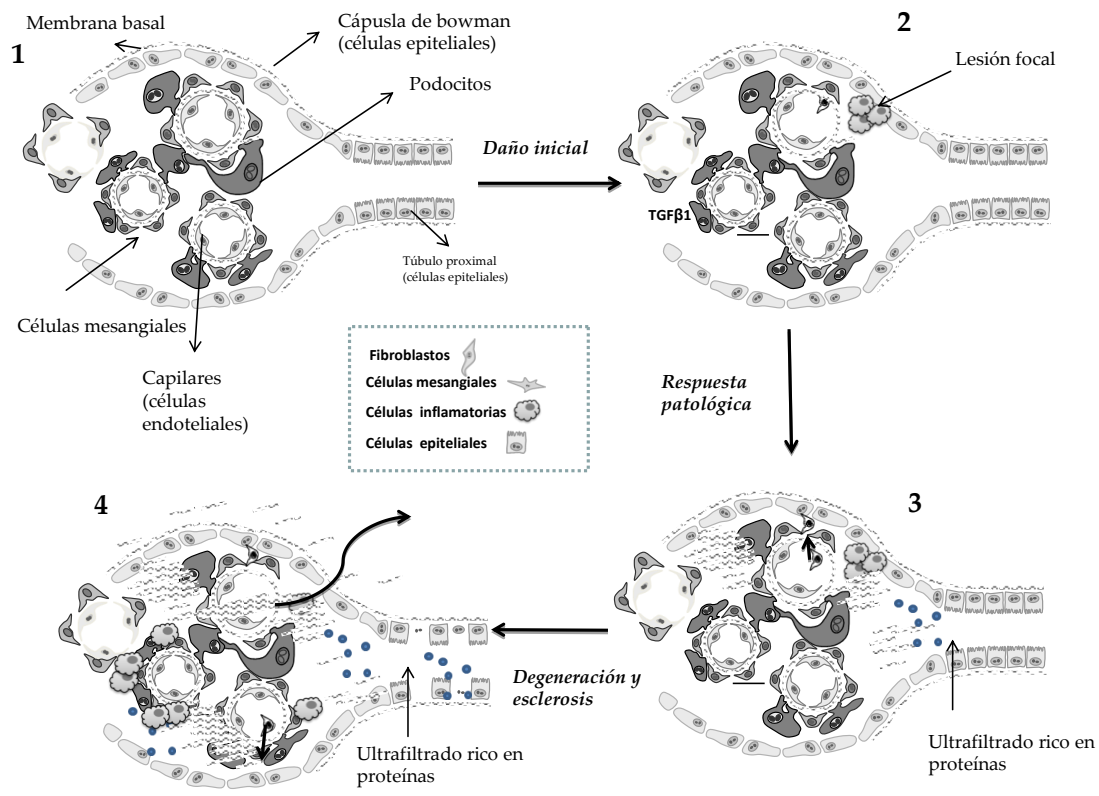


Figura 2: Representación esquemática del proceso de degeneración glomerular y esclerosis en las glomerulopatías. La estructura normal de un corpúsculo muestra la cápsula de Bowman junto a la red capilar glomerular, que está compuesta por células endoteliales, células mesangiales, podocitos y la membrana basal (1). Un daño inicial de naturaleza indeterminada produce una lesión focal que conduce a una pérdida de podocitos y una activación de la respuesta inflamatoria que implica a células tanto residentes como circulantes (2). Una respuesta patológica ocurre cuando esta lesión no se resuelve mediante los mecanismos de reparación tisular normal, y presenta proliferación de células mesangiales y epiteliales –de la cápsula de Bowman–, extravasación e infiltración de linfocitos, fibrosis y pérdida de podocitos. La membrana de ultrafiltración se vuelve más permeable para las proteínas (3). La fibrosis extiende el daño por el corpúsculo induciendo apoptosis de las células epiteliales y rellenando los espacios vacíos que dejan las células muertas y dando lugar a vías que conectan la cápsula de Bowman con el intersticio, de tal modo que el ultrafiltrado rico en proteínas accede a otras áreas del corpúsculo y causa un mayor daño (4) (adaptado de López-Novoa y cols, 2011).

Las glomerulonefritis presentan manifestaciones variadas denominadas clínicamente *síndrome nefrítico*, que incluyen edema, hipertensión arterial, hematuria, proteinuria y oliguria. La proliferación de las células glomerulares es un fenómeno característico de la enfermedad, que puede ser *mesangioproliferativa* o *proliferativa intracapilar*, dependiendo de si la proliferación es mesangial o endotelial, respectivamente. Algunas glomerulopatías inducen proliferación de células parietales y viscerales de la cápsula de Bowman, originando las semilunas en el espacio de Bowman.

Las *glomerulopatías de tipo metabólico-mecánico* o no inflamatorias tienen su origen en cualquier proceso capaz de alterar patológicamente –de forma química o mecánica- las estructuras de la barrera de filtración glomerular ⁵. Una pérdida de función de la membrana basal glomerular lleva consigo un conjunto de manifestaciones clínicas denominadas *síndrome nefrótico*, que incluye proteinuria severa (más de 3 gramos/día), hipoalbuminemia, edema, hiperlipemia y lipiduria, y se observa una reducción de la tasa de filtración glomerular, pero sin presencia de hematuria ¹⁴. Numerosas glomerulopatías, entre ellas las de tipo metabólico-mecánico, presentan como característica alteraciones estructurales en el glomérulo que resultan del exceso de deposición de MEC. Este proceso se denomina *glomerulosclerosis*, y origina cambios funcionales que se ponen de manifiesto en la reducción progresiva de la tasa de filtración glomerular, el desarrollo de proteinuria de origen glomerular y el establecimiento de una hipertensión dependiente del aumento de volumen extracelular ⁷. Las causas de estas glomerulopatías de tipo metabólico-mecánico se encuentran en alteraciones tóxicas, infecciones, neoplasias así como en enfermedades metabólicas y hereditarias. La nefropatía hipertensiva y la nefropatía diabética se encuentran entre las glomerulopatías más frecuentes de este tipo. Por último, cabe destacar que incluso las glomerulopatías no inflamatorias cursan con inflamación, que siempre es un mecanismo clave para la progresión de la enfermedad, así como una buena diana terapéutica ^{5,15}.

1.3. Enfermedades renovasculares

Las enfermedades renovasculares son un grupo de condiciones progresivas que implican la disfunción y el daño renal debidos al estrechamiento o bloqueo de los vasos sanguíneos renales ⁵. Según el “U.S. Renal Data System (2002)” se considera que un tercio de todos los casos de estadio final de enfermedad renal crónica están relacionados con enfermedades renovasculares ⁵.

Estas enfermedades normalmente aparecen como microangiopatías, aunque las oclusiones de las arterias renales, las trombosis en las venas renales y los ateroembolismos renales son también causas potenciales.

La aterosclerosis induce el 70-90% de los casos de estenosis renal y es la lesión predominante en pacientes mayores de 50 años ^{16,17}, mientras que otros casos se deben a displasia fibromuscular. Existe otro grupo de condiciones fibróticas idiopáticas que afectan a la lámina media y a la adventicia de los pequeños vasos, y que es más frecuente en mujeres de mediana edad ⁵. También existen otras causas menos frecuentes de estenosis como la presión externa (por ejemplo la generada por un tumor), la oclusión parcial (tras un trasplante renal), así como por nefroangioesclerosis, enfermedad tromboembólica renal, enfermedad ateroembólica renal, etc ^{5, 18, 19}. La enfermedad renal crónica es un posible resultado de la estenosis, a pesar de que la hipoperfusión debida a la estenosis no es sinónimo de enfermedad renal.

Las enfermedades renovasculares pueden alterar la estructura y función renal mediante i) estrés oxidativo, disfunción endotelial e inflamación inducida por la aterosclerosis y que conlleva la aparición de fibrosis y una menor filtración, ii) hipoperfusión y condiciones isquémicas que afectan el flujo sanguíneo renal y a la función glomerular y tubular y iii) el inicio de la hipertensión ⁵.

2. LA FIBROSIS RENAL

2.1. La fibrosis, aspectos comunes

La fibrosis es un fenómeno común a numerosas patologías, caracterizado fundamentalmente por una deposición excesiva de MEC, y que da lugar a una disminución de la funcionalidad del órgano. La progresión de enfermedades crónicas en órganos como el riñón, corazón, hígado o pulmón está asociada a la fibrosis ²⁰. Además, en otros órganos la fibrosis tiene un papel importante: en la piel la fibrosis causa escleroderma ²¹, en las articulaciones está relacionada con la artritis reumatoide y en la médula ósea puede causar los síndromes mielodisplásicos ²⁰.

Como se ha explicado previamente, los mecanismos que se asocian con fibrosis en los distintos órganos guardan numerosas similitudes. Una de las características fundamentales es la presencia de fibroblastos activados, en numerosas ocasiones denominados *miofibroblastos*, que son las células que mayoritariamente expresan las proteínas de MEC, las cuales posteriormente se acumulan en el tejido fibrótico ²². Otra de las características fundamentales es la rarefacción microvascular y la consiguiente disminución de la perfusión tisular. Esta menor perfusión va a causar hipoxia en el tejido fibrótico. La hipoxia induce a su vez fibrogénesis gracias a la acción del factor inducible de hipoxia α (HIF α). Otro aspecto común que se observa en todos los tejidos con fibrosis es un daño en las células del parénquima del órgano: hepatocitos en el hígado, cardiomiocitos en el corazón, y nefronas en el riñón. En algunos casos la fibrosis se asocia a la inflamación ²⁰.

2.2. La fibrosis renal

La fibrosis renal está caracterizada por la acumulación de MEC y es la consecuencia final de aquellas lesiones renales que desencadenan una insuficiencia renal crónica terminal. Así, aunque la lesión puede originarse en el compartimento glomerular (como la glomeruloesclerosis) o en el túbulo-intersticial, la consecuencia final será una fibrosis global, con un gran componente de afectación túbulo-intersticial. De esta forma, el mejor predictor de la supervivencia renal en la enfermedad renal crónica es el grado de fibrosis túbulo-intersticial ²³

2.3. Mecanismos celulares y moleculares que desencadenan la fibrosis renal

La fibrosis renal se inicia probablemente como un mecanismo beneficioso de defensa en respuesta a un daño inicial. Si alguna de las fases de esta respuesta no se regula correctamente, se origina una fibrosis patológica que dar lugar a glomeruloesclerosis, atrofia y dilatación tubular, fibrosis túbulo-intersticial y rarefacción de los capilares glomerulares y peritubulares ²⁴.

La fibrosis renal intersticial se considera una característica fundamental de la enfermedad renal progresiva. Además, se puede correlacionar muy bien con el grado de deterioro de la función renal ²².

La **glomeruloesclerosis** se caracteriza fundamentalmente por una acumulación de MEC en el glomérulo, principalmente en el mesangio glomerular. Dicha acumulación de MEC da lugar a un estrechamiento de los capilares glomerulares y a una disminución en la tasa de filtración glomerular. Numerosos tipos celulares participan en este proceso, siendo los más importantes las células mesangiales, epiteliales y endoteliales, ya que expresan citoquinas y moléculas de adhesión, así como otros mediadores de la inflamación. Los podocitos juegan un importante papel en la secreción de proteínas como la angiotensina II y otras citoquinas como el factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1) que van a desempeñar un papel clave en la glomeruloesclerosis. Las células mesangiales participan sintetizando MEC, manteniendo la estructura del glomérulo y secretando numerosas citoquinas. Son, por tanto, las causantes de la fibrosis glomerular, especialmente en la nefropatía diabética, donde tiene lugar una gran expansión de la matriz mesangial. Las células endoteliales participan en este proceso ya que juegan un papel esencial en la permeabilidad. Cambios en la permeabilidad capilar modifican la filtración glomerular ²⁵.

La **fibrosis túbulo-intersticial** se caracteriza por una excesiva acumulación de componentes de MEC como fibronectina y colágenos tipo I, III y V, y la presencia y proliferación de miofibroblastos ^{22, 26, 27}. Otros fenómenos que tienen lugar durante la fibrosis túbulo-intersticial son la infiltración de células inflamatorias y la apoptosis de las células del epitelio tubular ²⁸, dando lugar a la atrofia del túbulo ²⁹.

2.3.1. Principales tipos celulares implicados en la fibrosis túbulo-intersticial.

a) Fibroblastos y miofibroblastos

El intersticio de un riñón adulto normal contiene fibroblastos y células dendríticas ³⁰. Los fibroblastos son células de forma estrellada con un núcleo marcado y estrellado y un

abundante retículo endoplasmático. Se caracterizan también por la presencia de gránulos de colágeno y filamentos de actina en su citoplasma. Los fibroblastos no son una población celular homogénea ya que sus características difieren según su localización en los distintos órganos ³¹.

Debido a varios factores como el estrés mecánico y diversas citoquinas, los fibroblastos adquieren características de miofibroblasto. Los miofibroblastos difieren de los fibroblastos en que contienen fibras de estrés, poseen numerosos miofilamentos en su superficie y un núcleo redondeado ^{24, 30}. Uno de los principales marcadores de miofibroblastos es la actina de músculo liso vascular (α -SMA), cuya función en dichas células está relacionada con la contractilidad. También existen otros marcadores como la vimentina, la fibronectina, o la proteína marcadora de fibroblastos o miofibroblastos S100A4, también conocida como FSP-1 (*fibroblast specific protein-1*). Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que esta proteína también se expresa en leucocitos u otras células inflamatorias, sugiriendo que no es un marcador específico de fibroblastos ^{32, 33}.

La activación de los fibroblastos

Han sido muchos los estímulos que se han relacionado con la activación de los fibroblastos, generalmente asociados al daño tisular. Los fibroblastos residentes se activan por estimulación con citoquinas como el TGF- β 1, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) ³⁴⁻³⁶. Además, existen otros mecanismos de activación como el contacto célula-célula, especialmente con monocitos y macrófagos, la interacción de las integrinas con la MEC y algunos otros estímulos como la hipoxia y la hiperglicemia ²².

¿De dónde proceden estos miofibroblastos?

Hay numerosos estudios sobre la procedencia de estos miofibroblastos que se acumulan en el intersticio tubular renal y que juegan un papel fundamental en el desarrollo de la

fibrosis renal, ya que son la fuente principal de proteínas de MEC. Los miofibroblastos pueden derivar de diferentes orígenes y mecanismos ³⁷:

- 1) Fibroblastos intersticiales residentes que proliferan.
- 2) Células derivadas de médula ósea.
- 3) Células epiteliales tubulares que sufren la transición epitelio-mesénquima (TEM)
- 4) Células endoteliales que sufren el proceso de transición endotelio-mesénquima
- 5) Otros tipos celulares como pericitos vasculares o fibrocitos que se desdiferencian y adquieren un fenotipo de miofibroblasto.

Un trabajo reciente sobre el origen de los miofibroblastos en la fibrosis renal señala que un 50% derivan de fibroblastos residentes que proliferan, un 35% procederían de la transdiferenciación de células de la médula ósea, un 10% de la transición endotelio-mesénquima, mientras que los fibroblastos que proceden de la TEM representarían tan solo el 5% ³⁸.

b) Células epiteliales tubulares

Las células epiteliales tubulares tienen una participación relevante en el desarrollo de la fibrosis renal. Su papel radica en servir como fuente de miofibroblastos en el proceso de TEM y también mediante otra serie de mecanismos. El daño en las células epiteliales tubulares produce proteinuria y puede dar lugar a una activación del sistema del complemento pudiendo desembocar en fibrosis renal ³⁹. Por otro lado, la apoptosis y autofagia que se producen en dichas células en situaciones de daño renal favorece la aparición de fibrosis renal, tal y como se ha demostrado en modelos experimentales ^{40, 41}.

La transición epitelio-mesénquima (TEM)

La TEM es un proceso mediante el cual las células epiteliales sufren una serie de cambios morfológicos que les confieren un fenotipo mesenquimal y apariencia de miofibroblasto, pudiendo sintetizar proteínas de MEC a la vez que expresan los propios marcadores de miofibroblastos como α -SMA, vimentina, vitronectina y fibronectina ⁴²⁻⁴⁴.

Al mismo tiempo, estas células pierden la expresión de proteínas de adhesión como E-cadherina y ZO-1 (*zónula ocludens-1*)⁴³.

Este fenómeno de TEM ocurre en algunos procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario y en otros procesos patológicos como son la metástasis tumoral y los procesos fibróticos⁴³.

En la fibrosis renal, numerosos autores han señalado que las células del epitelio tubular sufren el proceso de TEM por acción de numerosas citoquinas entre las que se encuentra el TGF- β 1. Además, en modelos experimentales de fibrosis renal se ha detectado el marcador de miofibroblastos S100A4 en numerosos túbulos dañados tanto en situaciones de fracaso renal agudo como crónico, lo cual indica que en esos riñones está ocurriendo el fenómeno de TEM⁴⁵. Sin embargo, otros autores dudan de que la TEM tenga algún papel relevante *in vivo*⁴⁶.

c) Células endoteliales

Como se indicó anteriormente, la fibrosis renal avanzada se asocia con hipoxia y rarefacción de los capilares peritubulares. La hipoxia además produce fibrosis, estableciendo un círculo vicioso²⁴. Por otro lado, las células endoteliales también se han considerado una fuente de fibroblastos vía transición endotelio-mesénquima, mecanismo que sugiere también un origen endotelial de los miofibroblastos⁴⁷. Por otro lado, los capilares peritubulares también juegan un papel importante en la fibrogénesis. Se ha demostrado en mutantes de proteínas como Crim1 que la permeabilidad de algunos capilares origina una excesiva acumulación de proteínas como colágeno I dando lugar a la fibrosis⁴⁸.

d) Monocitos y macrófagos

Tanto los monocitos como los macrófagos juegan un papel fundamental en el desarrollo de la fibrosis renal, debido a que liberan mediadores profibróticos como galectina-3, Wnt y CSF-1^{49,50}. La gran mayoría de macrófagos que aparecen en el riñón

fibrótico proceden de la infiltración desde los primeros momentos de la enfermedad ⁵¹. Sin embargo, existen numerosas poblaciones de macrófagos, probablemente diferenciados en su función, que están implicados en la resolución o en la promoción de la fibrosis ²⁴.

Otros tipos celulares que participan en el desarrollo de la fibrosis son los fibrocitos, las células dendríticas y los mastocitos.

2.3.2. Principales citoquinas participantes en la fibrosis renal

Son numerosas las citoquinas que participan en el desarrollo de la fibrosis renal, y pueden dividirse en varios grupos según su función: las que promueven inflamación o infiltración de células inflamatorias denominadas **proinflamatorias** (factor de necrosis tumoral o TNF- α , interleuquina 1 β o IL-1 β), las relacionadas con la síntesis de MEC o **fibrogénicas** (TGF- β 1, factor de crecimiento del tejido conectivo o CTGF, proteína morfogenética ósea-7 o BMP7), **mitogénicas** o factores de supervivencia (factor de crecimiento derivado de plaquetas o PDGF, interleuquina 6 o IL-6, factor de crecimiento epidérmico o EGF, factor de crecimiento de hepatocitos o HGF, factor de crecimiento insulínico-1 o IGF-1), relacionadas con la muerte celular (FasL, TNF- α), quimioquinas (proteína 1 quimioatrayente de monocitos o MCP-1, RANTES –“*Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted*”-), **citoquinas vasoactivas** (angiotensina II o endotelina), y **antiinflamatorias** (IL-4, IL-10 e IL-13).

Para considerar que una citoquina participa en la fibrosis renal hay que tener en cuenta una serie de criterios:

- Producción local incrementada durante la fibrosis renal y generalmente asociada a su acción biológica en este fenómeno.
- Modulación de la biología de las células renales *in vitro*, en procesos relacionados con la fibrosis.
- La administración in vivo modula (aumenta o disminuye) las lesiones renales.

a) Citoquinas proinflamatorias

Dentro de estas citoquinas se encuentran el TNF- α y la IL-1 β . Estas citoquinas actúan sobre células renales y células inflamatorias, amplificando la respuesta inflamatoria. La administración de estas citoquinas agrava la lesión glomerular o túbulo-intersticial, mientras que se ha demostrado que sus antagonistas disminuyen la fibrosis renal en diversos modelos experimentales de nefropatía.

b) Citoquinas fibrogénicas.

Dentro de este grupo se encuentran el TGF- β 1 y el CTGF. Dentro de este apartado es destacable otra citoquina que antagoniza el mecanismo de acción del TGF- β 1 en modelos experimentales de fibrosis renal, la BMP7.

Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1)

El TGF- β 1 pertenece a una superfamilia de moléculas pleiotrópicas entre la que se encuentra la subfamilia del TGF- β , las proteínas morfogénicas óseas (BMPs), las activinas, inhibinas, GDFs (factores de crecimiento y diferenciación) y GDNFs (factores neurotróficos derivados de la glía)⁵². Es una citoquina presente y con una participación fundamental en las patologías fibróticas en hígado⁵³, corazón⁵⁴, piel⁵⁵ y riñón²⁵.

Está muy aceptada la relación que existe entre esta citoquina y las enfermedades renales, debido a sus múltiples funciones en la fibrosis, inflamación, proliferación celular, apoptosis y diferenciación^{25, 56, 57}. Además, se ha demostrado en numerosos estudios la sobreexpresión de esta citoquina en varios modelos de enfermedad renal, así como se ha observado un incremento en la expresión de sus receptores⁵⁸⁻⁶¹.

Son múltiples los mecanismos en los que participa esta citoquina y que se relacionan con el desarrollo de la fibrosis: estimulación de la expresión de proteínas de MEC, inhibición de metaloproteasas de matriz y TEM. Además, el TGF- β 1 parece que juega un papel relevante en las alteraciones observadas en los vasos sanguíneos renales, glomérulos y túbulos en el riñón fibrótico²⁵. Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que

la inhibición de los receptores o de proteínas implicadas en la señalización del TGF- β 1 disminuye la fibrosis renal en distintos modelos experimentales ^{62, 63}.

La señalización intracelular del TGF- β 1 está mediada por receptores heterotriméricos con actividad serina/treonina quinasa y por proteínas citoplásmicas denominadas Smads ⁵². El TGF- β 1 se une a su receptor tipo II, T β RII para activar el receptor tipo I, T β RI y fosforilar las proteínas Smads. Se han descrito dos receptores tipo I principales para TGF- β 1: ALK5, o quinasa similar al receptor de activina 5 y ALK1, o quinasa similar al receptor de activina 1. De este modo ALK5 fosforila las proteínas Smad2 y Smad3 mientras que ALK1 fosforila Smad1 y Smad5 ⁶⁴⁻⁶⁶.

Además, el TGF- β 1 induce la activación de otras vías de señalización independientes de Smads, como la vías de MAPK/Erk1/2 y PI3K/Akt, que se han visto activadas en modelos experimentales de fibrosis renal ^{27, 67}.

TGF- β 1 y síntesis de proteínas de matriz extracelular

El TGF- β 1 actúa sobre la MEC a dos niveles fundamentales: promoviendo la expresión de las diferentes proteínas de MEC e inhibiendo la degradación de la misma. El TGF- β 1 induce un aumento en la transcripción, síntesis y secreción de proteínas de la MEC, incluidos colágeno tipo I, tipo III y tipo IV, fibronectina, laminina, y también glicoproteínas como osteopontina, osteonectina, tenascina, biglicano y decorina ⁶⁸⁻⁷⁰. Además, el TGF β 1 induce la expresión de otras citoquinas relacionadas con la expresión de proteínas de MEC, como el CTGF ⁷¹. Numerosos estudios han demostrado que la inhibición del receptor ALK5 de TGF- β 1 da lugar a una menor expresión de proteínas de MEC ⁷².

Por otro lado, el TGF- β 1 disminuye la degradación de la MEC a través de dos mecanismos: inhibiendo la síntesis de las metaloproteasas de matriz (MMPs) encargadas de la degradación de la MEC y estimulando la síntesis de los TIMPs (inhibidores tisulares de las metaloproteinasas). El TGF- β 1 también actúa estimulando la expresión de PAI-1, lo que se traduce en la inhibición del paso de plasminógeno a plasmina ⁷³.

TGF- β 1 y transición epitelio-mesénquima

Además de la implicación de esta citoquina en la expresión de proteínas de MEC, tiene una importante función en el desarrollo de la TEM. Numerosos estudios en células epiteliales en cultivo han demostrado que el TGF- β 1 induce la expresión de proteínas de fenotipo mesenquimal como vimentina, fibronectina, mientras que promueve una disminución en los marcadores epiteliales, como E-cadherina o ZO-1 ^{43,74}. Por otra parte, varios trabajos experimentales han demostrado que la inhibición del receptor tipo I para TGF- β 1 ALK5 da lugar a una disminución en el desarrollo de la fibrosis renal, ligada a una menor TEM en el riñón ^{62,63}.

Factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF)

El CTGF, también conocido como CCN2, es uno de los seis miembros de la familia de genes de respuesta temprana ^{75, 76}. La expresión de esta citoquina se regula por numerosas moléculas relacionadas con la fibrosis como TGF- β 1, angiotensina II, BMPs, el factor de crecimiento de granulocitos (GM-CSF), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y otros factores ambientales.

Numerosos estudios demuestran que el TGF- β 1 incrementa la expresión de CTGF en diferentes tipos celulares ⁷¹, a la vez que ambas citoquinas pueden actuar sinérgicamente en la fibrosis crónica. Algunos autores han demostrado que la administración de angiotensina II de forma sistémica induce la expresión de CTGF en células del epitelio tubular y del glomérulo, en un tiempo previo a la aparición de la acumulación de proteínas de MEC ⁷⁷. Además, la inhibición de CTGF mediante oligonucleótidos antisentido se relaciona con una disminución en la expresión de las proteínas de MEC en células de músculo liso vascular en cultivo ⁷⁸ e hipertrofia en células mesangiales en cultivo ⁷⁹. La administración de CTGF en rata produce un incremento en la expresión de proteínas de MEC en riñón a la vez que produce un aumento en la abundancia de células inflamatorias. Si se bloquea el mecanismo del

CTGF con parthenolide –inhibidor de NFκB– disminuyen drásticamente los marcadores de células inflamatorias a la vez que se reduce la fibrosis renal ⁷⁶.

Por otro lado, el CTGF induce TEM en el riñón. La expresión de CTGF en modelos experimentales de fibrosis renal se mantiene durante un tiempo y coincide con el inicio de la TEM ⁸⁰.

Proteína morfogenética ósea-7 (BMP7)

La BMP7 es otro miembro de la superfamilia del TGF-β que se une a un receptor tipo II de BMPs (BMPRII), que a su vez activa a un receptor tipo I (BMPRI) y fosforila las Smads 1 y 5. Durante la última década varios autores han indicado la importancia de esta citoquina proponiendo a esta molécula como terapia contra la fibrosis renal ⁸¹, ya que la administración exógena de esta proteína disminuye y revierte la fibrosis renal ⁸². En estudios *in vitro* con células epiteliales, el tratamiento con BMP7 recombinante humana incrementa la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina, neutralizando la acción del TGF-β1 en la TEM ⁸². De este modo, se planteó un modelo por el cual la proteína BMP7 –principalmente a través del receptor ALK3– activaría el promotor de la E-cadherina manteniendo el fenotipo epitelial de las células, mientras que el TGF-β1 reprimiría dicho promotor a través de ALK5/Smad3 y activaría la expresión de marcadores mesenquimales. Por otro lado, en modelos *in vivo* se ha demostrado que la administración exógena de BMP7 revierte la fibrosis renal inducida por maniobras experimentales tanto de forma crónica ⁸² como por obstrucción ureteral ⁸³.

El eje BMP7/ALK3 ha focalizado la atención de muchos estudios gracias al potencial terapéutico que puede ofrecer. Por este motivo, son muchos los agonistas del sistema como THR123 ⁸⁴ o la proteína Kielin/chordin (KCP), así como antagonistas e inhibidores que se han empleado en distintos estudios con el fin de modular la fibrosis renal: USAG-1, chordin, noggin, twisted gastrulation ⁸⁵.

c) *Factores de supervivencia:*

La importancia de este grupo de citoquinas en la fibrosis renal se debe a que promueven la proliferación de células que van a jugar un papel clave en el desarrollo de la fibrosis: células mesangiales en el glómerulo, y miofibroblastos en el intersticio tubular. También hay que tener en cuenta que dado que dichas citoquinas protegen frente a la apoptosis, pueden desempeñar mecanismos antifibróticos. Dentro de este grupo nos centraremos en PDGF, IL-6, EGF y HGF

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

El PDGF es un mediador de la fibrosis en diferentes órganos entre los que se incluye el riñón. Es uno de los mitógenos más potentes para células mesenquimales, entre los que se incluyen los miofibroblastos, donde promueven la expresión de proteínas de MEC ⁸⁶.

Existen cinco isoformas principales de esta citoquina: PDGF-CC, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB y PDGF-DD. Las isoformas del PDGF se unen a los receptores PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$ y PDGFR- α y transducen señales a través de distintas vías implicadas en la regulación de genes relacionados con la migración y proliferación celular y con la expresión de proteínas de MEC. Estas vías son fundamentalmente la vía de JAK/STAT, PI3K y MAPK. Estas isoformas se encuentran sobreexpresadas en la fibrosis renal. PDGF-DD se encuentra altamente expresada en fibroblastos intersticiales, tal y como se ha visto en el modelo experimental de fibrosis por obstrucción ureteral ⁸⁷. La inhibición de dicha citoquina con un anticuerpo neutralizante que actualmente se encuentra en ensayos clínicos disminuye de forma significativa la fibrosis túbulo-intersticial ⁸⁸. Por otro lado, se sabe que PDGF-BB y PDGF-DD –ligandos del receptor PDGFR- $\beta\beta$ - son importantes mediadores de la proliferación mesangial y que por ello están implicados en la glomerulonefritis mesangioproliferativa ⁸⁹.

La isoforma PDGF-CC se expresa *de novo* en el intersticio renal, ya que se asocia fundamentalmente a monocitos y macrófagos. La inhibición de dicha isoforma también disminuye la fibrosis renal. El efecto principal de esta isoforma es la inducción de la proliferación de fibroblastos y la infiltración de leucocitos ²⁴. Anticuerpos

neutralizantes contra PDGF-CC debilitan claramente el desarrollo de la fibrosis tubulointersticial inducida por obstrucción ^{24, 90}.

Interleuquina 6 (IL-6)

La IL-6 es una citoquina que estimula la proliferación de células mesangiales en cultivo y además actúa como un factor de supervivencia en muchos tipos celulares. La producción de esta citoquina aumenta en nefropatías glomerulares, aunque en algunas ocasiones puede proteger frente a la inflamación del glomérulo. El papel de la IL-6 en el desarrollo de la fibrosis túbulo-intersticial no está claro: a pesar de que muchos estudios describen un aumento en la expresión de esta citoquina en pacientes con fibrosis renal ⁹¹, la deficiencia de IL-6 no induce diferencias en la fibrosis túbulo intersticial tras la obstrucción ureteral unilateral (OUU)⁹¹.

Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)

El HGF es una citoquina descubierta durante la década de los ochenta a la que se atribuyeron funciones como la proliferación de hepatocitos y la regeneración hepática ⁹². Presenta propiedades mitogénicas y antiapoptóticas. Su administración retrasa el desarrollo de la glomerulosclerosis. Durante el fracaso renal agudo, existe una inducción de la expresión de esta proteína ^{93, 94}, la cual se ha relacionado con la protección frente a mecanismos inducidos por TGF- β 1 en la fibrosis: apoptosis tubular, activación de miofibroblastos y TEM ⁹⁵. Se ha postulado que las funciones antagónicas de HGF frente a TGF- β 1 se deben a un bloqueo de la translocación nuclear de las proteínas Smad2 y Smad3 ⁹⁵.

d) Quimioquinas

Las quimioquinas más importantes involucradas tanto en la glomerulosclerosis como en la fibrosis túbulo-intersticial son IL-8, quimotáctica para neutrófilos, MCP-1, quimiotáctica para monocitos y RANTES, quimiotáctica para monocitos y linfocitos T.

Las quimioquinas se unen a receptores específicos del endotelio, leucocitos y MEC. Juegan, por tanto, un papel fundamental en la infiltración de células inflamatorias gracias a su papel quimioatrayente que favorece la migración y adhesión celular.

e) Citoquinas vasoactivas

Dentro de este grupo se encuentran la angiotensina II y la endotelina-1. Además de ser péptidos vasoactivos, pueden comportarse como mitógenos y además inducir la producción de otras citoquinas profibróticas.

La **angiotensina II** juega un papel fundamental en la progresión del daño renal contribuyendo al desarrollo de la fibrosis. Numerosos estudios en cultivos celulares han demostrado que la angiotensina II activa células renales para producir factores profibróticos como el TGF- β 1 y para expresar proteínas de MEC ⁹⁶⁻⁹⁸. La inhibición de la enzima convertidora de angiotensina reduce la expresión del CTGF y la consecuente fibrosis renal ⁷⁸. Por otro lado, se ha demostrado que la angiotensina II juega un papel clave en la inflamación renal. En un modelo de fibrosis renal por OUU, la angiotensina II regula la respuesta inflamatoria a través de la vía de señalización de NF κ B ⁹⁹.

Los dos receptores de angiotensina II, AT₁ y AT₂, están implicados en la fibrosis e inflamación renal por mecanismos distintos: AT₁ está mayoritariamente implicado en la fibrosis, ya que activa proteínas Smads y proteínas RhoA, directamente implicadas en este fenómeno. Por otro lado, tanto AT₁ como AT₂ juegan un papel fundamental en la inflamación, ya que la activación de dichos receptores activa a su vez la vía de señalización de NF κ B que a su vez regula la expresión de numerosos genes proinflamatorios como citoquinas y moléculas de adhesión ⁹⁷.

2.4. Perspectivas terapéuticas de la fibrosis renal y líneas de investigación actuales.

Gran parte de los estudios experimentales sobre fibrosis renal han ido encaminados hacia la búsqueda de posibles estrategias terapéuticas para la inhibición de la mayor

parte de las rutas de señalización anteriormente mencionadas. Para ello se realizan maniobras experimentales de fibrosis y daño renal *in vivo* como el modelo de OUU ³⁷, o el modelo de reducción de masa renal (RMR) ⁵⁹ combinadas con la administración de los inhibidores de dichas rutas de señalización; también se construyen animales transgénicos que sobreexpresan o no expresan un determinado gen.

En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios con inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina o con inhibidores de los receptores de la angiotensina, con buenos resultados ¹⁰⁰. También se ha estudiado la inhibición del CTGF en modelos animales observándose una disminución de la fibrosis renal ⁷⁵.

Con respecto al TGF- β 1, se han utilizado varios inhibidores de sus receptores tipo I ALK5 y receptor tipo II, con los que se ha visto una significativa disminución de la fibrosis renal ^{62, 101}. Además, se han realizado numerosos estudios con ratones deficientes de genes implicados en la ruta de señalización del TGF- β 1 como Smad2, Smad3 y Smad4 en los que se ha inferido el papel que estas proteínas desempeñan en la fibrosis renal inducida por TGF- β 1 ^{63, 102, 103}. Sin embargo, la molécula que ha despertado un mayor interés como posible terapia contra la fibrosis renal es BMP-7. Como se señaló en el apartado correspondiente, numerosos trabajos de investigación señalan a esta citoquina como una potencial protectora frente a la fibrosis renal. BMP-7 tiene una gran capacidad de revertir la fibrosis renal y además de restaurar la estructura tubular del riñón ⁸¹.

El PDGF también ha sido objeto de estudio por numerosos autores. Como se explicó anteriormente, un anticuerpo neutralizante de la isoforma PDGF-DD se encuentra actualmente en ensayos clínicos como posible candidato para el tratamiento de la fibrosis renal. Además también se ha estudiado la inhibición de vías de señalización activadas por PDGF como c-Abl para lo que se han empleado moléculas como Imatinib mesylate. Otros estudios se han realizado también inhibiendo citoquinas como VEGF y HGF ¹⁰⁰.

Sin embargo, el mayor problema que se encuentra en la inhibición de estas citoquinas es que muchas de ellas son pleiotrópicas, actuando en numerosos tejidos, y

dependiendo del tipo celular pueden ejercer funciones distintas. Por ello se necesitan terapias más específicas y vectorizadas hacia la diana donde deben ejercer su función.

3. LA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

Se conoce como MEC a la red organizada formada por el ensamblaje de polisacáridos y de proteínas secretadas por las células. Esta red actúa como elemento estructural en los tejidos y también influye en su desarrollo y su fisiología ¹⁰⁴. La síntesis de MEC y su degradación constituyen un mecanismo fisiológico muy importante que tiene por finalidad el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. Entre las funciones que tiene la MEC se encuentran la aportación de propiedades mecánicas a los tejidos, el mantenimiento de la morfología de las células, la adhesión de las células a los tejidos, la comunicación intercelular, la modulación de la diferenciación y fisiología celular y la regulación de la acción de numerosos factores de crecimiento ¹⁰⁴.

Las principales moléculas que constituyen la MEC son: colágeno, elastina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas. Las MECs de los diferentes tejidos se distinguen en función de la cantidad, proporción y tipo de cada una de estas moléculas ¹⁰⁴, ya que la composición de la MEC varía en función del tipo celular que la genera y además numerosos componentes aparecen únicamente en condiciones patológicas. La MEC que se sintetiza por los fibroblastos activados está formada por colágeno tipo I, fibronectina y algunos glicosaminoglicanos como el dermatán sulfato y el condroitín sulfato. Si los fibroblastos están en estado quiescente, sintetizan colágenos tipo V y VI ¹⁰⁴.

Como se ha explicado anteriormente, la MEC está sometida a una remodelación continua, un proceso que implica la degradación de los componentes existentes y la síntesis y deposición de nuevas moléculas ^{105, 106}. Numerosas citoquinas que se tratan a lo largo del capítulo están implicadas en la expresión de proteínas de MEC, mientras que la degradación de la MEC está mediada por proteasas específicas secretadas por las células. Dichas proteasas pertenecen fundamentalmente a dos familias: MMPs y plasminógeno/plasmina ¹⁰⁷.

4. EL MECANISMO DE ACCIÓN DEL TGF- β 1 Y SU PARTICIPACIÓN EN LA FIBROSIS RENAL

Los receptores tipo I y tipo II presentan estructuras similares, constituidas por una pequeña secuencia extracelular rica en cisteína, una región transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad quinasa de residuos de serina y treonina. El receptor tipo II, que está constitutivamente fosforilado incluso en ausencia de ligando, es capaz de unir TGF β ¹⁰⁸.

En los procesos fibróticos se ha observado un aumento en la expresión de los receptores señalizantes de TGF β ^{58, 109-116}. En fibroblastos, la sobreexpresión de los receptores de TGF- β induce un aumento en la transcripción del gen de colágeno ¹¹⁰. Por otro lado, la inhibición específica del receptor tipo I de TGF- β 1 produce un descenso en la expresión de las proteínas de MEC ⁷². Además, se ha comprobado que la sobreexpresión de un dominante negativo del receptor tipo II de TGF- β mejora la fibrosis hepática ¹¹⁷. Por otra parte, la ausencia del receptor tipo II de TGF- β da lugar a una disminución de la fibrosis renal y de la inflamación inducida por OUU¹⁰¹.

Además de los receptores tipo I y tipo II anteriormente descritos, el sistema de receptores de TGF β incluye los receptores no señalizantes betaglicano (conocido también como receptor tipo III) y endogлина. Estos dos receptores presentan una estructura similar con un 63% de homología en las regiones transmembrana y citoplasmática ¹¹⁸⁻¹²⁰.

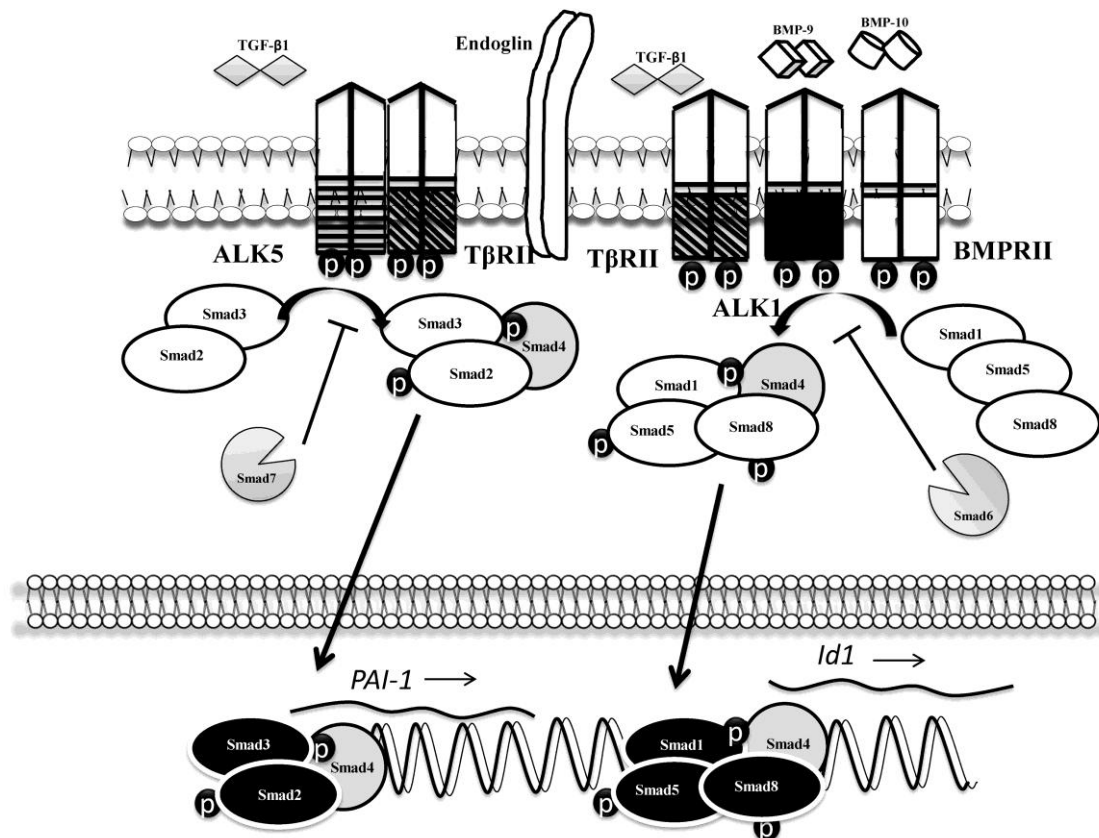


Figura 3. Modelo propuesto de la señalización inducida por TGF-β1 en células endoteliales, tipo celular donde más se han estudiado estos mecanismos. TGF-β1 induciría la fosforilación de las proteínas Smad2 y Smad3 a través del receptor ALK5, teniendo como producto final de la vía a PAI-1, mientras que induciría la fosforilación de las proteínas Smad1, Smad5 y Smad8 a través de ALK1, teniendo como producto final de la vía a Id1. La proteína Smad4 actúa como Smad coactivadora, mientras que las proteínas Smad6 y Smad7 actuarían como Smad inhibitorias. ALK1: Activin receptor-like kinase 1, ALK5: Activin receptor-like kinase 5, BMP9: Proteína morfogenética ósea 9. TβRII: Receptor tipo II de TGF-β. BMPRI: Receptor tipo I para BMP. BMPRII: Receptor tipo II para BMP. TGF-β1: Factor de crecimiento transformante beta 1. TβRI: Receptor tipo I para TGF-β. TβRII: Receptor tipo II para TGF-β. Extraída de Muñoz-Félix et al, 2014

La señalización se inicia con la unión del TGFβ1 al receptor tipo II, que recluta al receptor tipo I y lo fosforila activando y propagando así la señal. Los sustratos de estos receptores son las proteínas Smads, que una vez activadas se trasladan desde el citoplasma hasta el núcleo donde actuarán como factores transcripcionales, controlando la expresión génica ¹²¹. Para que las Smads sean funcionales deben tener acceso a los receptores, deben poder activarse por fosforilación y también deben ser capaces de activar la transcripción de otros genes en el núcleo. Las Smads regulan la transcripción génica por los siguientes mecanismos: unión directa a secuencias de ADN ¹²², interacción con factores de transcripción unidos al ADN, reclutamiento de co-

activadores, etc. ^{121, 123}.

La familia de proteínas Smad consta de ocho miembros que se agrupan en tres subfamilias según su estructura y su función: R-Smads (Smads activadas por el receptor: Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, Smad8), Co-Smads (Smad mediadoras comunes o coactivadoras: Smad4) e I-Smads (Smads inhibitoras: Smad6, Smad7). A pesar de que la función de las Smads es esencial para muchas acciones fisiológicas del TGF β y otras citoquinas relacionadas, es posible que algunas respuestas transcripcionales no impliquen la actuación de las Smads ⁵². Uno de los sistemas biológicos donde mejor se ha estudiado la señalización del TGF- β 1, sus receptores y la señalización por Smads es el endotelio. En células endoteliales, TGF- β 1 activaría la vía de señalización de Smad1/5/8 a través del receptor ALK1 promoviendo la proliferación y migración endotelial, mientras que en otras circunstancias, TGF- β 1 activaría la vía de señalización de Smad2/3 a través del receptor ALK5 promoviendo la expresión de proteínas de MEC y la consiguiente quiescencia del endotelio ^{65, 124-126}. En otros tipos celulares la activación de ALK1 y ALK5 puede tener consecuencias diferentes a las observadas en células endoteliales. Por otro lado, hay que insistir en que la vía de señalización de Smad1/5/8 se ha relacionado en la mayor parte de los casos con el mecanismo de acción de las BMPs ¹²⁷ a través de sus receptores correspondientes (ALK2, ALK3, ALK6) ^{128, 129}.

Tradicionalmente, el receptor tipo I para TGF- β 1 ALK5 se ha relacionado con el desarrollo de la fibrosis renal, así como con otros mecanismos implicados en patologías renales, como la rediferenciación tubular ^{81, 130}. La activación de Smad3 promueve la síntesis de proteínas de MEC como fibronectina y colágeno I, además de factores profibróticos como el CTGF y PAI-1 ^{63, 131}. Ratones deficientes de Smad3 desarrollan una menor fibrosis renal tras la OUU que sus respectivos controles y presentan una menor TEM ⁶³. Además, ratones deficientes de Smad4 también desarrollan un menor grado de fibrosis túbulo-intersticial tras esa maniobra experimental ¹⁰³. Por otro lado, se ha demostrado que la activación de la vía de señalización de Smad2 protege contra la fibrosis renal inducida por TGF β 1/Smad3 ¹⁰². Mientras que existen suficientes evidencias en la literatura científica sugiriendo un papel fundamental para el receptor

ALK5, existen muy pocas referencias que relacionen la implicación del receptor ALK1 en esta patología ¹¹⁶.

5. Activin receptor-like kinase 1 (ALK1)

ALK1 es un receptor de superficie de la familia de proteínas del TGF- β . ALK1 interactúa con cuatro ligandos diferentes: TGF- β 1 y TGF- β 3, en un complejo con el T β RII, y con BMP9 y BMP10 en un complejo con el receptor tipo II de activina (ActRIIA) o con el receptor tipo II de BMPs (BMPRII). La activación de ALK1 induce la fosforilación de las proteínas Smad1/5/8 que dimerizan con Smad4; este complejo se transloca al núcleo y regula la transcripción de genes específicos ⁵². ALK1 se expresa fundamentalmente en células endoteliales y tiene un papel crítico en la regulación del desarrollo y en la angiogénesis patológica ^{64, 65, 71}, pero también se expresa en otros tipos celulares ^{114, 126}. ALK1 está implicado en la enfermedad de Rendu-Osler-Weber, también conocida como telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT) de tipo 2, una displasia vascular relacionada con mutaciones inactivantes de ALK1. El papel de ALK1 en angiogénesis no está claro ¹³²⁻¹³⁴ aunque es una de las funciones más ampliamente estudiadas y revisadas hasta la fecha para este receptor ^{126, 132}.

Las proteínas morfogenéticas óseas BMP9 y BMP10 fueron descritas como potentes ligandos del receptor ALK1, ya que desde concentraciones muy bajas estimulan la vía de señalización de ALK1/Smad1/8 y la activación del promotor BRE (*BMP response element*) ¹³⁵. Además, numerosas funciones de BMP9 in vivo están atribuidas al receptor ALK1 ^{136, 137}.

Para un estudio más amplio sobre la estructura, expresión, funciones y, especialmente, el papel de ALK1 en la angiogénesis y homeostasis vascular presento en esta memoria de tesis doctoral la siguiente revisión bibliográfica:

“González-Núñez M*, Muñoz-Félix JM*, López-Novoa JM. The ALK-1/Smad1 pathway in cardiovascular physiopathology. A new target for therapy?. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Oct;1832(10):1492-510. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.05.016. Epub 2013 May 22. *Review*”.

Hasta el momento existen pocas evidencias sobre la implicación del receptor ALK1 en la fibrosis renal. Una de las primera evidencias del papel de ALK1 en fibrosis fue un estudio que relacionaba la activación de ALK1 con el proceso de transdiferenciación de las células estrelladas hepáticas en miofibroblastos, y la consecuente fibrosis hepática ⁵³. Posteriormente fue descrito que la activación de la vía de ALK1/Smad1 estaba relacionada con las propiedades fibrogénicas de los fibroblastos con escleroderma ¹³⁸, ¹³⁹. Otros hallazgos importantes fueron realizados en condrocitos humanos para el estudio de la osteoartritis, donde se observó que la relación ALK1/ALK5 regulaba la síntesis de proteínas de MEC como colágeno y agregano. De esta forma, un aumento en la activación de la vía de ALK1/Smad1/5 daba lugar a una menor síntesis de estas proteínas, mientras que el aumento en la activación de la vía de ALK5/Smad2/3 daba lugar a una mayor síntesis de proteínas de MEC ¹⁴⁰, ¹⁴¹. Con respecto a la fibrosis renal, un estudio ha mostrado que los ratones deficientes de ALK1 (ALK1^{+/-}) desarrollan una menor fibrosis inducida por irradiación. Sin embargo, en estos ratones heterocigotos de ALK1 se observaron mayores niveles de expresión de algunas citoquinas inflamatorias como IL-1 α , moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 y niveles más altos de algunas proteínas relacionadas con la MEC como colágeno tipo III y CTGF ¹¹⁶.

Dados estos antecedentes, y para profundizar en el posible papel de la vía de ALK1/Smad1/5 en la fibrosis tisular, presento en esta memoria de tesis doctoral la siguiente revisión bibliográfica:

“**Muñoz-Félix JM***, González-Núñez M*, López-Novoa JM. ALK1-Smad1/5 signaling pathway in fibrosis development: friend or foe? Cytokine Growth Factor Rev. 2013 Dec;24(6):523-37. doi: 10.1016/j.cytogfr.2013.08.002. Epub 2013 Sep 13.*Review.*”

6. ENDOGLINA

La endoglina o CD105 es una proteína transmembrana homodimérica de 180 kDa, cuyas subunidades están unidas por puentes disulfuro ¹⁴². Está presente en varios tipos celulares, siendo su máxima expresión en células endoteliales proliferantes ¹⁴³, pero también en macrófagos ¹⁴⁴, células estromales de la médula ósea ¹⁴⁵, células de músculo liso vascular ¹⁴⁶ o placenta, particularmente en los sincitiotrofoblastos ^{147, 148}. Es interesante destacar que la endoglina se expresa en células productoras de MEC y relacionadas con procesos fibróticos, incluyendo células mesangiales ¹⁴⁹, fibroblastos cardíacos ¹⁵⁰, fibroblastos de piel ^{55, 151}, fibroblastos renales ⁶⁰, células estrelladas hepáticas ^{152, 153} y fibroblastos portales ¹⁵³.

Las mutaciones en el gen que codifica la endoglina, que causan una menor expresión de esta proteína en los vasos sanguíneos, originan una enfermedad conocida como síndrome de Rendu-Ostler-Weber o HHT tipo 1, que se caracteriza por la presencia de epistaxis, telangiectasias y malformaciones arteriovenosas en distintos órganos ¹³⁴.

Se han descrito dos isoformas de endoglina: L-endoglina, de *large* o *long*, y S-endoglina, de *small* o *short*, con capacidad de unir TGF- β 1 y que se originan por splicing alternativo ⁷¹. Ambas isoformas difieren únicamente en su dominio citoplasmático. La L-endoglina está formada por 633 aminoácidos, 47 de los cuales forman el dominio intracelular, mientras que la S-endoglina, con 600 aminoácidos, posee un dominio citoplasmático de 14 aminoácidos, teniendo ambas isoformas sólo siete aminoácidos en común en su región intracelular ¹⁵⁴. Mientras que la L-endoglina es la forma predominante, poco se conoce de la S-endoglina: se ha señalado que puede actuar como antiangiogénica ¹⁵⁵ y que aumenta su expresión en células endoteliales senescentes donde regula negativamente la expresión de eNOS ¹⁵⁶. Por otro lado, en mioblastos de rata L6E9 se ha descrito que la L-endoglina promueve la señalización de TGF- β 1 hacia la vía de Smad1/5/8, contribuyendo a una inhibición de las proteínas de MEC, mientras que la S-endoglina promueve la señalización de TGF- β 1 hacia la vía de Smad2/3 promoviendo la expresión de proteínas de MEC ⁷¹. Además de las isoformas

de membrana, existe también una isoforma truncada –que contiene solamente una parte del dominio extracelular- conocida como endogлина soluble (sEng), cuya presencia se ha descrito en plasma¹⁵⁷.

La expresión de endogлина aumenta considerablemente con la fibrosis renal, tal y como se ha demostrado en pacientes ¹⁵⁸, y en distintos modelos experimentales de fibrosis renal, como la RMR⁵⁹, la OUU ^{60, 61}, o la fibrosis inducida por radiación ¹¹⁵. Además de en tejido fibrótico renal, se han observado altos niveles de expresión de endogлина en escleroderma ²¹ o en fibrosis cardíaca ⁵⁴.

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que la endogлина modula la síntesis de proteínas de MEC inducida por TGF- β 1 ^{71, 149, 159, 160}. Sin embargo el papel de la endogлина en el desarrollo de la fibrosis renal no está claro ⁶⁰.

Una de los efectos más importantes de la endogлина en el mecanismo de acción de TGF- β 1 es el incremento de la activación de la vía de ALK1/Smad1/5/8 en células endoteliales ¹²⁴. Sin embargo, otros estudios posteriores sugirieron que la endogлина potenciaba la vía de ALK5/Smad2/3 en células endoteliales dando lugar a un incremento de la expresión de eNOS ¹⁶¹. Posteriormente se demostró que en mioblastos de rata L6E9 era la L-endogлина la que potencia la señalización de TGF- β 1 hacia la vía de Smad1/5/8 mientras que la S-endogлина favorece la vía de Smad2/3 ⁷¹.

Para un conocimiento más amplio sobre la relevancia de la endogлина en la fibrosis renal, presentamos en esta memoria la siguiente revisión bibliográfica:

“**Muñoz-Félix JM***, Oujo B*, López-Novoa JM. The role of endoglin in kidney fibrosis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. Expert Rev Mol Med. 2014 Dec 2;16:e18

7. LA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA 9 (BMP9)

Las BMP son proteínas multifuncionales de la superfamilia del TGF- β . Esta familia está formada por más de 15 ligandos en mamíferos, y puede dividirse en 7 grupos según su homología y función: BMP2 y 4; BMP5, 6 y 7; GDF5, 6 y 7; GDF 8 y 11; BMP9 (GDF-2) y 10; GDF1, 2, 3 y 10, y BMP3. Estas proteínas fueron caracterizadas por su capacidad

para inducir la formación del hueso y del cartílago, la reparación de fracturas y la regulación del crecimiento y la diferenciación de condroblastos y osteoblastos *in vitro*^{162, 163}.

Es muy conocido el papel central que juegan las BMPs en el desarrollo temprano, incluyendo el patrón dorso-ventral, la organogénesis y la diferenciación celular ¹⁶⁴. Además, en los últimos años se ha considerado al conjunto de las BMPs como reguladores de la homeostasis tisular en organismos adultos ^{129, 164}. Varios estudios han demostrado que las BMPs regulan un amplio rango de actividades biológicas como la proliferación, diferenciación, migración, quimiotaxis y muerte celular en diferentes tipos celulares ¹⁶⁴.

Sistema de receptores de BMP9

Las BMPs se unen a complejos de receptores heterotetraméricos en la membrana celular, constituidos por dos subtipos diferentes de receptores transmembrana con actividad serina-treonina quinasa: los receptores tipo I y los de tipo II. De los siete receptores tipo I que se han identificado hasta la fecha (ALK1-7), cuatro están implicados en la señalización inducida por BMPs: ALK1, ALK2, ALK3 y ALK6. Por otro lado, tres receptores tipo II se unen a BMPs: BMPRII –el receptor tipo II-, ActRIIA –receptor tipo IIA de activina-, y ActRIIB –receptor tipo IIB de activina- ¹⁶⁴. Al contrario que el TGF- β y las activinas, muchas BMPs reconocen en primer lugar el receptor tipo I, debido a la alta afinidad que presentan por esta molécula, y después reclutan el receptor tipo II ¹⁶⁵. BMP9 se une con alta afinidad al receptor ALK1 y ActRIIB, pero con baja afinidad también se une a ALK2 y a los receptores tipo II BMPRII y ActRIIA ¹⁶⁶. Además, datos recientes sugieren que tanto BMP9 como BMP10 son los únicos miembros de la familia que reconocen ambos receptores –tipo I y tipo II- con la misma alta afinidad ¹⁶⁷. Además, otros estudios indican que BMP9 puede señalizar a través de ALK2 cuando ALK1 está ausente ¹²⁸.

En el año 2007, Sabine Bailly y cols. confirmaron que BMP9 y BMP10 eran los ligandos naturales del receptor ALK1 en células endoteliales ¹³⁵. Así, BMP9 es considerado

actualmente un regulador clave de la biología de la célula endotelial ^{126, 168-170}. Además, puesto que la expresión de ALK1 se ha visto en otros tipos celulares distintos a las células endoteliales ^{21, 114, 126, 140} es muy probable que BMP9 juegue diferentes papeles en estos tipos celulares. Un claro ejemplo es lo que ocurre en las células estrelladas hepáticas del hígado, donde se ha descrito la expresión de ALK1 y el papel que juega en la transdiferenciación de estas células a miofibroblastos ⁵³, aunque se desconoce si BMP9 influye en estos procesos.

Mecanismo de acción de BMP9.

BMP9 se produce fundamentalmente por los hepatocitos en el hígado, y se mantiene en una forma activa en el plasma a unas concentraciones de 2-12 ng/ml. Su diana son las células endoteliales, a las cuales el BMP9 les induce quiescencia ¹⁷¹.

-Señalización dependiente de Smads

Como otras BMPs, el BMP9 se une al receptor y promueve la fosforilación de las Smads1, 5 y 8. La activación de esta vía por BMP9 se ha documentado en todos los tipos celulares analizados hasta la fecha ¹⁶⁴. Sin embargo, otros autores han observado también una activación de la vía de Smad2/3 por BMP9 en células endoteliales ^{169, 172}. Nuestro laboratorio ha descrito también la activación de la vía de Smad2/3 por BMP9 en fibroblastos embrionarios de ratón (Muñoz-Félix y cols. observaciones sin publicar).

-Señalización independiente de Smads

En algunos modelos celulares, las BMPs activan también vías independientes de Smads entre las que se incluyen las MAPK (p38, ERK y JNK), PI3K/AKT, Wnt, la GTPasa Rho y la modulación de los micro-ARNs ¹⁶⁴. No se conoce mucho sobre la activación de estas vías no canónicas por parte de BMP9, y además la mayoría de los datos se han obtenido de células progenitoras mesenquimales. Por ejemplo, se sabe que BMP9

activa la vía de JNK y a través de ella induce diferenciación osteogénica de éstas células mesenquimales ¹⁷³. Por otro lado también se ha demostrado que BMP9 puede activar la vía de señalización de p38 y de esta forma modular la señalización activando la vía de Smad; en el caso de la vía de ERK, su inhibición resulta en un incremento de la diferenciación osteogénica mediada por BMP9 ^{174, 175}; recientemente se ha descrito que ambas vías –ERK y p38- juegan un papel importante en la diferenciación osteogénica en células madre del ligamento periodontal ¹⁷⁶.

Regulación de la expresión génica

a) Genes relacionados con la diferenciación osteogénica

Una de las primeras evidencias del efecto de BMP9 sobre la regulación de la expresión génica tuvo lugar en células mesenquimales multipotentes humanas, donde se observó que inducía Sox9, un factor de transcripción que regula la expresión de dos marcadores de diferenciación condrogénica: Col2A1 y agregano ¹⁷⁷. Posteriormente, en este tipo celular se descubrió un grupo de más de cuarenta genes inducidos por BMP9 relacionados con el proceso de diferenciación osteogénica: factores de transcripción Id1, Id2 e Id3, proteínas Smad inhibitorias (Smad6 y Smad7) ^{178, 179}, así como el factor de transcripción Hey1 ¹⁷⁹. En estas células se ha visto una fuerte inducción de ciclooxigenasa 2 por BMP9 a través de la vía de señalización de Smad1/5/8 ¹⁸⁰. El factor de transcripción Runx2 –que juega un papel central en la diferenciación osteogénica- también es un gen diana de BMP9 en numerosos modelos celulares ^{179, 181, 182}. Otro gen diana de BMP9 en este tipo celular es Hif1 α , que también es dependiente de la vía de Smad e induce diferenciación osteogénica ¹⁸³.

b) Genes relacionados con el fenotipo colinérgico de las neuronas

Desde hace tiempo es conocido el papel clave de BMP9 en la dirección neuronal y la adquisición de un fenotipo colinérgico en neuronas del prosencéfalo. BMP9 modula numerosos genes implicados en la interacción célula-célula (cadherinas 6 y 11),

componentes de la MEC (Col9a1, Col9a3 y Col1a1), genes relacionados con el ciclo celular y receptores de BMP (ALK3). BMP9 también modula la expresión del factor de crecimiento del nervio, neurotrofina 3 e IGF-1 ^{184, 185}.

c) Genes relacionados con la biología de la célula endotelial

Uno de los primeros efectos conocidos de la proteína BMP9 fue su implicación en angiogénesis ^{135, 168}. BMP9 regula varios genes implicados en el desarrollo de la angiogénesis como los inductores de diferenciación Id1, Id2 e Id3, y proteínas relacionadas con la señalización del TGF- β (Smad6, Smad7, endogлина y BMPRII) en células endoteliales de cordón umbilical (HUVECs). Otros genes relacionados son EfrinaB2 ¹⁸⁶, endotelina-1 ¹⁸⁷, TMEM100 –que codifica para una proteína transmembrana implicada en la diferenciación y morfogénesis vascular ¹⁸⁸- y otros genes que regulan la vasculogénesis como C2, Cx37 y neuropilina ¹³⁶.

d) Genes relacionados con la fisiología hepática

Uno de los genes diana de BMP9 en hígado codifica a la hepcidina, un péptido producido por hepatocitos y que controla el metabolismo del hierro. La transcripción de hepcidina inducida por BMP9 es un mecanismo dependiente de la vía de Smad ¹⁸⁹. También Id1 es un gen regulado por BMP9 en células de hepatocarcinoma HepG2 y en hepatocitos en cultivo primario ¹⁶⁴ y también promueve TEM a través de la inducción de Snail en células de hepatocarcinoma ¹⁹⁰.

Relación entre BMP9 y BMP10

Tanto BMP9 como BMP10 fueron descritas como potentes ligandos del receptor ALK1 en células endoteliales ¹³⁵. Teniendo en cuenta que los ratones deficientes de ALK1 mueren en el undécimo día de gestación ¹⁹¹, parece lógico pensar que sus ligandos naturales BMP9 y BMP10 jueguen un papel clave en el desarrollo. A pesar de que

numerosos autores sugirieron que ambas proteínas podían solaparse en sus funciones, hoy se sabe que esto no ocurre. En primer lugar, BMP10 tiene una función prácticamente exclusiva en el desarrollo cardíaco que no puede ser sustituido por BMP9 ¹⁹². Los ratones deficientes de BMP10 mueren durante la gestación, lo que indica que es una proteína esencial para el desarrollo, mientras que los ratones deficientes de BMP9 se desarrollan con normalidad, de forma que BMP10 podría contrarrestar la deficiencia de BMP9 ¹³⁷. Por otra parte, los ratones deficientes de BMP9 muestran defectos en el drenaje linfático, así como en la maduración de la red de vasos linfáticos y la formación de válvulas, siendo BMP10 incapaz de contrarrestar ese efecto ¹³⁶. Sin embargo, BMP10 sí compensa la deficiencia en la vascularización de la retina en neonatos causada por la ausencia de BMP9 ¹³⁷. Por otro lado, BMP9 y BMP10 muestran afinidades distintas por sus receptores. De esta forma, a pesar de que BMPRII, ActRIIA y ActRIIB están implicadas en la señalización de BMP9 y BMP10, BMP9 tiene preferencia por unirse a ActRIIB mientras que BMP10 se une a estos receptores con la misma afinidad. Esta podría ser la explicación por la que no hay una redundancia completa entre ambas proteínas ¹⁶⁷.

Fisiología y fisiopatología de BMP9

a) BMP9 en angiogénesis y neoangiogénesis

Son numerosos los estudios que han identificado diferentes funciones para BMP9 en células endoteliales, a pesar de que algunos de ellos pueden ser contradictorios. Parece ser que el papel pro-angiogénico o anti-angiogénico de BMP9 depende de muchos factores como la presencia de otras moléculas que contribuyen a la señalización ¹⁹³, del sistema experimental considerado y del tipo celular usado. Por un lado, en células endoteliales primarias (p.ej., HMVEC-D o células endoteliales microvasculares humanas, BAEC o células endoteliales de aorta bovina, HUVEC o células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano, HPAEC o células endoteliales de aorta pulmonar humana) BMP9 inhibe la proliferación y la migración celular, y por tanto podemos relacionar a esta proteína con la quiescencia o la fase de resolución de la

angiogénesis ^{135, 172, 187, 194, 195}. Por otro lado, en las células endoteliales derivadas de células madre de ratón y embrionarias de ratón, BMP9 estimula la proliferación y migración celular. También se ha observado que BMP9 inhibe la tubulogénesis en células HUVEC, mientras que el bloqueo de su receptor ALK1 con ARN de interferencia lo estimula ^{186, 196}. De un modo similar, la adición de anticuerpos neutralizantes anti-BMP9 y anti-BMP10, así como el dominio extracelular de ALK1 (ALK1^{ECD}) dentro de una proteína de fusión con IgG1 humana, incrementa la tubulogénesis en HUVECs ¹⁹².

b) BMP9 en fisiopatología hepática

Como se señaló anteriormente, BMP9 se expresa sobre todo en hígado ^{171, 197}. La mayoría de lo que se conoce sobre la acción de BMP9 en las células del parénquima hepático se ha estudiado en hepatocitos no transformados, donde se ha visto que induce la fosforilación de Smad1/5/8 y que produce un moderado descenso en la proliferación de hepatocitos en cultivo primario ¹²⁹. También se sabe que, de forma fisiológica, BMP9 regula la homeostasis de la glucosa en el hígado ^{198, 199}.

c) BMP9 en cáncer.

La formación de nuevos vasos dentro de los tumores es un factor muy importante para el desarrollo de los mismos. La vía de BMP9/BMP10/ALK1 se está convirtiendo en una diana terapéutica muy importante contra la angiogénesis tumoral. Los resultados son muy prometedores con dalantercept –antes conocido como ACE-041, proteína de fusión formada por el dominio extracelular de ALK1 unida a una porción de IgG1 humana - que se está probando en tumores de diversos orígenes ²⁰⁰. Además de dalantercept se ha desarrollado un anticuerpo anti-ALK1 (Pfizer, NY, USA), con grandes propiedades antitumorales ²⁰¹. Por otro lado, se ha utilizado la forma soluble de endogлина para neutralizar la acción de BMP9 en un modelo experimental de cáncer de colon, gracias a sus propiedades antiangiogénicas ¹⁷⁰.

Sin embargo, en otros tumores se ha visto un papel de BMP9 que no está relacionado con el proceso angiogénico ¹⁶⁴. En el carcinoma hepatocelular (HCC), BMP9 se correlaciona con la formación de metástasis debido a su papel promoviendo la TEM ¹⁹⁰. Además, también se ha visto un aumento en la expresión de BMP9 en biopsias de pacientes con HCC. BMP9 también se ha identificado como un factor que promueve la supervivencia de líneas celulares de HCC ¹²⁹.

d) BMP9 en fibrosis

Hasta el momento, no se tienen prácticamente referencias sobre el efecto de BMP9 en el desarrollo de la fibrosis. Mientras que otras BMPs como BMP7 o BMP6 han sido ampliamente estudiadas en la fibrosis, el caso de BMP9 es diferente. Anteriormente indicamos que BMP9 podía regular la expresión de factores de diferenciación condrogénica: Col2A1 y agrecano ¹⁷⁷, y componentes de MEC en neuronas ¹⁸⁴.

A pesar de que la vía de señalización de Smad1/5/8 está relacionada con la fibrosis ^{21, 138, 139}, así como su receptor ALK1 ^{114, 116, 202}, todos estos efectos se han relacionado con la acción de TGF- β 1 sobre este receptor y no con su ligando natural que es BMP9. Por ello, consideramos de interés el estudio del papel de BMP9 en el contexto de la fibrosis. En relación a la fibrosis renal, se ha descrito recientemente que existe un aumento de BMP9 en el suero de pacientes con ERC, relacionándose el papel de BMP9 con la calcificación vascular ²⁰³.

OBJETIVOS

Los objetivos planteados para este proyecto de tesis doctoral son los siguientes:

- Evaluar la presencia y grado de fibrosis renal en ratones heterocigotos de ALK1 y sus respectivos controles en el modelo de fibrosis renal experimental inducida por obstrucción ureteral unilateral (OUU).
- Establecer líneas celulares inmortalizadas de fibroblastos embrionarios de ratón heterocigotos en ALK1 (ALK1^{+/-}) y sus respectivos controles y evaluar en ellas tres procesos directamente relacionados con la fibrosis: síntesis de proteínas de matriz extracelular, proliferación celular y migración, tanto en condiciones basales como tras estimulación con TGF- β 1.
- Evaluar la presencia y grado de fibrosis renal en ratones que expresan la isoforma larga de endoglina humana (*L-ENG*⁺) y sus respectivos controles en el modelo de OUU.
- Estudiar en fibroblastos en cultivo el posible efecto profibrótico de la proteína morfogenética ósea 9 (BMP9), un potente ligando de ALK1, y los mecanismos implicados en ese efecto.

ARTÍCULOS

Artículo I:

José M. Muñoz-Félix, José M. López-Novoa, Carlos Martínez-Salgado

Heterozygous disruption of activin receptor-like kinase 1 is associated with increased renal fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy.

Kidney International

Factor de impacto 2013: **8.52**

-Journal Citation Reports® Science Edition (Thomson Reuters, 2014)-

3/75 Urology&Nephrology

RESUMEN

La fibrosis túbulo-intersticial se caracteriza por un incremento de las proteínas de MEC en el intersticio tubular, un incremento en el número de miofibroblastos así como apoptosis y atrofia tubular e infiltración de células inflamatorias. El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) es una citoquina directamente relacionada con el desarrollo de este tipo de fibrosis en el riñón. Actúa no solo incrementando la expresión de las proteínas de matriz extracelular (MEC) sino que también está implicado en otros fenómenos como la transición epitelio-mesénquima, la transición endotelio-mesénquima, la apoptosis tubular y la infiltración de células inflamatorias.

TGF- β 1 normalmente favorece la aparición de fibrosis renal mediante la fosforilación de las proteínas Smad2 y Smad3 a través de la activación del receptor ALK5. Sin embargo, dos receptores de TGF- β 1 han sido descritos en células endoteliales: ALK5, que estaría implicado en la fase de resolución de la angiogénesis, y por otro lado ALK1, que activaría Smad1 y Smad5 estimulando la fase de activación de la angiogénesis. Mientras que la implicación de la vía del receptor ALK5-Smad2/ Smad3 en la fibrosis renal ha sido ampliamente estudiada, el papel de ALK1 en este proceso es desconocido. Algunos estudios relacionan la activación de este receptor y de su vía de señalización con el desarrollo de fibrosis dérmica y fibrosis hepática –directamente relacionada con la transdiferenciación de las células hepáticas esteladas en miofibroblastos. Un estudio reciente relaciona el receptor ALK1 con la fibrosis renal inducida por radiación.

Con estos antecedentes nuestro objetivo fue estudiar el papel de ALK1 en la fibrosis túbulo-intersticial inducida por obstrucción ureteral unilateral (OUU), comparando ratones heterocigotos de ALK1 (ALK1^{+/-}) y sus respectivos controles (ALK1^{+/+}). Los ratones se sacrificaron durante 15 días y se extrajeron los riñones obstruidos (O, en los que se desarrolla la fibrosis túbulo-intersticial), riñones no obstruidos (NO) y riñones procedentes de ratones pseudo-operados (*sham operated*, SO) –para realizar diferentes estudios de expresión proteica (western blot, estudios histológicos).

Tras 15 días de OUU, los riñones obstruidos procedentes de ratones ALK1^{+/+} y ALK1^{+/-} muestran un incremento en las proteínas de MEC colágeno I y fibronectina, siendo este

aumento mayor en los ratones heterocigotos de ALK1. Esta mayor fibrosis túbulo-intersticial también se detectó mediante las tinciones de tricrómico de Masson y Rojo Sirio.

Sin embargo, el incremento de los marcadores de miofibroblastos α -SMA y S100A4 es similar en ratones ALK1^{+/+} y ALK1^{+/-}, indicando que la mayor fibrosis túbulo-intersticial observada en los ratones heterocigotos de ALK1 no es debida a un mayor número de miofibroblastos, sino que posiblemente esos miofibroblastos sintetizan más proteínas de MEC.

Además se observó que existe una mayor proliferación tubular –analizada mediante la expresión de PCNA y ki67– en los ratones heterocigotos de ALK1 que en sus respectivos controles.

Smad2, Smad3 y Smad1 experimentan un aumento en su fosforilación tras la OUU en los ratones controles. El aumento en la fosforilación de Smad3 es mayor en los heterocigotos de ALK1, mientras que la fosforilación de Smad1 es inferior en los heterocigotos de ALK1 tras la OUU. La fosforilación de Smad2 es similar en los riñones obstruidos procedentes de ambos tipos de ratones. Estos datos nos indican que el incremento en la fosforilación de Smad3 observado en los riñones obstruidos de ratones ALK1^{+/+} podría ser el responsable del aumento en la expresión de proteínas de MEC observado en este modelo experimental.

Hemos analizado la expresión de los receptores de TGF- β ALK5, ALK1 y endogлина. Los tres receptores aumentan su expresión tras la OUU en los ratones controles y heterocigotos de ALK1. Sin embargo, es destacable que el aumento de expresión del receptor ALK5 es mayor en los ratones heterocigotos de ALK1. También es muy significativo el incremento de la expresión de ALK1 tras la OUU, que hasta el momento no se había descrito en este modelo experimental. Mediante estudios de inmunofluorescencia observamos que una parte las células que expresaban ALK1 –localizadas en la región túbulo-intersticial en los riñones obstruidos– expresan el marcador de miofibroblastos α -SMA o el marcador de macrófagos CD68.

Dado que habíamos detectado más fibrosis en riñones procedentes de ratones ALK1^{+/+}, los cuales no presentaban cambios en el número de miofibroblastos, y que además observamos que las células ALK1-positivas en los riñones obstruidos parecían ser

miofibroblastos, decidimos realizar cultivos primarios de miofibroblastos renales procedentes de riñones ALK1^{+/+} y ALK1^{+/-}. Los fibroblastos heterocigotos expresan más colágeno I y fibronectina que los fibroblastos controles, lo cual parece confirmar la hipótesis de que la mayor fibrosis túbulo-intersticial observada en los riñones heterocigotos de ALK1 es debida a la capacidad de este receptor para modular la expresión de proteínas de MEC por parte de los miofibroblastos.

Nuestro estudio ha sido el primero en demostrar la importancia del receptor ALK1 en la fibrosis renal. A diferencia de otros receptores como ALK5 o ALK3, que tienen una expresión fundamentalmente tubular, el receptor ALK1 se expresa en zona intersticial tras la OUU y por ello modula las propiedades biológicas de las células que se localizan en esta zona durante la fibrosis, como es el caso de los miofibroblastos. El receptor ALK1 modula la expresión de proteínas de MEC y también la señalización de Smads inducida por TGF- β 1.

Artículo II:

ALK1 heterozygosity increases extracellular matrix protein expression,
proliferation and migration in fibroblasts.

José M. Muñoz-Félix, Nuria Perretta-Tejedor, Nélida Eleno,

José M. López-Novoa, Carlos Martínez-Salgado

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research

Factor de impacto 2013: **5.297**

-Journal Citation Reports® Science Edition (Thomson Reuters, 2014)-

52/291 Biochemistry & Molecular Biology

RESUMEN

La expresión de las proteínas de matriz extracelular (MEC), la proliferación de miofibroblastos y la migración son fenómenos muy comunes en las enfermedades fibróticas de diversa índole: fibrosis renal, fibrosis hepática, escleroderma, fibrosis pulmonar, pancreatitis, etc. El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) es una citoquina profibrótica que favorece un aumento en la expresión de las proteínas de MEC, así como la degradación de la misma. TGF- β 1 regula la proliferación celular, aunque su efecto depende del tipo celular y de otras condiciones. Por otro lado, el TGF- β 1 tiene un papel muy importante sobre la migración celular, proceso que se ha estudiado ampliamente en células endoteliales.

Tras haber demostrado previamente que el receptor ALK1 regula la fibrosis renal inducida por obstrucción ureteral unilateral (OUU) y que además se expresa en los miofibroblastos renales en los que modula la expresión de proteínas de MEC, decidimos estudiar el papel de ALK1 en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, de mouse embryo fibroblasts). Inicialmente intentamos aislar MEFs deficientes de ALK1 – al extraerlos de embriones ALK1^{-/-} de 10 días, justo antes de su muerte en el estadio E10,5-. Sin embargo, no es posible aislar dichas células, ya que estos MEFs procedentes de embriones ALK1^{-/-} no sobreviven en cultivo. Por ello realizamos el estudio en MEFs control (ALK1^{+/+}) y MEFs heterocigotos (ALK1^{+/-}).

El primer dato interesante de este estudio es que los MEFs expresan el receptor ALK1, y también el receptor ALK5. Los MEFs heterocigotos de ALK1 muestran un aumento en la expresión de proteínas de MEC, proliferan más y migran a más velocidad que sus respectivos controles.

El tratamiento con TGF- β 1 aumenta la expresión de colágeno I, fibronectina y factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF/CCN2) en los fibroblastos controles y heterocigotos de ALK1, siendo la respuesta a TGF- β 1 mayor en los fibroblastos ALK1^{+/-} –en el caso de fibronectina y CTGF/CCN2-.

Analizando la fosforilación de Smads (proteínas intracelulares activadas en respuesta a TGF- β 1) observamos que TGF- β 1 fosforila Smad2 y Smad3 del mismo modo en los MEFs controles y heterocigotos de ALK1. Sin embargo la fosforilación en estado basal de ambas proteínas es superior en los MEFs ALK1^{+/-} y podría ser el mecanismo por el

cual estas células expresan más MEC y presentan niveles de proliferación y migración superiores a sus respectivos controles. Por otro lado, no se observó un aumento de la fosforilación de Smad1 –pero sí cuando se detectaba la forma fosforilada del complejo Smad1/5/8- ni traslocación al núcleo de la proteína Smad1 en los fibroblastos controles. En los fibroblastos heterocigotos la fosforilación de Smad1 es significativamente menor en estado basal y en ellos se observa una mínima fosforilación de esta vía de señalización.

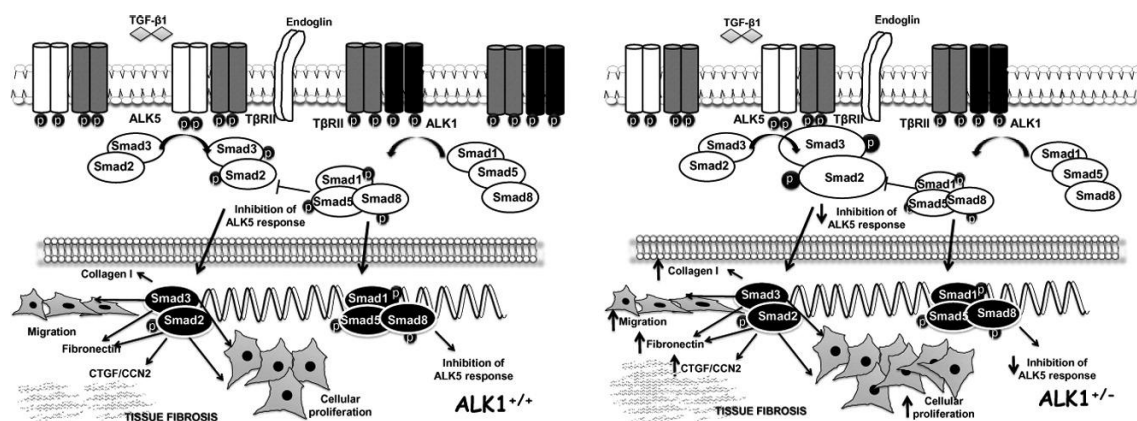
Puesto que en condiciones basales la mayor fosforilación de Smad2 y Smad3 (activadas por el receptor ALK5) podría estar relacionada con el fenotipo observado en estas células, decidimos inhibir esta vía. Para ello utilizamos el inhibidor de ALK5 SB4314542 y el inhibidor específico de Smad3 SIS3.

La inhibición con SB431542 conduce a una menor expresión de fibronectina y CTGF –revirtiendo el fenotipo del heterocigoto-, pero no de colágeno I en los fibroblastos heterocigotos de ALK1, mientras que la inhibición con SIS3 conduce a una menor expresión de colágeno I y fibronectina –y revirtiendo el fenotipo heterocigoto de ALK1. Estos datos nos sugirieron en primer lugar que los cambios observados en los MEFs ALK1^{+/-} eran debidos a una mayor fosforilación de Smad2 y Smad3 (efectores de ALK5), y por otro lado, nos sugirieron distintas funciones para Smad2 y Smad3 en cuanto a la modulación de este fenotipo: Por un lado que la mayor expresión de colágeno I era debida a una mayor fosforilación de Smad3 y no de Smad2 –ya que revertía cuando se usaba SIS3 pero no SB431542-. Por otro lado, que la mayor expresión de fibronectina es debida tanto a Smad2 como a Smad3 y por último, que la mayor expresión de CTGF/CCN2 es debida a una mayor fosforilación de Smad2 pero no de Smad3 –ya que revertía cuando se usaba SB431542 pero no SIS3-.

Para analizar si la mayor proliferación observada en los fibroblastos ALK1^{+/-} era debida a un mecanismo similar empleamos los mismos inhibidores SB431542 y SIS3. La inhibición con ambos da lugar a una menor proliferación en los fibroblastos heterocigotos de ALK1, lo que nos sugiere que tanto Smad2 como Smad3 –fundamentalmente la vía de ALK5- están implicados en la mayor proliferación observada en las células heterocigotas de ALK1.

Por último quisimos analizar la migración en estas células. La vía de ALK1/Smad1/5/8 está relacionada con la migración endotelial, mientras que la vía de Smad3 también es esencial para la migración de algunos tipos celulares como los queratinocitos. Mediante el tratamiento de nuestros MEFs con los inhibidores anteriormente estudiados observamos que la inhibición de Smad3 con SIS3 da lugar a una migración de los MEFs ALK1^{+/-} similar a la de sus respectivos controles, y que por ello la mayor activación de Smad3 en esas células conduce a una mayor migración.

La conclusión de este trabajo es que el receptor ALK1 –al que ha sido atribuida una expresión exclusiva en endotelio– se expresa también en MEFs y regula funciones biológicas relacionadas con la fibrosis: la síntesis de proteínas de MEC, la proliferación y la migración. Estos efectos regulados por ALK1 se deben a su potencial de modular la señalización y la respuesta a TGF-β1.



Graphical abstract disponible solamente en la versión web del artículo.

En: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488914000731>

Artículo III:

L-Endoglin overexpression increases renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction.

Bárbara Oujo*, José M. Muñoz-Félix*, Miguel Arévalo, Elena Núñez-Gómez, Lucía Pérez-Roque, Miguel Pericacho, María González-Núñez, Carmen Langa, Carlos Martínez-Salgado, Fernando Pérez-Barriocanal, Carmelo Bernabéu, José M. López-Novoa

PloS One

Factor de impacto 2013: **3.534**

-Journal Citation Reports® Science Edition (Thomson Reuters, 2014)-

8/51 Multidisciplinary Sciences

*Ambos autores comparten primera autoría del artículo.

RESUMEN

La endogлина es una proteína homodimérica perteneciente al complejo de receptores del TGF- β 1. Es considerada como un co-receptor no señalizante pero con capacidad de modular la señalización inducida por TGF- β 1. El papel de la endogлина ha sido ampliamente estudiado en angiogénesis, y los pacientes con mutaciones en el gen que codifica para endogлина desarrollan una enfermedad denominada telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT). Existen dos isoformas de la endogлина generadas por un mecanismo de splicing alternativo: endogлина larga (L-endogлина) –que es la forma más predominante- y endogлина corta (S-endogлина), que difieren en el dominio citoplasmático.

La expresión de la endogлина aumenta en diferentes condiciones de fibrosis en distintos órganos. Además, numerosos estudios *in vitro* han demostrado que la endogлина regula de forma negativa la expresión de proteínas de matriz extracelular por distintos mecanismos: en ocasiones modulando la respuesta a TGF- β 1 y en otras ocasiones a través de otras vías “no canónicas”. Por otro lado, estudios *in vivo* han demostrado que la endogлина favorece el desarrollo de fibrosis cardíaca y el desarrollo de fibrosis renal inducida por radiación. El modelo experimental del animal heterocigoto de endogлина (*Eng*^{+/-}) ha sido la herramienta más utilizada en este tipo de estudios *in vivo*. Sin embargo, en ese ratón heterocigoto no se encontraron diferencias en el grado de fibrosis cuando se realizó la obstrucción ureteral unilateral (OUU) en comparación con los animales controles.

Puesto que el modelo de OUU reproduce muy bien las características de la fibrosis túbulo-intersticial inducida por nefropatía obstructiva, decidimos realizar dicha maniobra quirúrgica en un nuevo modelo experimental: el ratón *L-ENG*⁺. Este ratón expresa de forma ubicua la isoforma larga de la endogлина humana, tal y como se comprobó en todos los tejidos.

Se realizó la OUU a los ratones *L-ENG*⁺ y a sus respectivos controles. Se observó que los ratones *L-ENG*⁺ mostraban un mayor grado de fibrosis renal que los ratones control tras la OUU, tal y como se comprobó mediante las tinciones de tricrómico de Masson y

Rojo Sirio, así como mediante las inmunohistoquímicas de colágeno I y fibronectina y los análisis de western blot de dichas proteínas.

La expresión de la proteína marcadora de miofibroblastos α -SMA se incrementó de forma similar en los riñones obstruidos procedentes de ratones *L-ENG*⁺ y en sus respectivos controles, indicando que el número de miofibroblastos en ambos tipos de riñones obstruidos es similar.

Por otro lado, analizando la expresión de los mediadores intracelulares de la acción del TGF- β 1, las distintas proteínas *smads* fosforiladas (Smad1 y Smad3 –cada una representativa de una vía de señalización), observamos que tanto el incremento de fosfo-Smad1 como el incremento de fosfo-Smad3 tras la OUU era superior en los animales *L-ENG*⁺ en comparación con sus controles. Por este motivo, sugerimos que la mayor fibrosis observada en los ratones que sobreexpresan la isoforma larga de la endoglina humana puede ser debida a una mayor activación tanto de la vía de Smad3 –considerada siempre profibrótica- como de la vía de Smad1 –considerada profibrótica en escleroderma, fibrosis hepática y glomerulosclerosis, pero tradicionalmente considerada como antifibrótica en fibrosis túbulo-intersticial-. De este modo, creemos que la endoglina (en este caso su isoforma larga) promueve tanto la fosforilación de Smad1 como de Smad3 contribuyendo ambas vías al desarrollo de la fibrosis renal.

Puesto que tanto en los riñones obstruidos procedentes de ratones controles como en los riñones obstruidos procedentes de ratones que sobreexpresan L-endoglina observamos la misma cantidad de miofibroblastos, quisimos comprobar que el papel de esta isoforma de endoglina se basaba en la regulación de la síntesis de proteínas de MEC en los fibroblastos renales. Para ello cultivamos fibroblastos renales obtenidos de riñones con obstrucción de tres días, y observamos que los fibroblastos procedentes de riñones *L-ENG*⁺ expresaban más colágeno I y fibronectina que aquellos fibroblastos procedentes de riñones control. Además, los fibroblastos *L-ENG*⁺ mostraban una mayor activación de las vías de fosfo-Smad1 y fosfo-Smad2/3 en condiciones basales.

Estos resultados nos han sugerido que la isoforma predominante de endoglina (L-endoglina) promueve el desarrollo de la fibrosis renal tras la OUU, y que su papel radica fundamentalmente en promover la síntesis de proteínas de MEC.

Artículo IV:

Identification of bone morphogenetic protein 9 (BMP9) as a novel profibrotic
factor *in vitro*

José M. Muñoz-Félix, Nuria Perretta-Tejedor, Mariela Subileau, Cristina Cuesta, Francisco J.
López-Hernández, José M. López-Novoa, Carlos Martínez-Salgado.

RESUMEN

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) se han considerado tradicionalmente como citoquinas antifibróticas, siendo la más estudiada la proteína morfogenética ósea 7 (BMP7). Estas proteínas ejercen sus funciones celulares a través de la activación de las proteínas Smad1, Smad5 y Smad8. BMP9 fue identificada como el ligando natural del receptor ALK1 en células endoteliales. El receptor ALK1 ha sido descrito por varios grupos de investigación –entre ellos nosotros– como un receptor regulador de la expresión de proteínas de matriz extracelular (MEC). Sin embargo su carácter profibrótico/antifibrótico es dependiente del tipo celular estudiado: La activación de ALK1 parece que está relacionada con un aumento en la síntesis de proteínas de MEC en fibroblastos con escleroderma y células estrelladas hepáticas, mientras que en condrocitos, fibroblastos embrionarios, fibroblastos renales y hepatocitos parece que ALK1 regula negativamente la síntesis de proteínas de MEC, frente al receptor ALK5 –receptor tipo I de TGF- β 1– que promovería el efecto contrario.

Con estos antecedentes, el objetivo de nuestro estudio ha sido analizar el efecto de la estimulación con BMP9 sobre la síntesis de proteínas de MEC en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), además de estudiar las vías de señalización y los receptores implicados en su efecto sobre este tipo celular, que posee características biológicas muy distintas a las células endoteliales.

El tratamiento con 20 ng/ml de BMP9 incrementó la expresión de las proteínas colágeno I, fibronectina y CTGF/CCN2. A esa misma concentración se observó un aumento de la fosforilación de las proteínas Smad1/5/8, Smad2/3 y Erk1/2. La estimulación conjunta de BMP9 y TGF- β 1 no produjo ninguna sinergia ni en la síntesis de proteínas de MEC ni en la activación de las vías de Smad2/3 y Smad1/5/8.

La inhibición de la activación del receptor ALK5 y de la proteína Smad3 dio lugar a una menor síntesis de proteínas de MEC, aunque esta inhibición no modificó la fosforilación de la vía de Smad1/5/8 inducida por BMP9.

Por otro lado, distintas estrategias experimentales como el uso de MEFs heterocigotos de ALK1, el silenciamiento de la expresión de ALK1 con ARN de interferencia o la inhibición de los receptores ALK1, ALK2, ALK3 o ALK6 demuestran que ALK1 es necesario para la fosforilación de las proteínas Smad1/5/8 (comúnmente fosforiladas por BMP9 en la mayoría de los tipos celulares estudiados), Smad2/3 (comúnmente fosforiladas por ALK5 y casi siempre en respuesta a TGF- β 1) y Erk1/2.

Estos resultados indican que tanto el receptor ALK1 como el receptor ALK5 son necesarios para la síntesis de proteínas de MEC por parte de BMP9. Mientras que la presencia de ALK5 es necesaria para que BMP9 induzca la fosforilación de Smad2/3, pero no de Smad1/5/8, ALK1 parece necesario para que BMP9 fosforile la vía de Smad1/5/8, la vía de Smad2/3 y la vía de Erk1/2.

Nuestros datos sugieren dos modos de actuación de la proteína BMP9: el primero mediante la activación de ALK1 –y posiblemente la presencia del receptor tipo II de BMP- que activaría la vía clásica de Smad1/5/8, y un segundo mecanismo mediante la presencia de un complejo ALK1/ALK5, a través del cual BMP9 activaría la vía de Smad2/3.

Por otro lado decidimos estudiar el efecto de BMP9 cuando sobreexpresábamos endogлина, una proteína cuya expresión está muy aumentada en tejidos con fibrosis. Se ha descrito que endogлина amplifica los efectos de BMP9 en células endoteliales. En nuestro caso observamos que en fibroblastos NIH3T3 transfectados con endogлина humana se producía una mayor fosforilación de las proteínas Smad1/5/8 y Smad2/3 tras el tratamiento con BMP9 que en sus respectivos controles –fibroblastos NIH3T3 transfectados con un vector vacío-, y que en estas células se producía un mayor incremento en la síntesis de fibronectina y CTGF/CCN2 tras el tratamiento con BMP9.

Los resultados de este trabajo sugieren que la proteína BMP9 es un factor que promueve la expresión de proteínas de MEC, con lo que muestra efectos profibróticos en distintos tejidos. Para que BMP9 favorezca el desarrollo de fibrosis es necesaria la presencia de los receptores ALK1 y ALK5. Además, un aumento en la expresión de la proteína endogлина amplificaría este efecto. Por tanto, el efecto fibrótico de BMP9 en

distintos tejidos variará dependiendo de la expresión de estos receptores en cada uno de ellos.

DiSCVSiÓN

DISCUSIÓN

Numerosos grupos de investigación han estudiado durante las últimas décadas el mecanismo y el posible potencial terapéutico de dos citoquinas implicadas en procesos fibrogénicos, y entre ellos la fibrosis renal: el factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1) y la proteína morfogenética ósea-7 (BMP7). Estas dos citoquinas activan vías que se han considerado antagónicas: vía de ALK5/Smad2/3 y vía de ALK1/Smad1/5/8, respectivamente.

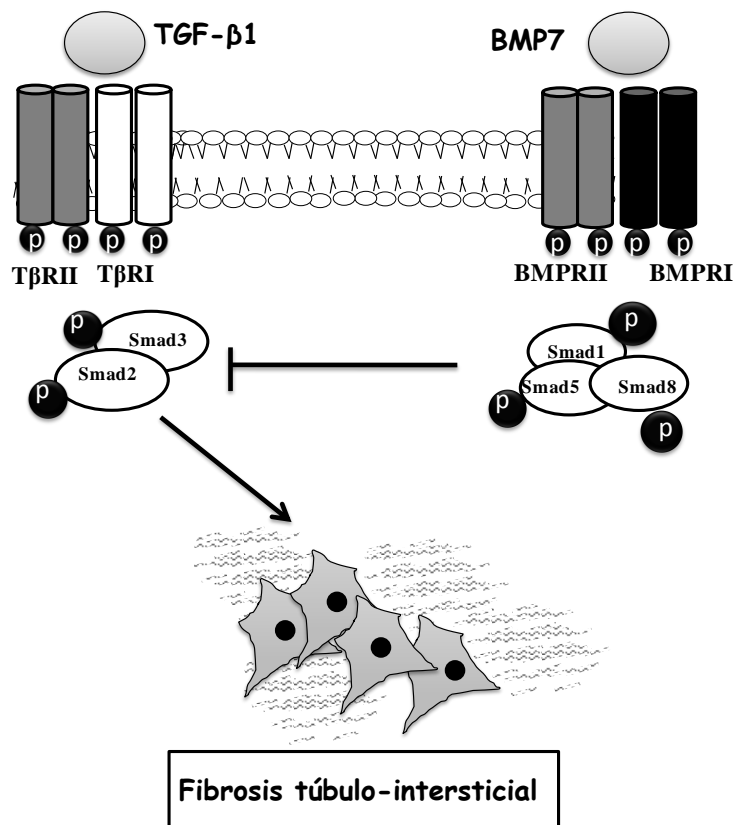


Figura 4: Mecanismo de regulación de la fibrosis renal por las citoquinas TGF- β 1 y BMP7. TGF- β se une al complejo formado por el receptor tipo II y el receptor tipo I promoviendo la fosforilación de las proteínas Smad2 y Smad3 induciendo la expresión de numerosos genes que promueven la fibrosis renal. Por otro lado, BMP7 se une al complejo formado por los receptores tipo I y tipo II de BMP promoviendo la fosforilación de las proteínas Smad1, Smad5 y Smad8. La activación de esta vía de señalización bloquea la señalización a través de Smad2 y Smad3 y su respuesta fibrótica. BMP7: Proteína morfogenética ósea 7. BMPRI: Receptor tipo I para BMP. BMPRII: Receptor tipo II para BMP. TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante beta 1. T β RI: Receptor tipo I para TGF- β . T β RII: Receptor tipo II para TGF- β .

En el caso del TGF- β 1 se ha descrito un notable aumento de su expresión en tejido fibrótico y en plasma de organismos con tejidos fibróticos. Además, la inhibición del TGF- β 1 por distintas estrategias da lugar a un descenso en la fibrosis renal, como se ha

observado en numerosos modelos experimentales. Por ello, también se ha analizado el potencial antifibrótico de algunos inhibidores del TGF- β 1, así como el de inhibidores de sus receptores ⁶².

Dentro del grupo de las BMP, la más estudiada en relación a la fibrosis renal es la BMP7, debido a su papel protector en el riñón frente a esta enfermedad. Uno de sus principales efectos es el mantenimiento de la integridad del túbulo gracias a la regulación de la expresión de la proteína de adhesión tubular E-cadherina, protegiendo así a las células tubulares frente a fenómenos que provocan durante la fibrosis renal como la TEM ⁸². El potencial antifibrótico de BMP7 también ha sido demostrado en modelos *in vitro*, donde se ha relacionado BMP7 con una regulación negativa de la expresión de proteínas de MEC en mioblastos de rata ²⁰⁴.

Nuestro objetivo ha sido el estudio de dos receptores, ALK1 y endoglina, cuya vía de señalización necesita el concurso de las proteínas Smad1/5/8. ALK1 señala a través de las proteínas Smad1/5/8 y sus ligandos naturales son las proteínas BMP9 y BMP10; además, se ha visto que puede ser activado por TGF- β 1 en distintos modelos *in vitro*. Por otro lado, la endoglina, considerada como un receptor no señalizante de TGF- β 1, promueve una mayor activación de la vía de ALK1 tal y como se describió inicialmente en células endoteliales ^{124, 134}. La sobreexpresión de endoglina da lugar a un incremento en la fosforilación de Smad1/5/8 –y consiguiente activación de BRE- tras el tratamiento con BMP9 ¹³⁵. Sin embargo, en modelos experimentales de fibrosis la endoglina favorece la señalización de TGF- β 1 a través de las proteínas Smad2 y Smad3 ^{54, 142, 205}.

Los receptores ALK1 y endoglina tienen unas particularidades que los distinguen del resto de receptores de BMP o TGF- β :

1. Su expresión es elevada en células endoteliales. De hecho, algunos autores todavía afirman que la expresión de ALK1 y endoglina está restringida al endotelio ^{125, 206}.
2. Frente a otros receptores de BMP, como es el caso de ALK3 y ALK6, cuya expresión está elevada en todas las áreas del riñón en condiciones fisiológicas (fundamentalmente en células de epitelio tubular), ALK1 y endoglina están restringidas fundamentalmente a la región glomerular y túbulo-intersticial del riñón y

su expresión aumenta considerablemente durante la fibrosis. La localización de la expresión de los receptores ALK1 y endogлина es muy importante para considerar las funciones que pueden ejercer. Otros receptores de TGF- β –como ALK5– suelen tener aumentada su expresión en modelos experimentales de fibrosis renal, no así los receptores de BMP, que suelen disminuir su expresión durante la fibrosis.

3. ALK1 y endogлина se expresan en células productoras de MEC de diferentes tejidos. De este modo, ALK1 se expresa en fibroblastos dérmicos ²¹, condrocitos ¹⁴⁰, fibroblastos renales ¹¹⁴ y MEFs ^{202, 207} mientras que endogлина se expresa en células mesangiales ^{149, 208}, fibroblastos dérmicos y MEFs ¹⁵¹, fibroblastos intestinales ¹⁶⁰, fibroblastos cardíacos ⁵⁴ y células estrelladas hepáticas ¹⁵³. La expresión de ALK1 y de endogлина en células productoras de MEC está relacionada con la función de estos receptores para modular la síntesis de proteínas de MEC. En riñón, los tipos celulares implicados en la producción de MEC son fundamentalmente las células mesangiales glomerulares y los fibroblastos intersticiales. Además, se conoce mejor la implicación de ALK1 y endogлина en la modulación de propiedades biológicas de células endoteliales tales como la proliferación y migración

Los ratones heterocigotos de ALK1 y la sobreexpresión de L-Endogлина promueven una mayor síntesis de proteínas de MEC in vivo e in vitro

En el trabajo presentado en esta Tesis, inicialmente hemos evaluado la fibrosis renal en ratones deficientes de ALK1 (ALK1^{+/-}) empleando un modelo conocido de fibrosis túbulo-intersticial mediada por TGF- β 1 que se desarrolla al obstruir uno de los uréteres (OUU) ^{37, 102}. Los resultados nos indicaron que el ratón deficiente de ALK1 desarrollaba una mayor fibrosis renal que el ratón normal, relacionado con una mayor activación de la vía de TGF- β 1/ALK5/Smad2/3 y una menor activación de la vía propia de ALK1/Smad1/5/8 que en el ratón control – bien estimulada esta última vía por BMP o por TGF- β 1 ¹¹⁴. De este modo, ALK1 se comportaría como un receptor con propiedades antifibróticas, regulando negativamente la respuesta fibrótica inducida por TGF- β 1 a través de ALK5/Smad2/3.

Seguidamente evaluamos la fibrosis renal en ratones que sobreexpresan la isoforma larga de endogлина -L-endogлина (*L-ENG*⁺), la más abundante- con el mismo modelo de OUU. Los ratones *L-ENG*⁺ desarrollaron más fibrosis renal que sus respectivos controles, pareciendo estar implicadas tanto la vía de Smad2/3 como la vía de Smad1/5/8.

Además, no hemos detectado cambios en la abundancia de miofibroblastos tras la OUU entre los ratones WT y *L-ENG*⁺ y entre los ratones *ALK1*^{+/+} y *ALK1*^{+/-}. Esto sugiere que los aumentos en la fibrosis túbulo-intersticial observados cuando hay menor expresión de ALK1 o hay más expresión de L-endogлина se debe a una estimulación en la síntesis de MEC sin aumento del número de miofibroblastos.

Previamente otros grupos han demostrado que el receptor ALK1, o más bien la ratio entre los receptores ALK1 y ALK5, regula la síntesis de proteínas de MEC en distintos sistemas biológicos. Se ha relacionado un aumento en la expresión ALK1 con una mayor degradación o menor síntesis de estas proteínas de MEC en cartílago ²⁰⁹, condrocitos ^{140, 141} y hepatocitos ²¹⁰. Nuestros modelos experimentales *in vitro* realizados en cultivos primarios de fibroblastos renales y en MEFs inmortalizados muestran que ALK1 regula negativamente la síntesis de las proteínas de MEC colágeno I, fibronectina y CTGF/CCN2, confirmando los resultados previamente obtenidos *in vivo*. Además, los estudios en células nos permiten ver que este efecto está mediado por la vía ALK5/Smad2/3, ya que está siendo menos inhibida por la vía de ALK1/Smad1/5/8 – al ser esta última deficiente-. Sin embargo, en fibroblastos procedentes de pacientes con escleroderma, una mayor activación de ALK1 da lugar a un aumento en la síntesis de colágeno y CTGF/CCN2 ^{21, 138, 139}.

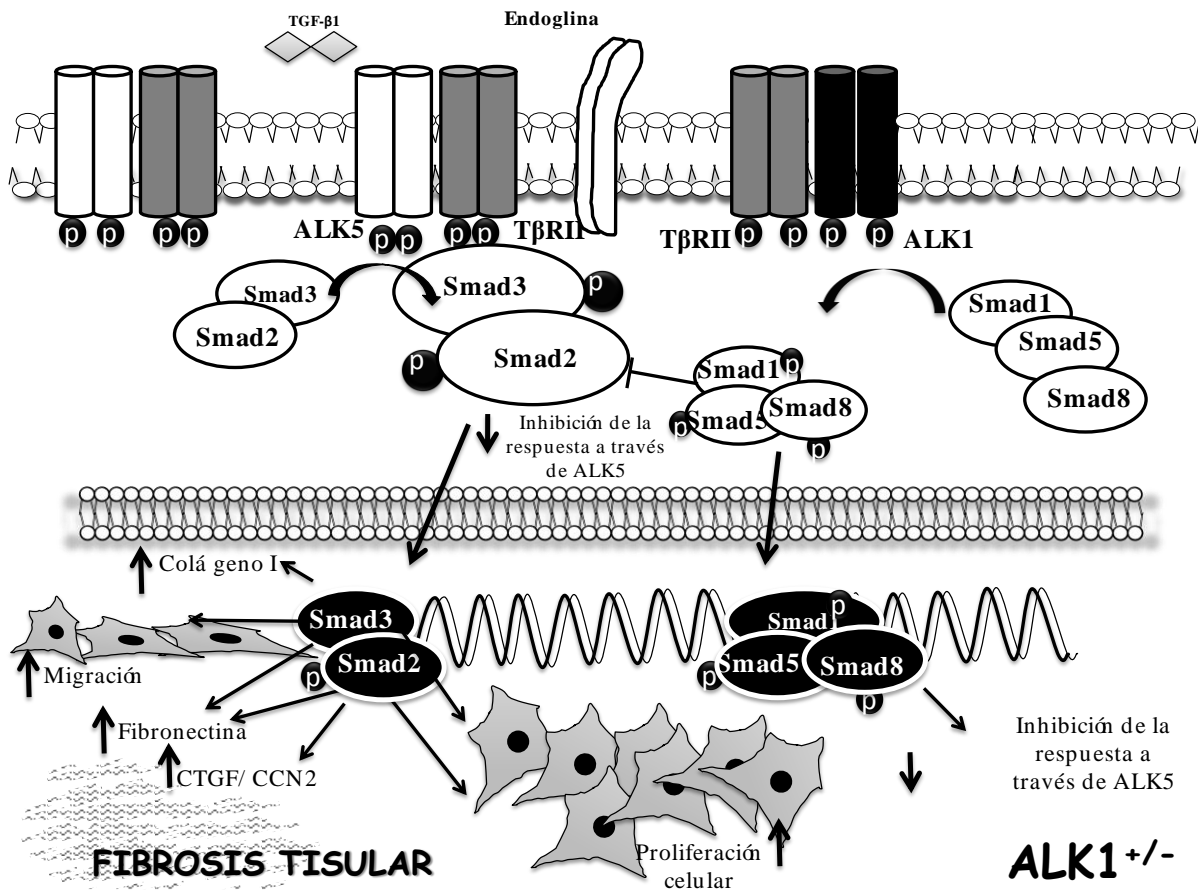
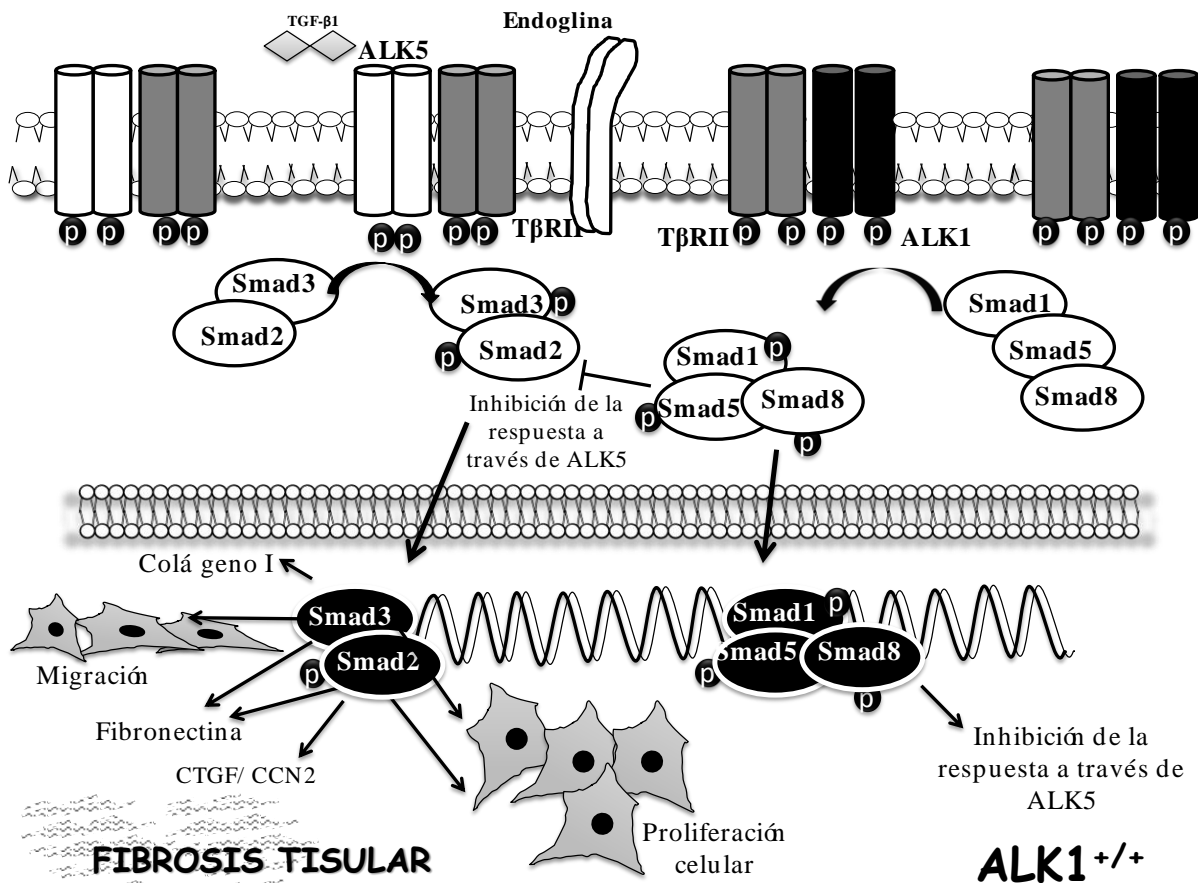


Figura 5: Efecto de la haploinsuficiencia de ALK1 sobre la fibrosis. Los fibroblastos heterocigotos de ALK1 presentan un fenotipo más fibrótico (*panel inferior*) que los fibroblastos controles (*panel superior*): sintetizan mayor cantidad de proteínas de MEC, proliferan y migran más. Esto se debe a que presentan una alteración en la vía de señalización del TGF-β1. En este caso, una menor activación de la vía a través de ALK1/Smad1/5/8 conlleva una mayor activación de la vía a través de ALK5/Smad2/3 y un consecuente mayor fenotipo fibrótico. ALK1: Activin receptor-like kinase 1, ALK5: Activin receptor-like kinase 5, TGF-β1: Factor de crecimiento transformante beta 1. TβRII: Receptor tipo II de TGF-β. Adaptado de Muñoz-Félix y cols, 2014.

Con respecto a la L-endogлина, sus efectos sobre la expresión de proteínas de MEC *in vitro* son contradictorios: varios estudios demostraron que endogлина regula negativamente la síntesis de MEC en numerosos tipos celulares como células mesangiales, mioblastos, fibroblastos intestinales o fibroblastos dérmicos ^{71, 149, 151, 159, 160, 204, 211}, mientras que promueve la síntesis de proteínas de MEC en células estrelladas hepáticas ^{153, 212} y en fibroblastos de pacientes con escleroderma ²¹. En nuestro caso, hemos aislado y cultivado fibroblastos renales procedentes de ratones *L-ENG*⁺ y hemos observado que la sobreexpresión de L-endogлина induce una mayor expresión de proteínas de MEC en fibroblastos. Así, nuestros estudios *in vitro* apoyan que el papel de ALK1 y endogлина en esta serie de procesos fibróticos es dependiente del tipo celular estudiado.

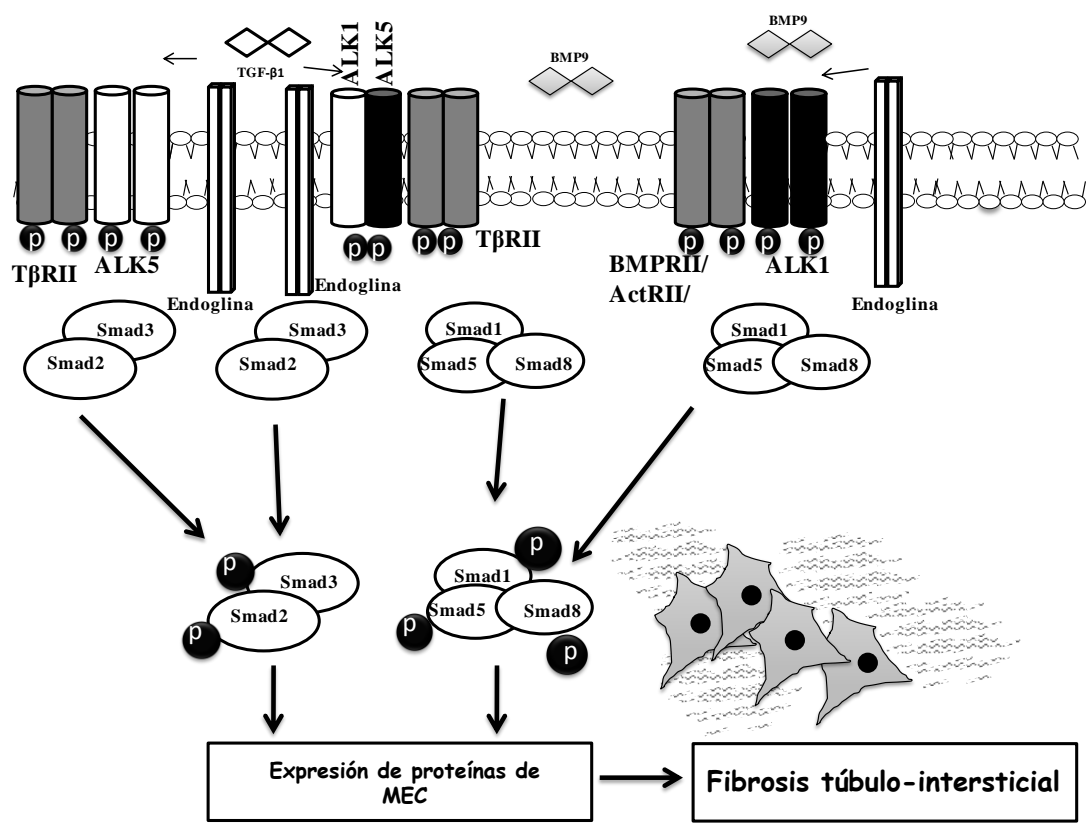


Figura 6: Mecanismo de acción propuesto para L-endogлина en la fibrosis túbulo-intersticial renal. La endogлина promueve la expresión de proteínas de MEC, y por tanto promueve la fibrosis renal inducida por TGF- β 1 a través de dos vías de señalización: ALK5/Smad2/3 y ALK1/Smad1/5/8 (esta última también podría estar activada por BMP9, tal y como han descrito otros autores (David et al, 2007; Nolan-Stevaux et al, 2012)). En la parte superior de la figura se muestran los complejos de receptores de TGF- β 1 (T β RII y ALK5 o T β RII y ALK1) y BMP9 (BMPRII-ActRII y ALK1). ALK1: Activin receptor-like kinase 1, ALK5: Activin receptor-like kinase 5, BMP9: Proteína morfogenética ósea 9. T β RII: Receptor tipo II de TGF- β .

De acuerdo con nuestros resultados, varios estudios *in vitro* e *in vivo* relacionan la endogлина con otros procesos fisiopatológicos que promueven la fibrosis renal, como son la inflamación^{213,214}, o la transdiferenciación de pericitos a fibroblastos²¹⁵.

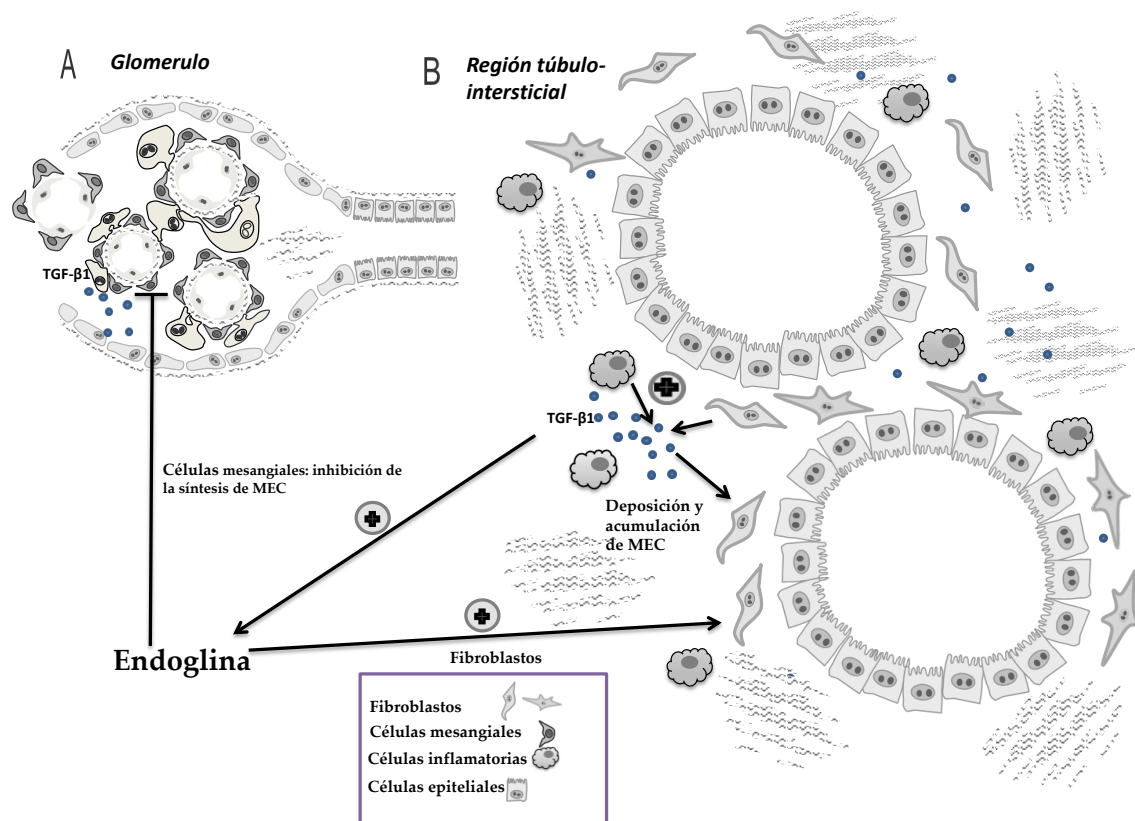


Figura 7: Efectos del aumento de endogлина en la fibrosis renal. Nuestros datos muestran la participación de endogлина en la fibrosis túbulo-intersticial. Además, estudios *in vitro* de otros autores han señalado que endogлина regula negativamente la síntesis de proteínas de MEC en las células mesangiales, que se encuentran en el glomérulo (izquierda), inhibiendo el desarrollo de la glomeruloesclerosis. Sin embargo, existen otros procesos en los que endogлина está implicada y que promueven la aparición tanto de fibrosis túbulo-intersticial (derecha) como de glomeruloesclerosis, como son la adhesión e infiltración de leucocitos. Además, células inflamatorias como los leucocitos o macrófagos son los responsables de la síntesis de numerosas citoquinas implicadas en la fibrosis como el TGF- β 1. MEC: Matriz extracelular. TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante beta 1.

Por tanto y resumiendo, nuestros experimentos *in vitro* confirman los resultados previamente obtenidos *in vivo*, de modo que nuestra hipótesis propone que un aumento del receptor L-endoglina o un descenso del receptor ALK1 favorecen una mayor síntesis de proteínas de MEC en células en cultivo, así como una mayor fibrosis en la región túbulo-intersticial renal en ratones.

¿Qué sentido fisiológico tiene el hecho de que las expresiones de ALK1 y de endoglina estén incrementadas en la fibrosis renal?

En los últimos años no ha habido demasiadas evidencias que demostraran un aumento de Smad1 en condiciones fibróticas ²³. En el contexto renal se había detectado un incremento en la expresión de ALK1 tras la inducción de fibrosis por irradiación ¹¹⁶. Nuestro grupo ha descubierto un aumento en la expresión de ALK1 en la fibrosis renal inducida por OUU en ratón normal ¹¹⁴. Como además hemos visto en este trabajo que ALK1 regula negativamente la síntesis de MEC, un aumento de la expresión de ALK1 en el riñón fibrótico podría ser responsable de un mecanismo protector frente a la fibrosis renal. Además, ALK1 se expresa concretamente en la zona túbulo-intersticial, donde se encuentran los miofibroblastos en el riñón fibrótico.

También es posible que ALK1 tenga otras funciones relacionadas con la fibrosis pero que son independientes de la expresión de proteínas de MEC, como son la proliferación y migración celular. Previamente otros grupos habían demostrado que ALK1 participa en estos procesos en células endoteliales como parte de su papel regulador en la angiogénesis ^{64, 65, 135, 216}. Nosotros hemos observado que ALK1 regula de forma negativa la proliferación y la migración en otras células diferentes a las endoteliales como son los fibroblastos embrionarios, y que esta regulación se produce mediante las vías de señalización del sistema de TGF- β 1, las cuales ALK1 tiene la capacidad de modular. Sin embargo, la regulación negativa de la proliferación y migración demostrada en estudios *in vitro* no se observa en el modelo *in vivo*, ya que por un lado, el número de miofibroblastos no varía entre los riñones fibróticos heterocigotos y controles de ALK1, y por otro lado, el mayor número de células

positivas para el marcador de proliferación Ki67 observado en los riñones fibróticos ALK1^{+/-} corresponde a células del epitelio tubular.

Respecto a la endoglina, en modelos experimentales de fibrosis renal esta proteína ha sido objeto de estudio desde que se detectó por primera vez en biopsias de pacientes con insuficiencia renal crónica ¹⁵⁸. Previamente nuestro grupo ha demostrado un aumento de endoglina asociado a fibrosis renal en modelos experimentales como la reducción de masa renal ⁵⁹ o la OUU ^{60, 61}. Sin embargo, los resultados obtenidos en el ratón heterocigoto de endoglina (*Eng*^{+/-}) no permitieron concluir si esta proteína modula la fibrosis renal inducida por OUU. Hay que tener en cuenta que en estos trabajos no se tuvo en cuenta que existen dos isoformas de endoglina de membrana, la larga (L-endoglina) y la corta (S-endoglina), y que ambas isoformas tienen efectos opuestos en muchos procesos biológicos ^{71, 156}. Nuestros resultados en ratón que sobreexpresa la isoforma larga de endoglina (*L-ENG*⁺) responden en parte a esta cuestión. Así, un aumento de la expresión de la forma larga de endoglina activa diversos procesos fibróticos a través de la activación de las vías de Smad1/5/8 y Smad2/3.

La vía de Smad1 es fibrótica o antifibrótica dependiendo del contexto biológico.

Como hemos dicho anteriormente, endoglina y ALK1 no regulan la fibrosis renal del mismo modo, ya que la sobreexpresión de la primera y la deficiencia del segundo inducen un efecto similar favoreciendo los procesos fibróticos por mecanismos similares (aumentando la síntesis de MEC sin variar la cantidad de miofibroblastos), aunque por vías de señalización algo diferentes. En ambos casos la vía de Smad3 aparece aumentada, lo que puede ser el origen de una mayor fibrosis renal en ratones heterocigotos de ALK1 (ALK1^{+/-}) y también en ratones transgénicos de L-endoglina humana (*L-ENG*⁺). Sin embargo, la vía de Smad1 en ratones ALK1^{+/-} está menos activa, mientras que en ratones *L-ENG*⁺ está más activa. Por ello, sugerimos que la vía de Smad1 es fibrótica, y además lo confirmamos posteriormente estimulando esta vía de

señalización con BMP9 en fibroblastos, aunque una menor activación de Smad1 en $ALK1^{+/-}$ puede conllevar una mayor activación de Smad3 –debido al antagonismo lateral entre las vías de señalización previamente descrito²¹⁷⁻, potencialmente más fibrótica. Esta hipótesis concuerda con otros estudios que relacionan una activación de Smad1 con una mayor fibrosis tisular en diversos contextos como escleroderma^{21, 138}, fibrosis hepática^{53, 153}, o fibrosis renal por nefropatía diabética^{218, 219}. Como ya hemos mencionado, otros trabajos sugieran que sea la relación entre $ALK5$ -Smad2/3 - $ALK1$ -Smad1/5/8 la que regule la fibrosis, de modo que la menor activación de Smad1/5/8 promovería una mayor fibrosis al reducirse la inhibición que ésta ejerce sobre la Smad2/3. Para entender la complejidad de estos procesos debería analizarse la presencia o no de otros ligandos –como BMP9-, la presencia de correceptores como endogлина o CD109, y la cantidad y el tipo de receptores de la superfamilia de TGF- β que se expresan en las células de los distintos tejidos, teniendo en cuenta las diferentes condiciones fisiopatológicas.

BMP9 es una molécula de gran interés en este contexto, ya que es el ligando natural del receptor ALK1 en células endoteliales^{135, 168}. BMP9 se une con alta afinidad a ALK1^{164, 167} y activa la vía de Smad1/5/8 y el promotor BRE¹³⁵. Además, parece ser que la endogлина participa en la activación de la vía de ALK1 por BMP9. Nuestros resultados muestran que BMP9 activa la vía de Smad1/5/8 –y también la vía de Smad2/3- en MEFs, y que ALK1 es el responsable fundamental de la activación de ambas vías. La estimulación de estos fibroblastos con BMP9 da lugar a un aumento de la síntesis de proteínas de MEC por dos mecanismos que proponemos:

- 1) BMP9 se une al receptor ALK1 –de un modo similar a como ocurre en células endoteliales, formando un complejo con un receptor tipo II –BMPRII o AcRII- y mediante la activación de las proteínas Smad1/5/8 induciría la síntesis de proteínas de MEC (figura 8, derecha).

- 2) BMP9 también activaría la vía de señalización de Smad2/3 a través de ALK5, tradicionalmente vinculada a TGF- β 1. Para que BMP9 pueda activar dicha vía sería necesaria la presencia de ALK1. Esta vía induce la síntesis de proteínas de MEC, siendo esta vía la que tradicionalmente se ha considerado fibrótica (figura 8, izquierda).

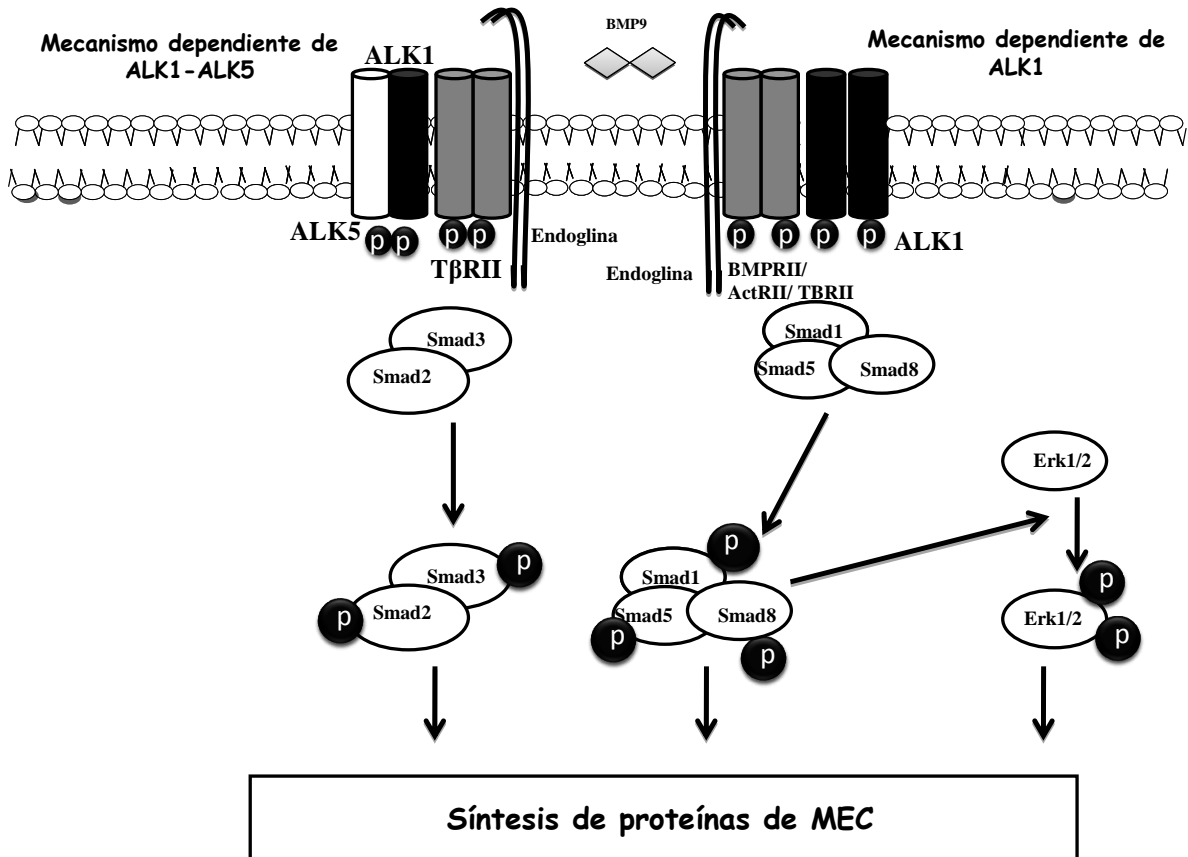


Figura 8: Vías de señalización por las que BMP9 induce un aumento en la síntesis de proteínas de MEC. BMP9 induce la fosforilación de Smad1/5/8 tras su unión a ALK1 y al receptor tipo II de BMP (derecha), y también induce la fosforilación de las vías de Smad1/5/8 y Smad2/3 a través de complejos ALK1/ALK5 (izquierda). La activación de ambas vías induce la síntesis de proteínas de MEC. MEC: Matriz extracelular, ALK1: Activin receptor-like kinase 1, ALK5: Activin receptor-like kinase 5, BMP9: Proteína morfogenética ósea 9.

El receptor ALK1 es profibrótico o antifibrótico dependiendo de las condiciones fisiopatológicas o experimentales

Por tanto, nuestros datos, así como la información que hemos recopilado de la literatura científica, nos han llevado a una conclusión:

Por un lado, ALK1 es un receptor antifibrótico en las condiciones en las que su mayor o menor expresión –y por tanto la ratio ALK1-Smad1/5/8-ALK5-Smad2/3- tenga como resultado la regulación de la síntesis de MEC. Por otro lado, acabamos de describir que la presencia de ALK1 es necesaria para que BMP9 pueda activar las dos vías de señalización que conllevan el aumento en la síntesis de MEC en fibroblastos.

Dicho de otro modo, nuestros resultados muestran que ALK1 es necesario para que BMP9 induzca la expresión de proteínas de MEC, pero también una menor expresión de ALK1 da lugar a una mayor activación de la vía de TGF- β 1-ALK5-Smad2/3 y su correspondiente respuesta fibrótica.

Igual que anteriormente mencionamos una serie de factores que podrían influir en este doble comportamiento de la vía de Smad1, en este caso, el doble papel de ALK1 podría explicarse por la presencia o no de ligandos específicos –como el caso de BMP9– o la presencia de correceptores. Un ejemplo claro que proponemos es el caso del papel que juega la vía de ALK1/Smad1/5/8 en la fibrosis hepática, donde se ha visto que la activación de dicha vía promueve el desarrollo de la fibrosis ⁵³. Aunque no se conoce mucho sobre el papel de BMP9 ²²⁰, se sabe que esta proteína se expresa notablemente en el hígado, aunque todavía no se conoce la existencia de alguna correlación entre la expresión de la proteína BMP9 y el grado de fibrosis en este órgano ¹⁹⁰. Sin embargo, consideramos que la abundante presencia de BMP9 en hígado sería un factor determinante para que el receptor ALK1 y su activación promuevan la fibrosis hepática.

Perspectivas

Este trabajo muestra la implicación de los receptores ALK1 y endogлина en la fibrosis túbulo-intersticial, y además expone los mecanismos celulares por los que tanto ALK1 como endogлина regulan la síntesis de MEC en fibroblastos. Por un lado, estos datos pueden facilitar una mayor comprensión de los mecanismos de regulación de la fibrosis renal por parte de los miembros de la superfamilia del TGF- β . Por otro lado, los resultados *in vitro* pueden servir para abrir nuevas líneas de investigación en procesos fisiopatológicos donde la síntesis de MEC es un proceso relevante, especialmente en tipos celulares donde todavía no se ha descrito el papel de estos receptores, además de contribuir a comprender mejor aquellas patologías donde sí se ha identificado la participación de estas proteínas, tales como la fibrosis hepática o escleroderma.

La implicación de ALK1 y de endoglina en los procesos angiogénicos, especialmente en la angiogénesis tumoral, ha dado lugar al desarrollo de moléculas con interés terapéutico: Dalantercept y PF-03446962 –inhibidores de ALK1-, y TRC105 –anticuerpo frente a endoglina-, cuyas características se han descrito en la introducción de la tesis y en las correspondientes revisiones. Por ello, sería importante valorar en estudios posteriores si la inhibición de ALK1 y endoglina puede modificar de alguna manera el desarrollo de la fibrosis en cualquier órgano, del mismo modo que debe analizarse el papel potencial de estas moléculas en el tratamiento de la fibrosis. Por una parte, sería interesante el uso de animales KO condicionales de ALK1, como han descrito otros autores ²²¹, además de estudiar la estimulación de ALK1 con BMP9 o BMP10, o trabajar con ratones KO de BMP9 (los ratones KO de BMP10 no son viables ya que mueren durante la gestación). En el caso de endoglina sería muy interesante el estudio de las diferentes isoformas de la misma, especialmente el uso de la forma soluble de endoglina –que se ha demostrado que puede bloquear los efectos biológicos del TGF- β 1 ¹⁵⁷-como una molécula con potencial terapéutico contra la fibrosis renal, así como el estudio de posibles ligandos –y otros co-receptores- cuya presencia pueda modular su efecto.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo de tesis doctoral son las siguientes:

1. La deficiencia de ALK1 se asocia a una mayor fibrosis renal tras la OUU, una mayor síntesis de proteínas de MEC, y una mayor proliferación y migración en MEFs debido a una menor activación de la vía de ALK1/Smad1/5/8 y una mayor activación de la vía de ALK5/Smad2/3.
2. La sobreexpresión de endoglina humana en ratón da lugar a una mayor fibrosis renal inducida por OUU, debido a una mayor activación tanto de la vía de Smad1 como de la vía de Smad2/3.
3. El tratamiento con BMP9 aumenta la síntesis de proteínas de MEC y estimula las vías de señalización de Smad1/5/8 y Smad2/3. Para ello es necesaria la presencia de ALK1 y ALK5. La sobreexpresión de endoglina potencia este fenómeno.
4. El papel antifibrótico o fibrótico de ALK1 depende de la presencia o ausencia de ligandos específicos y de otros receptores y correceptores de la familia del TGF- β .

CONCLUSIONES

1. Partial ALK1 deficiency is associated to a higher renal fibrosis after UUO and higher ECM protein synthesis, cell proliferation and migration in a mechanism based in a lower activation of the ALK1/Smad1/5/8 pathway and a higher activation of the ALK5/Smad2/3 pathway.
2. Overexpression of human L-endoglin leads to a higher UUO-induced renal fibrosis, because of the increased activation of Smad1 and Smad2/3 pathways.
3. Stimulation with BMP9 increases ECM protein expression and stimulates Smad1/5/8 and Smad2/3 pathways. For this mechanism, both ALK1 and ALK5 presence is required. Endoglin overexpression enhances this phenomenon.
4. The antifibrotic or profibrotic role of ALK1 depends on the presence or absence of specific ligands and other TGF- β receptors and co-receptors.

BIBLIografía

1. Remuzzi, A., Cornolti R., Bianchi R., Figliuzzi M., Porretta-Serapiglia C., Oggioni N., Carozzi V., Crippa L., Avezza F., Fiordaliso F., Salio M., Lauria G., Lombardi R., Cavaletti G. (2009) Regression of diabetic complications by islet transplantation in the rat. *Diabetologia*. 52, 2653-2661.
2. Boor, P., Floege J. (2012) The renal (myo-)fibroblast: a heterogeneous group of cells. *Nephrol Dial Transplant*. 27, 3027-3036.
3. Coresh, J., Selvin E., Stevens L.A., Manzi J., Kusek J.W., Eggers P., Van Lente F., Levey A.S. (2007) Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*. 298, 2038-2047.
4. Cogan, M.G. (1980) Medical Staff Conference. Tubulo-interstitial nephropathies--a pathophysiologic approach. *West J Med*. 132, 134-140.
5. Lopez-Novoa, J.M., Rodriguez-Pena A.B., Ortiz A., Martinez-Salgado C., Lopez Hernandez F.J. (2011) Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: clinical implications. *J Transl Med*. 9, 13.
6. Piscator, M. (1991) Early detection of tubular dysfunction. *Kidney Int Suppl*. 34, S15-17.
7. Blythe, W.B. (1985) Natural history of hypertension in renal parenchymal disease. *Am J Kidney Dis*. 5, A50-56.
8. Strutz, F., Neilson E.G. (1994) The role of lymphocytes in the progression of interstitial disease. *Kidney Int Suppl*. 45, S106-110.
9. Eddy, A.A. (2005) Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 12, 353-365.
10. Eddy, A.A. (1994) Experimental insights into the tubulointerstitial disease accompanying primary glomerular lesions. *J Am Soc Nephrol*. 5, 1273-1287.
11. Couser, W.G., Johnson R.J. (1994) Mechanisms of progressive renal disease in glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis*. 23, 193-198.
12. Isaka, Y., Akagi Y., Ando Y., Tsujie M., Imai E. (1999) Cytokines and glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 14 Suppl 1, 30-32.

13. Nangaku, M., Pippin J., Couser W.G. (1999) Complement membrane attack complex (C5b-9) mediates interstitial disease in experimental nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 10, 2323-2331.
14. Cunard, R., Kelly C.J. (2003) 18. Immune-mediated renal disease. *J Allergy Clin Immunol.* 111, S637-644.
15. Lopez-Novoa, J.M., Martinez-Salgado C., Rodriguez-Pena A.B., Lopez-Hernandez F.J. (2010) Common pathophysiological mechanisms of chronic kidney disease: therapeutic perspectives. *Pharmacol Ther.* 128, 61-81.
16. Olin, J.W. (2002) Atherosclerotic renal artery disease. *Cardiol Clin.* 20, 547-562, vi.
17. de Mast, Q., Beutler J.J. (2009) The prevalence of atherosclerotic renal artery stenosis in risk groups: a systematic literature review. *J Hypertens.* 27, 1333-1340.
18. Rihal, C.S., Textor S.C., Breen J.F., McKusick M.A., Grill D.E., Hallett J.W., Holmes D.R., Jr. (2002) Incidental renal artery stenosis among a prospective cohort of hypertensive patients undergoing coronary angiography. *Mayo Clin Proc.* 77, 309-316.
19. Garovic, V.D., Textor S.C. (2005) Renovascular hypertension and ischemic nephropathy. *Circulation.* 112, 1362-1374.
20. Zeisberg, M., Kalluri R. (2013) Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 304, C216-225.
21. Morris, E., Chrobak I., Bujor A., Hant F., Mummery C., Ten Dijke P., Trojanowska M. (2011) Endoglin promotes TGF-beta/Smad1 signaling in scleroderma fibroblasts. *J Cell Physiol.* 226, 3340-3348.
22. Strutz, F., Zeisberg M. (2006) Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 17, 2992-2998.
23. Munoz-Felix, J.M., Gonzalez-Nunez M., Lopez-Novoa J.M. (2013) ALK1-Smad1/5 signaling pathway in fibrosis development: friend or foe? *Cytokine Growth Factor Rev.* 24, 523-537.
24. Boor, P., Ostendorf T., Floege J. (2010) Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol.* 6, 643-656.

25. Lopez-Hernandez, F.J., Lopez-Novoa J.M. (2012) Role of TGF-beta in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res.* 347, 141-154.
26. Grande, M.T., Lopez-Novoa J.M. (2009) Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. *Nat Rev Nephrol.* 5, 319-328.
27. Rodriguez-Pena, A.B., Grande M.T., Eleno N., Arevalo M., Guerrero C., Santos E., Lopez-Novoa J.M. (2008) Activation of Erk1/2 and Akt following unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 74, 196-209.
28. Truong, L.D., Petrussevska G., Yang G., Gurpinar T., Shappell S., Lechago J., Rouse D., Suki W.N. (1996) Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy. *Kidney Int.* 50, 200-207.
29. Grande, M.T., Arevalo M., Nunez A., Cannata-Andia J.B., Santos E., Lopez-Novoa J.M. (2009) Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras has no effect on early renal changes after unilateral ureteral ligation. *World J Urol.* 27, 787-797.
30. Kaissling, B., Le Hir M. (2008) The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. *Histochem Cell Biol.* 130, 247-262.
31. Chang, H.Y., Chi J.T., Dudoit S., Bondre C., van de Rijn M., Botstein D., Brown P.O. (2002) Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 12877-12882.
32. Picard, N., Baum O., Vogetseder A., Kaissling B., Le Hir M. (2008) Origin of renal myofibroblasts in the model of unilateral ureter obstruction in the rat. *Histochem Cell Biol.* 130, 141-155.
33. Lin, S.L., Kisseleva T., Brenner D.A., Duffield J.S. (2008) Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol.* 173, 1617-1627.
34. Alvarez, R.J., Sun M.J., Haverty T.P., Iozzo R.V., Myers J.C., Neilson E.G. (1992) Biosynthetic and proliferative characteristics of tubulointerstitial fibroblasts probed with paracrine cytokines. *Kidney Int.* 41, 14-23.
35. Alpers, C.E., Seifert R.A., Hudkins K.L., Johnson R.J., Bowen-Pope D.F. (1993) PDGF-receptor localizes to mesangial, parietal epithelial, and interstitial cells in human and primate kidneys. *Kidney Int.* 43, 286-294.

36. Strutz, F., Zeisberg M., Ziyadeh F.N., Yang C.Q., Kalluri R., Muller G.A., Neilson E.G. (2002) Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int.* 61, 1714-1728.
37. Chevalier, R.L., Forbes M.S., Thornhill B.A. (2009) Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 75, 1145-1152.
38. LeBleu, V.S., Taduri G., O'Connell J., Teng Y., Cooke V.G., Woda C., Sugimoto H., Kalluri R. (2013) Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med.* 19, 1047-1053.
39. Boor, P., Konieczny A., Villa L., Schult A.L., Bucher E., Rong S., Kunter U., van Roeyen C.R., Polakowski T., Hawlisch H., Hillebrandt S., Lammert F., Eitner F., Floege J., Ostendorf T. (2007) Complement C5 mediates experimental tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 18, 1508-1515.
40. Chevalier, R.L. (2006) Pathogenesis of renal injury in obstructive uropathy. *Curr Opin Pediatr.* 18, 153-160.
41. Chevalier, R.L. (2006) Obstructive nephropathy: towards biomarker discovery and gene therapy. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2, 157-168.
42. Iwano, M., Plieth D., Danoff T.M., Xue C., Okada H., Neilson E.G. (2002) Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest.* 110, 341-350.
43. Xu, J., Lamouille S., Derynck R. (2009) TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 19, 156-172.
44. Docherty, N.G., Morales A.I., Lopez Novoa J.M., Perez Barriocanal F. (2007) [The transition of epithelial cells to fibrocytes. Mechanisms involved and its possible relationship with renal fibrosis]. *Nefrologia.* 27, 681-688.
45. Zeisberg, M., Kalluri R. (2004) The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med (Berl).* 82, 175-181.
46. Koesters, R., Kaissling B., Lehir M., Picard N., Theilig F., Gebhardt R., Glick A.B., Hahnel B., Hossler H., Grone H.J., Kriz W. (2010) Tubular overexpression of transforming growth factor-beta1 induces autophagy and fibrosis but not mesenchymal transition of renal epithelial cells. *Am J Pathol.* 177, 632-643.
47. Zeisberg, E.M., Potenta S.E., Sugimoto H., Zeisberg M., Kalluri R. (2008) Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol.* 19, 2282-2287.

48. Wilkinson, L., Gilbert T., Sipos A., Toma I., Pennisi D.J., Peti-Peterdi J., Little M.H. (2009) Loss of renal microvascular integrity in postnatal *Crim1* hypomorphic transgenic mice. *Kidney Int.* 76, 1161-1171.
49. Henderson, N.C., Mackinnon A.C., Farnworth S.L., Kipari T., Haslett C., Iredale J.P., Liu F.T., Hughes J., Sethi T. (2008) Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *Am J Pathol.* 172, 288-298.
50. Ma, F.Y., Liu J., Kitching A.R., Manthey C.L., Nikolic-Paterson D.J. (2009) Targeting renal macrophage accumulation via *c-fms* kinase reduces tubular apoptosis but fails to modify progressive fibrosis in the obstructed rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 296, F177-185.
51. Bascands, J.L., Schanstra J.P. (2005) Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney Int.* 68, 925-937.
52. Massague, J. (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1, 169-178.
53. Wiercinska, E., Wickert L., Denecke B., Said H.M., Hamzavi J., Gressner A.M., Thorikay M., ten Dijke P., Mertens P.R., Breitkopf K., Dooley S. (2006) Id1 is a critical mediator in TGF-beta-induced transdifferentiation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology.* 43, 1032-1041.
54. Kapur, N.K., Wilson S., Yunis A.A., Qiao X., Mackey E., Paruchuri V., Baker C., Aronovitz M.J., Karumanchi S.A., Letarte M., Kass D.A., Mendelsohn M.E., Karas R.H. (2012) Reduced endoglin activity limits cardiac fibrosis and improves survival in heart failure. *Circulation.* 125, 2728-2738.
55. Leask, A., Abraham D.J., Finlay D.R., Holmes A., Pennington D., Shi-Wen X., Chen Y., Venstrom K., Dou X., Ponticos M., Black C., Bernabeu C., Jackman J.K., Findell P.R., Connolly M.K. (2002) Dysregulation of transforming growth factor beta signaling in scleroderma: overexpression of endoglin in cutaneous scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 46, 1857-1865.
56. Garcia-Sanchez, O., Lopez-Hernandez F.J., Lopez-Novoa J.M. (2010) An integrative view on the role of TGF-beta in the progressive tubular deletion associated with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 77, 950-955.
57. Bottinger, E.P., Bitzer M. (2002) TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 13, 2600-2610.

58. Sutaria, P.M., Ohebshalom M., McCaffrey T.A., Vaughan E.D., Jr., Felsen D. (1998) Transforming growth factor-beta receptor types I and II are expressed in renal tubules and are increased after chronic unilateral ureteral obstruction. *Life Sci.* 62, 1965-1972.
59. Rodriguez-Pena, A., Prieto M., Duwel A., Rivas J.V., Eleno N., Perez-Barriocanal F., Arevalo M., Smith J.D., Vary C.P., Bernabeu C., Lopez-Novoa J.M. (2001) Up-regulation of endoglin, a TGF-beta-binding protein, in rats with experimental renal fibrosis induced by renal mass reduction. *Nephrol Dial Transplant.* 16 Suppl 1, 34-39.
60. Rodriguez-Pena, A., Eleno N., Duwell A., Arevalo M., Perez-Barriocanal F., Flores O., Docherty N., Bernabeu C., Letarte M., Lopez-Novoa J.M. (2002) Endoglin upregulation during experimental renal interstitial fibrosis in mice. *Hypertension.* 40, 713-720.
61. Prieto, M., Rodriguez-Pena A.B., Duwel A., Rivas J.V., Docherty N., Perez-Barriocanal F., Arevalo M., Vary C.P., Bernabeu C., Lopez-Novoa J.M., Eleno N. (2005) Temporal changes in renal endoglin and TGF-beta1 expression following ureteral obstruction in rats. *J Physiol Biochem.* 61, 457-467.
62. Moon, J.A., Kim H.T., Cho I.S., Sheen Y.Y., Kim D.K. (2006) IN-1130, a novel transforming growth factor-beta type I receptor kinase (ALK5) inhibitor, suppresses renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 70, 1234-1243.
63. Sato, M., Muragaki Y., Saika S., Roberts A.B., Ooshima A. (2003) Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest.* 112, 1486-1494.
64. Goumans, M.J., Valdimarsdottir G., Itoh S., Rosendahl A., Sideras P., ten Dijke P. (2002) Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* 21, 1743-1753.
65. Lebrin, F., Deckers M., Bertolino P., Ten Dijke P. (2005) TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res.* 65, 599-608.
66. Bertolino, P., Deckers M., Lebrin F., ten Dijke P. (2005) Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest.* 128, 585S-590S.
67. Grande, M.T., Fuentes-Calvo I., Arevalo M., Heredia F., Santos E., Martinez-Salgado C., Rodriguez-Puyol D., Nieto M.A., Lopez-Novoa J.M. (2010) Deletion of H-Ras decreases renal fibrosis and myofibroblast activation following ureteral obstruction in mice. *Kidney Int.* 77, 509-518.
68. Fuentes-Calvo, I., Blazquez-Medela A.M., Eleno N., Santos E., Lopez-Novoa J.M., Martinez-Salgado C. (2012) H-Ras isoform modulates extracellular matrix synthesis, proliferation, and migration in fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 302, C686-697.

69. Martinez-Salgado, C., Fuentes-Calvo I., Garcia-Cenador B., Santos E., Lopez-Novoa J.M. (2006) Involvement of H- and N-Ras isoforms in transforming growth factor-beta1-induced proliferation and in collagen and fibronectin synthesis. *Exp Cell Res.* 312, 2093-2106.
70. Eikmans, M., Baelde J.J., de Heer E., Bruijn J.A. (2003) ECM homeostasis in renal diseases: a genomic approach. *J Pathol.* 200, 526-536.
71. Velasco, S., Alvarez-Munoz P., Pericacho M., Dijke P.T., Bernabeu C., Lopez-Novoa J.M., Rodriguez-Barbero A. (2008) L- and S-endoglin differentially modulate TGFbeta1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *J Cell Sci.* 121, 913-919.
72. Laping, N.J., Grygielko E., Mathur A., Butter S., Bomberger J., Tweed C., Martin W., Fornwald J., Lehr R., Harling J., Gaster L., Callahan J.F., Olson B.A. (2002) Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol Pharmacol.* 62, 58-64.
73. Eddy, A.A. (1998) Interstitial fibrosis in hypercholesterolemic rats: role of oxidation, matrix synthesis, and proteolytic cascades. *Kidney Int.* 53, 1182-1189.
74. Docherty, N.G., O'Sullivan O.E., Healy D.A., Murphy M., O'Neill A J., Fitzpatrick J.M., Watson R.W. (2006) TGF-beta1-induced EMT can occur independently of its proapoptotic effects and is aided by EGF receptor activation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290, F1202-1212.
75. Sanchez-Lopez, E., Rodrigues Diez R., Rodriguez Vita J., Rayego Mateos S., Rodrigues Diez R.R., Rodriguez Garcia E., Lavoz Barria C., Mezzano S., Egido J., Ortiz A., Ruiz-Ortega M., Selgas R. (2009) [Connective tissue growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage]. *Nefrologia.* 29, 382-391.
76. Sanchez-Lopez, E., Rayego S., Rodrigues-Diez R., Rodriguez J.S., Rodriguez-Vita J., Carvajal G., Aroeira L.S., Selgas R., Mezzano S.A., Ortiz A., Egido J., Ruiz-Ortega M. (2009) CTGF promotes inflammatory cell infiltration of the renal interstitium by activating NF-kappaB. *J Am Soc Nephrol.* 20, 1513-1526.
77. Ruperez, M., Ruiz-Ortega M., Esteban V., Lorenzo O., Mezzano S., Plaza J.J., Egido J. (2003) Angiotensin II increases connective tissue growth factor in the kidney. *Am J Pathol.* 163, 1937-1947.
78. Ruperez, M., Lorenzo O., Blanco-Colio L.M., Esteban V., Egido J., Ruiz-Ortega M. (2003) Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation.* 108, 1499-1505.

79. Liu, B.C., Chen L., Sun J., Huang H.Q., Ma K.L., Liu H., Liu D.G., Zhang X.L. (2006) Connective tissue growth factor-mediated angiotensin II-induced hypertrophy of proximal tubular cells. *Nephron Exp Nephrol.* 103, e16-26.
80. Rodrigues-Diez, R., Carvajal-Gonzalez G., Sanchez-Lopez E., Rodriguez-Vita J., Rodriguez Diez R., Selgas R., Ortiz A., Egido J., Mezzano S., Ruiz-Ortega M. (2008) Pharmacological modulation of epithelial mesenchymal transition caused by angiotensin II. Role of ROCK and MAPK pathways. *Pharm Res.* 25, 2447-2461.
81. Meng, X.M., Chung A.C., Lan H.Y. (2013) Role of the TGF-beta/BMP-7/Smad pathways in renal diseases. *Clin Sci (Lond).* 124, 243-254.
82. Zeisberg, M., Bottiglio C., Kumar N., Maeshima Y., Strutz F., Muller G.A., Kalluri R. (2003) Bone morphogenic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *Am J Physiol Renal Physiol.* 285, F1060-1067.
83. Manson, S.R., Niederhoff R.A., Hruska K.A., Austin P.F. (2011) The BMP-7-Smad1/5/8 pathway promotes kidney repair after obstruction induced renal injury. *J Urol.* 185, 2523-2530.
84. Sugimoto, H., LeBleu V.S., Bosukonda D., Keck P., Taduri G., Bechtel W., Okada H., Carlson W., Jr., Bey P., Rusckowski M., Tampe B., Tampe D., Kanasaki K., Zeisberg M., Kalluri R. (2012) Activin-like kinase 3 is important for kidney regeneration and reversal of fibrosis. *Nat Med.* 18, 396-404.
85. Yanagita, M. (2012) Inhibitors/antagonists of TGF-beta system in kidney fibrosis. *Nephrol Dial Transplant.* 27, 3686-3691.
86. Floege, J., Eitner F., Alpers C.E. (2008) A new look at platelet-derived growth factor in renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 19, 12-23.
87. Taneda, S., Hudkins K.L., Topouzis S., Gilbertson D.G., Ophascharoensuk V., Truong L., Johnson R.J., Alpers C.E. (2003) Obstructive uropathy in mice and humans: potential role for PDGF-D in the progression of tubulointerstitial injury. *J Am Soc Nephrol.* 14, 2544-2555.
88. Hawthorne, T., Giot L., Blake L., Kuang B., Gerwien R., Smithson G., Hahne W., Mansfield T., Starling G.C., Pochart P., Hoelscher D., Halvorsen Y.D. (2008) A phase I study of CR002, a fully-human monoclonal antibody against platelet-derived growth factor-D. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 46, 236-244.

89. Floege, J., van Roeyen C., Boor P., Ostendorf T. (2007) The role of PDGF-D in mesangioproliferative glomerulonephritis. *Contrib Nephrol.* 157, 153-158.
90. Eitner, F., Ostendorf T., Kretzler M., Cohen C.D., Eriksson U., Grone H.J., Floege J. (2003) PDGF-C expression in the developing and normal adult human kidney and in glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol.* 14, 1145-1153.
91. Pecoits-Filho, R., Lindholm B., Axelsson J., Stenvinkel P. (2003) Update on interleukin-6 and its role in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 18, 1042-1045.
92. Esposito, C., Parrilla B., De Mauri A., Cornacchia F., Fasoli G., Foschi A., Mazzullo T., Plati A., Scudellaro R., Dal Canton A. (2005) Hepatocyte growth factor (HGF) modulates matrix turnover in human glomeruli. *Kidney Int.* 67, 2143-2150.
93. Mizuno, S., Kurosawa T., Matsumoto K., Mizuno-Horikawa Y., Okamoto M., Nakamura T. (1998) Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. *J Clin Invest.* 101, 1827-1834.
94. Mizuno, S., Matsumoto K., Kurosawa T., Mizuno-Horikawa Y., Nakamura T. (2000) Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-beta 1 in renal fibrosis in mice. *Kidney Int.* 57, 937-948.
95. Liu, Y. (2004) Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *Am J Physiol Renal Physiol.* 287, F7-16.
96. Ruiz-Ortega, M., Esteban V., Suzuki Y., Ruperez M., Mezzano S., Ardiles L., Justo P., Ortiz A., Egido J. (2003) Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage. *Kidney Int Suppl.* S21-26.
97. Ruiz-Ortega, M., Ruperez M., Esteban V., Rodriguez-Vita J., Sanchez-Lopez E., Carvajal G., Egido J. (2006) Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant.* 21, 16-20.
98. Wolf, G. (2006) Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int.* 70, 1914-1919.
99. Esteban, V., Lorenzo O., Ruperez M., Suzuki Y., Mezzano S., Blanco J., Kretzler M., Sugaya T., Egido J., Ruiz-Ortega M. (2004) Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol.* 15, 1514-1529.
100. Boor, P., Sebekova K., Ostendorf T., Floege J. (2007) Treatment targets in renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant.* 22, 3391-3407.

101. Meng, X.M., Huang X.R., Xiao J., Chen H.Y., Zhong X., Chung A.C., Lan H.Y. (2012) Diverse roles of TGF-beta receptor II in renal fibrosis and inflammation in vivo and in vitro. *J Pathol.* 227, 175-188.
102. Meng, X.M., Huang X.R., Chung A.C., Qin W., Shao X., Igarashi P., Ju W., Bottinger E.P., Lan H.Y. (2010) Smad2 protects against TGF-beta/Smad3-mediated renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 21, 1477-1487.
103. Meng, X.M., Huang X.R., Xiao J., Chung A.C., Qin W., Chen H.Y., Lan H.Y. (2012) Disruption of Smad4 impairs TGF-beta/Smad3 and Smad7 transcriptional regulation during renal inflammation and fibrosis in vivo and in vitro. *Kidney Int.* 81, 266-279.
104. Alberts. B., Bray. D., Lewis. J., Raff. M., Roberts. K., Watson, J.D. . *Biología Molecular de la célula.*, 3º Ed. Editorial Omega. Barcelona, 2004.
105. Stetler-Stevenson, W.G. (1996) Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *Am J Pathol.* 148, 1345-1350.
106. Waller, J.R., Nicholson M.L. (2001) Molecular mechanisms of renal allograft fibrosis. *Br J Surg.* 88, 1429-1441.
107. Ye, S., Humphries S., Henney A. (1998) Matrix metalloproteinases: implication in vascular matrix remodelling during atherogenesis. *Clin Sci (Lond).* 94, 103-110.
108. ten Dijke, P., Hill C.S. (2004) New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci.* 29, 265-273.
109. Ihn, H., Yamane K., Kubo M., Tamaki K. (2001) Blockade of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor beta receptors. *Arthritis Rheum.* 44, 474-480.
110. Kawakami, T., Ihn H., Xu W., Smith E., LeRoy C., Trojanowska M. (1998) Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. *J Invest Dermatol.* 110, 47-51.
111. Kubo, M., Ihn H., Yamane K., Asano Y., Jinnin M., Tamaki K. (2001) Differential expression of transforming growth factor-beta receptors in squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 145, 840-842.

112. Roulot, D., Sevcsik A.M., Coste T., Strosberg A.D., Marullo S. (1999) Role of transforming growth factor beta type II receptor in hepatic fibrosis: studies of human chronic hepatitis C and experimental fibrosis in rats. *Hepatology*. 29, 1730-1738.
113. Shen, N., Lin H., Wu T., Wang D., Wang W., Xie H., Zhang J., Feng Z. (2013) Inhibition of TGF-beta1-receptor posttranslational core fucosylation attenuates rat renal interstitial fibrosis. *Kidney Int*. 84, 64-77.
114. Munoz-Felix, J.M., Lopez-Novoa J.M., Martinez-Salgado C. (2014) Heterozygous disruption of activin receptor-like kinase 1 is associated with increased renal fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Int*. 85, 319-332.
115. Scharpfenecker, M., Froot B., Russell N.S., Ten Dijke P., Stewart F.A. (2009) Endoglin haploinsufficiency reduces radiation-induced fibrosis and telangiectasia formation in mouse kidneys. *Radiother Oncol*. 92, 484-491.
116. Scharpfenecker, M., Froot B., Korlaar R., Russell N.S., Stewart F.A. (2011) ALK1 heterozygosity delays development of late normal tissue damage in the irradiated mouse kidney. *Radiother Oncol*. 99, 349-355.
117. Qi, Z., Atsuchi N., Ooshima A., Takeshita A., Ueno H. (1999) Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96, 2345-2349.
118. Letamendia, A., Lastres P., Almendro N., Raab U., Buhring H.J., Kumar S., Bernabeu C. (1998) Endoglin, a component of the TGF-beta receptor system, is a differentiation marker of human choriocarcinoma cells. *Int J Cancer*. 76, 541-546.
119. Oujo, B., Perez-Barriocanal F., Bernabeu C., Lopez-Novoa J.M. (2013) Membrane and soluble forms of endoglin in preeclampsia. *Curr Mol Med*. 13, 1345-1357.
120. Miyazono, K. (1997) TGF-beta receptors and signal transduction. *Int J Hematol*. 65, 97-104.
121. Wrana, J.L., Attisano L. (2000) The Smad pathway. *Cytokine Growth Factor Rev*. 11, 5-13.
122. Miyazono, K. (2000) TGF-beta signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*. 11, 15-22.
123. Wrana, J.L. (2000) Regulation of Smad activity. *Cell*. 100, 189-192.

124. Lebrin, F., Goumans M.J., Jonker L., Carvalho R.L., Valdimarsdottir G., Thorikay M., Mummery C., Arthur H.M., ten Dijke P. (2004) Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 23, 4018-4028.
125. Hawinkels, L.J., Garcia de Vinuesa A., Ten Dijke P. (2013) Activin receptor-like kinase 1 as a target for anti-angiogenesis therapy. *Expert Opin Investig Drugs.* 22, 1371-1383.
126. Gonzalez-Nunez, M., Munoz-Felix J.M., Lopez-Novoa J.M. (2013) The ALK-1/Smad1 pathway in cardiovascular physiopathology. A new target for therapy? *Biochim Biophys Acta.* 1832, 1492-1510.
127. David, L., Feige J.J., Bailly S. (2009) Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 203-212.
128. Herrera, B., van Dinther M., Ten Dijke P., Inman G.J. (2009) Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Res.* 69, 9254-9262.
129. Herrera, B., Garcia-Alvaro M., Cruz S., Walsh P., Fernandez M., Roncero C., Fabregat I., Sanchez A., Inman G.J. (2013) BMP9 is a proliferative and survival factor for human hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One.* 8, e69535.
130. Laping, N.J. (2003) ALK5 inhibition in renal disease. *Curr Opin Pharmacol.* 3, 204-208.
131. Wang, W., Koka V., Lan H.Y. (2005) Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology (Carlton).* 10, 48-56.
132. Cunha, S.I., Pardali E., Thorikay M., Anderberg C., Hawinkels L., Goumans M.J., Sehra J., Heldin C.H., ten Dijke P., Pietras K. (2010) Genetic and pharmacological targeting of activin receptor-like kinase 1 impairs tumor growth and angiogenesis. *J Exp Med.* 207, 85-100.
133. Goumans, M.J., Liu Z., ten Dijke P. (2009) TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res.* 19, 116-127.
134. Lopez-Novoa, J.M., Bernabeu C. (2010) The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299, H959-974.
135. David, L., Mallet C., Mazerbourg S., Feige J.J., Bailly S. (2007) Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood.* 109, 1953-1961.

136. Levet, S., Ciais D., Merdzhanova G., Mallet C., Zimmers T.A., Lee S.J., Navarro F.P., Texier I., Feige J.J., Bailly S., Vittet D. (2013) Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) controls lymphatic vessel maturation and valve formation. *Blood*. 122, 598-607.
137. Ricard, N., Ciais D., Levet S., Subileau M., Mallet C., Zimmers T.A., Lee S.J., Bidart M., Feige J.J., Bailly S. (2012) BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood*. 119, 6162-6171.
138. Pannu, J., Nakerakanti S., Smith E., ten Dijke P., Trojanowska M. (2007) Transforming growth factor-beta receptor type I-dependent fibrogenic gene program is mediated via activation of Smad1 and ERK1/2 pathways. *J Biol Chem*. 282, 10405-10413.
139. Pannu, J., Asano Y., Nakerakanti S., Smith E., Jablonska S., Blaszczyk M., ten Dijke P., Trojanowska M. (2008) Smad1 pathway is activated in systemic sclerosis fibroblasts and is targeted by imatinib mesylate. *Arthritis Rheum*. 58, 2528-2537.
140. Finnson, K.W., Parker W.L., ten Dijke P., Thorikay M., Philip A. (2008) ALK1 opposes ALK5/Smad3 signaling and expression of extracellular matrix components in human chondrocytes. *J Bone Miner Res*. 23, 896-906.
141. Finnson, K.W., Parker W.L., Chi Y., Hoemann C.D., Goldring M.B., Antoniou J., Philip A. (2010) Endoglin differentially regulates TGF-beta-induced Smad2/3 and Smad1/5 signalling and its expression correlates with extracellular matrix production and cellular differentiation state in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 18, 1518-1527.
142. Munoz-Felix, J.M., Oujó B., Lopez-Novoa J.M. (2014) The role of endoglin in kidney fibrosis. *Expert Rev Mol Med*. 16, e18.
143. Bourdeau, A., Cymerman U., Paquet M.E., Meschino W., McKinnon W.C., Guttmacher A.E., Becker L., Letarte M. (2000) Endoglin expression is reduced in normal vessels but still detectable in arteriovenous malformations of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Am J Pathol*. 156, 911-923.
144. Lastres, P., Letamendia A., Zhang H., Rius C., Almendro N., Raab U., Lopez L.A., Langa C., Fabra A., Letarte M., Bernabeu C. (1996) Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol*. 133, 1109-1121.
145. Robledo, M.M., Sanz-Rodriguez F., Hidalgo A., Teixido J. (1998) Differential use of very late antigen-4 and -5 integrins by hematopoietic precursors and myeloma cells to adhere to transforming growth factor-beta1-treated bone marrow stroma. *J Biol Chem*. 273, 12056-12060.

146. Conley, B.A., Smith J.D., Guerrero-Esteo M., Bernabeu C., Vary C.P. (2000) Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*. 153, 323-335.
147. St-Jacques, S., Forte M., Lye S.J., Letarte M. (1994) Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol Reprod*. 51, 405-413.
148. Gu, Y., Lewis D.F., Wang Y. (2008) Placental productions and expressions of soluble endoglin, soluble fms-like tyrosine kinase receptor-1, and placental growth factor in normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab*. 93, 260-266.
149. Diez-Marques, L., Ortega-Velazquez R., Langa C., Rodriguez-Barbero A., Lopez-Novoa J.M., Lamas S., Bernabeu C. (2002) Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1587, 36-44.
150. Chen, K., Mehta J.L., Li D., Joseph L., Joseph J. (2004) Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *Circ Res*. 95, 1167-1173.
151. Pericacho, M., Velasco S., Prieto M., Llano E., Lopez-Novoa J.M., Rodriguez-Barbero A. (2013) Endoglin haploinsufficiency promotes fibroblast accumulation during wound healing through Akt activation. *PLoS One*. 8, e54687.
152. Meurer, S.K., Tihaa L., Lahme B., Gressner A.M., Weiskirchen R. (2005) Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor beta receptor signaling. *J Biol Chem*. 280, 3078-3087.
153. Meurer, S.K., Tihaa L., Borkham-Kamphorst E., Weiskirchen R. (2011) Expression and functional analysis of endoglin in isolated liver cells and its involvement in fibrogenic Smad signalling. *Cell Signal*. 23, 683-699.
154. Bellon, T., Corbi A., Lastres P., Cales C., Cebrian M., Vera S., Cheifetz S., Massague J., Letarte M., Bernabeu C. (1993) Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol*. 23, 2340-2345.
155. Perez-Gomez, E., Eleno N., Lopez-Novoa J.M., Ramirez J.R., Velasco B., Letarte M., Bernabeu C., Quintanilla M. (2005) Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene*. 24, 4450-4461.
156. Blanco, F.J., Grande M.T., Langa C., Oujo B., Velasco S., Rodriguez-Barbero A., Perez-Gomez E., Quintanilla M., Lopez-Novoa J.M., Bernabeu C. (2008) S-endoglin expression

- is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res.* 103, 1383-1392.
157. Venkatesha, S., Toporsian M., Lam C., Hanai J., Mammoto T., Kim Y.M., Bdolah Y., Lim K.H., Yuan H.T., Libermann T.A., Stillman I.E., Roberts D., D'Amore P.A., Epstein F.H., Sellke F.W., Romero R., Sukhatme V.P., Letarte M., Karumanchi S.A. (2006) Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med.* 12, 642-649.
158. Roy-Chaudhury, P., Simpson J.G., Power D.A. (1997) Endoglin, a transforming growth factor-beta-binding protein, is upregulated in chronic progressive renal disease. *Exp Nephrol.* 5, 55-60.
159. Rodriguez-Barbero, A., Obreo J., Alvarez-Munoz P., Pandiella A., Bernabeu C., Lopez-Novoa J.M. (2006) Endoglin modulation of TGF-beta1-induced collagen synthesis is dependent on ERK1/2 MAPK activation. *Cell Physiol Biochem.* 18, 135-142.
160. Burke, J.P., Watson R.W., Mulsow J.J., Docherty N.G., Coffey J.C., O'Connell P.R. (2010) Endoglin negatively regulates transforming growth factor beta1-induced profibrotic responses in intestinal fibroblasts. *Br J Surg.* 97, 892-901.
161. Santibanez, J.F., Letamendia A., Perez-Barriocanal F., Silvestri C., Saura M., Vary C.P., Lopez-Novoa J.M., Attisano L., Bernabeu C. (2007) Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol.* 210, 456-468.
162. Urist, M.R. (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science.* 150, 893-899.
163. Wozney, J.M., Rosen V., Celeste A.J., Mitsock L.M., Whitters M.J., Kriz R.W., Hewick R.M., Wang E.A. (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 242, 1528-1534.
164. Herrera, B., Dooley S., Breitkopf-Heinlein K. (2014) Potential roles of bone morphogenetic protein (BMP)-9 in human liver diseases. *Int J Mol Sci.* 15, 5199-5220.
165. Mueller, T.D., Nickel J. (2012) Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett.* 586, 1846-1859.
166. Brown, M.A., Zhao Q., Baker K.A., Naik C., Chen C., Pukac L., Singh M., Tsareva T., Parice Y., Mahoney A., Roschke V., Sanyal I., Choe S. (2005) Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J Biol Chem.* 280, 25111-25118.

167. Townson, S.A., Martinez-Hackert E., Greppi C., Lowden P., Sako D., Liu J., Ucran J.A., Liharska K., Underwood K.W., Seehra J., Kumar R., Grinberg A.V. (2012) Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. *J Biol Chem.* 287, 27313-27325.
168. Scharpfenecker, M., van Dinther M., Liu Z., van Bezooijen R.L., Zhao Q., Pukac L., Lowik C.W., ten Dijke P. (2007) BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci.* 120, 964-972.
169. Star, G.P., Giovinazzo M., Langleben D. (2010) Bone morphogenic protein-9 stimulates endothelin-1 release from human pulmonary microvascular endothelial cells: a potential mechanism for elevated ET-1 levels in pulmonary arterial hypertension. *Microvasc Res.* 80, 349-354.
170. Castonguay, R., Werner E.D., Matthews R.G., Presman E., Mulivor A.W., Solban N., Sako D., Pearsall R.S., Underwood K.W., Seehra J., Kumar R., Grinberg A.V. (2011) Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. *J Biol Chem.* 286, 30034-30046.
171. Bidart, M., Ricard N., Levet S., Samson M., Mallet C., David L., Subileau M., Tillet E., Feige J.J., Bailly S. (2012) BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell Mol Life Sci.* 69, 313-324.
172. Upton, P.D., Davies R.J., Trembath R.C., Morrell N.W. (2009) Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem.* 284, 15794-15804.
173. Zhao, Y.F., Xu J., Wang W.J., Wang J., He J.W., Li L., Dong Q., Xiao Y., Duan X.L., Yang X., Liang Y.W., Song T., Tang M., Zhao D., Luo J.Y. (2013) Activation of JNKs is essential for BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *BMB Rep.* 46, 422-427.
174. Xu, D.J., Zhao Y.Z., Wang J., He J.W., Weng Y.G., Luo J.Y. (2012) Smads, p38 and ERK1/2 are involved in BMP9-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells. *BMB Rep.* 45, 247-252.
175. Zhao, Y., Song T., Wang W., Wang J., He J., Wu N., Tang M., He B., Luo J. (2012) P38 and ERK1/2 MAPKs act in opposition to regulate BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *PLoS One.* 7, e43383.
176. Ye, G., Li C., Xiang X., Chen C., Zhang R., Yang X., Yu X., Wang J., Wang L., Shi Q., Weng Y. (2014) Bone morphogenetic protein-9 induces PDLSCs osteogenic differentiation through the ERK and p38 signal pathways. *Int J Med Sci.* 11, 1065-1072.

177. Majumdar, M.K., Wang E., Morris E.A. (2001) BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol.* 189, 275-284.
178. Peng, Y., Kang Q., Cheng H., Li X., Sun M.H., Jiang W., Luu H.H., Park J.Y., Haydon R.C., He T.C. (2003) Transcriptional characterization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-mediated osteogenic signaling. *J Cell Biochem.* 90, 1149-1165.
179. Sharff, K.A., Song W.X., Luo X., Tang N., Luo J., Chen J., Bi Y., He B.C., Huang J., Li X., Jiang W., Zhu G.H., Su Y., He Y., Shen J., Wang Y., Chen L., Zuo G.W., Liu B., Pan X., Reid R.R., Luu H.H., Haydon R.C., He T.C. (2009) Hey1 basic helix-loop-helix protein plays an important role in mediating BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *J Biol Chem.* 284, 649-659.
180. Wang, J.H., Liu Y.Z., Yin L.J., Chen L., Huang J., Liu Y., Zhang R.X., Zhou L.Y., Yang Q.J., Luo J.Y., Zuo G.W., Deng Z.L., He B.C. (2013) BMP9 and COX-2 form an important regulatory loop in BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Bone.* 57, 311-321.
181. Park, H., Drevelle O., Daviau A., Senta H., Bergeron E., Faucheux N. (2013) Preventing MEK1 activation influences the responses of human osteosarcoma cells to bone morphogenetic proteins 2 and 9. *Anticancer Drugs.* 24, 278-290.
182. Nakamura, T., Shinohara Y., Momozaki S., Yoshimoto T., Noguchi K. (2013) Co-stimulation with bone morphogenetic protein-9 and FK506 induces remarkable osteoblastic differentiation in rat dedifferentiated fat cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 440, 289-294.
183. Hu, N., Jiang D., Huang E., Liu X., Li R., Liang X., Kim S.H., Chen X., Gao J.L., Zhang H., Zhang W., Kong Y.H., Zhang J., Wang J., Shui W., Luo X., Liu B., Cui J., Rogers M.R., Shen J., Zhao C., Wang N., Wu N., Luu H.H., Haydon R.C., He T.C., Huang W. (2013) BMP9-regulated angiogenic signaling plays an important role in the osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *J Cell Sci.* 126, 532-541.
184. Lopez-Coviella, I., Follettie M.T., Mellott T.J., Kovacheva V.P., Slack B.E., Diesl V., Berse B., Thies R.S., Blusztajn J.K. (2005) Bone morphogenetic protein 9 induces the transcriptome of basal forebrain cholinergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 6984-6989.
185. Schnitzler, A.C., Mellott T.J., Lopez-Coviella I., Tallini Y.N., Kotlikoff M.I., Follettie M.T., Blusztajn J.K. (2010) BMP9 (bone morphogenetic protein 9) induces NGF as an autocrine/paracrine cholinergic trophic factor in developing basal forebrain neurons. *J Neurosci.* 30, 8221-8228.

186. Kim, J.H., Peacock M.R., George S.C., Hughes C.C. (2012) BMP9 induces EphrinB2 expression in endothelial cells through an Alk1-BMPRII/ActRII-ID1/ID3-dependent pathway: implications for hereditary hemorrhagic telangiectasia type II. *Angiogenesis*. 15, 497-509.
187. Park, J.E., Shao D., Upton P.D., Desouza P., Adcock I.M., Davies R.J., Morrell N.W., Griffiths M.J., Wort S.J. (2012) BMP-9 induced endothelial cell tubule formation and inhibition of migration involves Smad1 driven endothelin-1 production. *PLoS One*. 7, e30075.
188. Somekawa, S., Imagawa K., Hayashi H., Sakabe M., Ioka T., Sato G.E., Inada K., Iwamoto T., Mori T., Uemura S., Nakagawa O., Saito Y. (2012) Tmem100, an ALK1 receptor signaling-dependent gene essential for arterial endothelium differentiation and vascular morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109, 12064-12069.
189. Wang, R.H., Li C., Xu X., Zheng Y., Xiao C., Zerfas P., Cooperman S., Eckhaus M., Rouault T., Mishra L., Deng C.X. (2005) A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. 2, 399-409.
190. Li, Q., Gu X., Weng H., Ghafoory S., Liu Y., Feng T., Dzieran J., Li L., Ilkavets I., Kruihof-de Julio M., Munker S., Marx A., Piiper A., Augusto Alonso E., Gretz N., Gao C., Wolf S., Dooley S., Breitkopf-Heinlein K. (2013) Bone morphogenetic protein-9 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci*. 104, 398-408.
191. Oh, S.P., Seki T., Goss K.A., Imamura T., Yi Y., Donahoe P.K., Li L., Miyazono K., ten Dijke P., Kim S., Li E. (2000) Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 2626-2631.
192. Chen, H., Brady Ridgway J., Sai T., Lai J., Warming S., Roose-Girma M., Zhang G., Shou W., Yan M. (2013) Context-dependent signaling defines roles of BMP9 and BMP10 in embryonic and postnatal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110, 11887-11892.
193. Jonker, L. (2014) TGF-beta & BMP receptors endoglin and ALK1: overview of their functional role and status as antiangiogenic targets. *Microcirculation*. 21, 93-103.
194. David, L., Mallet C., Keramidas M., Lamande N., Gasc J.M., Dupuis-Girod S., Plauchu H., Feige J.J., Bailly S. (2008) Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res*. 102, 914-922.
195. Suzuki, Y., Ohga N., Morishita Y., Hida K., Miyazono K., Watabe T. (2010) BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *J Cell Sci*. 123, 1684-1692.

196. Larrivee, B., Prahst C., Gordon E., del Toro R., Mathivet T., Duarte A., Simons M., Eichmann A. (2012) ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. *Dev Cell.* 22, 489-500.
197. Miller, A.F., Harvey S.A., Thies R.S., Olson M.S. (2000) Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J Biol Chem.* 275, 17937-17945.
198. Chen, C., Grzegorzewski K.J., Barash S., Zhao Q., Schneider H., Wang Q., Singh M., Pukac L., Bell A.C., Duan R., Coleman T., Duttaroy A., Cheng S., Hirsch J., Zhang L., Lazard Y., Fischer C., Barber M.C., Ma Z.D., Zhang Y.Q., Reavey P., Zhong L., Teng B., Sanyal I., Ruben S.M., Blondel O., Birse C.E. (2003) An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat Biotechnol.* 21, 294-301.
199. Caperuto, L.C., Anhe G.F., Cambiaghi T.D., Akamine E.H., do Carmo Buonfiglio D., Cipolla-Neto J., Curi R., Bordin S. (2008) Modulation of bone morphogenetic protein-9 expression and processing by insulin, glucose, and glucocorticoids: possible candidate for hepatic insulin-sensitizing substance. *Endocrinology.* 149, 6326-6335.
200. Bendell, J.C., Gordon M.S., Hurwitz H.I., Jones S.F., Mendelson D.S., Blobe G.C., Agarwal N., Condon C.H., Wilson D., Pearsall A.E., Yang Y., McClure T., Attie K.M., Sherman M.L., Sharma S. (2014) Safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumor activity of dalantercept, an activin receptor-like kinase-1 ligand trap, in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 20, 480-489.
201. Hu-Lowe, D.D., Chen E., Zhang L., Watson K.D., Mancuso P., Lappin P., Wickman G., Chen J.H., Wang J., Jiang X., Amundson K., Simon R., Erbersdobler A., Bergqvist S., Feng Z., Swanson T.A., Simmons B.H., Lippincott J., Casperson G.F., Levin W.J., Stampino C.G., Shalinsky D.R., Ferrara K.W., Fiedler W., Bertolini F. (2011) Targeting activin receptor-like kinase 1 inhibits angiogenesis and tumorigenesis through a mechanism of action complementary to anti-VEGF therapies. *Cancer Res.* 71, 1362-1373.
202. Munoz-Felix, J.M., Perretta-Tejedor N., Eleno N., Lopez-Novoa J.M., Martinez-Salgado C. (2014) ALK1 heterozygosity increases extracellular matrix protein expression, proliferation and migration in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 1843, 1111-1122.
203. Zhu, D., Mackenzie N.C., Shanahan C.M., Shroff R.C., Farquharson C., MacRae V.E. (2015) BMP-9 regulates the osteoblastic differentiation and calcification of vascular smooth muscle cells through an ALK1 mediated pathway. *J Cell Mol Med.* 19, 165-174.
204. Scherner, O., Meurer S.K., Tihaa L., Gressner A.M., Weiskirchen R. (2007) Endoglin differentially modulates antagonistic transforming growth factor-beta1 and BMP-7 signaling. *J Biol Chem.* 282, 13934-13943.

205. Kapur, N.K., Qiao X., Paruchuri V., Mackey E.E., Daly G.H., Ughreja K., Morine K.J., Levine J., Aronovitz M.J., Hill N.S., Jaffe I.Z., Letarte M., Karas R.H. (2014) Reducing endoglin activity limits calcineurin and TRPC-6 expression and improves survival in a mouse model of right ventricular pressure overload. *J Am Heart Assoc.* 3.
206. Cunha, S.I., Pietras K. (2011) ALK1 as an emerging target for antiangiogenic therapy of cancer. *Blood.* 117, 6999-7006.
207. Luo, J., Tang M., Huang J., He B.C., Gao J.L., Chen L., Zuo G.W., Zhang W., Luo Q., Shi Q., Zhang B.Q., Bi Y., Luo X., Jiang W., Su Y., Shen J., Kim S.H., Huang E., Gao Y., Zhou J.Z., Yang K., Luu H.H., Pan X., Haydon R.C., Deng Z.L., He T.C. (2010) TGFbeta/BMP type I receptors ALK1 and ALK2 are essential for BMP9-induced osteogenic signaling in mesenchymal stem cells. *J Biol Chem.* 285, 29588-29598.
208. Rodriguez-Barbero, A., Obreo J., Eleno N., Rodriguez-Pena A., Duwel A., Jerkic M., Sanchez-Rodriguez A., Bernabeu C., Lopez-Novoa J.M. (2001) Endoglin expression in human and rat mesangial cells and its upregulation by TGF-beta1. *Biochem Biophys Res Commun.* 282, 142-147.
209. Blaney Davidson, E.N., Remst D.F., Vitters E.L., van Beuningen H.M., Blom A.B., Goumans M.J., van den Berg W.B., van der Kraan P.M. (2009) Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice. *J Immunol.* 182, 7937-7945.
210. Weng, H.L., Ciucan L., Liu Y., Hamzavi J., Godoy P., Gaitantzi H., Kanzler S., Heuchel R., Ueberham U., Gebhardt R., Breitkopf K., Dooley S. (2007) Profibrogenic transforming growth factor-beta/activin receptor-like kinase 5 signaling via connective tissue growth factor expression in hepatocytes. *Hepatology.* 46, 1257-1270.
211. Obreo, J., Diez-Marques L., Lamas S., Duwell A., Eleno N., Bernabeu C., Pandiella A., Lopez-Novoa J.M., Rodriguez-Barbero A. (2004) Endoglin expression regulates basal and TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblasts. *Cell Physiol Biochem.* 14, 301-310.
212. Meurer, S.K., Alsamman M., Sahin H., Wasmuth H.E., Kisseleva T., Brenner D.A., Trautwein C., Weiskirchen R., Scholten D. (2013) Overexpression of endoglin modulates TGF-beta1-signalling pathways in a novel immortalized mouse hepatic stellate cell line. *PLoS One.* 8, e56116.
213. Docherty, N.G., Lopez-Novoa J.M., Arevalo M., Duwel A., Rodriguez-Pena A., Perez-Barriocanal F., Bernabeu C., Eleno N. (2006) Endoglin regulates renal ischaemia-reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant.* 21, 2106-2119.

214. Rossi, E., Sanz-Rodriguez F., Eleno N., Duwell A., Blanco F.J., Langa C., Botella L.M., Cabanas C., Lopez-Novoa J.M., Bernabeu C. (2013) Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood*. 121, 403-415.
215. Scharpfenecker, M., Flook B., Russell N.S., Coppes R.P., Stewart F.A. (2013) Endoglin haploinsufficiency attenuates radiation-induced deterioration of kidney function in mice. *Radiother Oncol*. 108, 464-468.
216. Goumans, M.J., Lebrin F., Valdimarsdottir G. (2003) Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- β receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med*. 13, 301-307.
217. Goumans, M.J., Valdimarsdottir G., Itoh S., Lebrin F., Larsson J., Mummery C., Karlsson S., ten Dijke P. (2003) Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGF β /ALK5 signaling. *Mol Cell*. 12, 817-828.
218. Matsubara, T., Abe H., Arai H., Nagai K., Mima A., Kanamori H., Sumi E., Takahashi T., Matsuura M., Iehara N., Fukatsu A., Kita T., Doi T. (2006) Expression of Smad1 is directly associated with mesangial matrix expansion in rat diabetic nephropathy. *Lab Invest*. 86, 357-368.
219. Abe, H., Matsubara T., Arai H., Doi T. (2011) Role of Smad1 in diabetic nephropathy: Molecular mechanisms and implications as a diagnostic marker. *Histol Histopathol*. 26, 531-541.
220. Bi, J., Ge S. (2014) Potential roles of BMP9 in liver fibrosis. *Int J Mol Sci*. 15, 20656-20667.
221. Park, S.O., Lee Y.J., Seki T., Hong K.H., Fliess N., Jiang Z., Park A., Wu X., Kaartinen V., Roman B.L., Oh S.P. (2008) ALK5- and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Blood*. 111, 633-642.

LISTADO DE ABREVIATURAS

ALK1	Activin receptor-like kinase 1
ALK3	Activin receptor-like kinase 3
ALK5	Activin receptor-like kinase 5
ALK6	Activin receptor-like kinase 6
BAEC	Células endoteliales de aorta bovina
BMP7	Proteína morfogenética ósea 7
BMP9	Proteína morfogenética ósea 9
BMP10	Proteína morfogenética ósea 10
BRE	Elemento de respuesta a BMP (<i>BMP response element</i>)
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
ERC	Enfermedad renal crónica
FSP-1	Proteína específica de fibroblastos-1
GDF	Factor de crecimiento y diferenciación
HHT	Telangiectasia hemorrágica hereditaria
HIF	Factor inducible de hipoxia
HMVEC	Células endoteliales microvasculares humanas
HPAEC	Células endoteliales de aorta pulmonar humana
HUVEC	Células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano,
IL-6	Interleuquina 6
KO	<i>Knock out</i>
MEC	Matriz extracelular
MEFs	Fibroblastos embrionarios de ratón
MMPs	Metaloproteasas de matriz
OOU	Obstrucción ureteral unilateral
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
RMR	Reducción de masa renal
TEM	Transición epitelio-mesénquima
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TIMPs	Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas
T β RI	Receptor tipo I de TGF- β
T β RII	Receptor tipo II de TGF- β
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

WT	Wild type (<i>Fenotipo silvestre</i>)
ZO-1	Zónula ocludente -1 (<i>zónula ocludens-1</i>)
α -SMA	Alfa actina de músculo liso vascular

SUMMARY

INTRODUCTION

Tubulo-interstitial fibrosis is one of the main features of chronic kidney disease. It is characterized by myofibroblast activation and excessive buildup of extracellular matrix (ECM) proteins, leading to organ failure. Several cytokines are necessary to induce the fibrotic processes.

Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) is a cytokine with a pivotal role in kidney fibrosis since induces an increase in ECM synthesis and promotes other mechanisms such as epithelial to mesenchymal transition, tubular cell apoptosis, regulation of inflammatory cell infiltration, etc. On the other hand, bone morphogenetic proteins (BMP) –members of the TGF- β superfamily that play important roles in development and differentiation-have been identified as antifibrotic cytokines, especially BMP7.

TGF- β 1 exerts its functions by binding type II receptors that activates type I receptors. Two different type I receptors for TGF- β 1 have been described: ALK1 and ALK5. In endothelial cells –where TGF- β 1 signaling pathways have been further studied-, TGF- β 1 signals through Smad2 and Smad3 proteins by activating ALK5, whereas TGF- β 1 signals through Smad1, Smad5 and Smad8 by activating ALK1, only in the presence of ALK5. Endoglin is a co-receptor that favors signaling through Smad1/5/8 pathway and promotes endothelial cell proliferation and migration. Mutations in the gene that encodes endoglin cause Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT) type 1. Higher levels of endoglin have been observed in patients with kidney fibrosis and also in several experimental models of tubule-interstitial fibrosis or glomerulosclerosis. Moreover, endoglin regulates negatively ECM protein synthesis in several cell types *in vitro*.

Bone morphogenetic proteins 9 and 10 (BMP9 and BMP10) were identified as potent ligands for ALK1 receptors in endothelial cells. BMP9 is synthesized in liver tissue and has important roles in angiogenesis, lymphatic vessels maturation, osteogenesis and glucose homeostasis, but its role in fibrosis is unknown.

Thus, the aim of our study has been to elucidate the possible role of ALK1 and endoglin receptors in kidney fibrosis.

MATERIALS AND METHODS

We have performed unilateral ureteral obstruction (UUO) –an experimental model of tubulointerstitial fibrosis- in ALK1 heterozygous mice and their respective controls. On the

other hand, we have performed UUO in mice that overexpress human L-endoglin (*L-ENG*⁺) and their respective controls (WT).

To assess the role of ALK1 in ECM synthesis, proliferation and migration, we obtained and immortalized mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from ALK1 heterozygous embryos and WT controls. On the other hand, we have stimulated MEFs with BMP9 –natural ligand for ALK1- to evaluate the possible effects of this protein in ECM protein synthesis.

In order to elucidate the possible mechanisms by which ALK1 or endoglin regulates fibrosis we have used different in vitro strategies such as siRNA, overexpression of ALK receptors and chemical inhibition with SB431542 –ALK5 inhibitor-, SIS3 –Smad3 inhibitor- and U0126 –Erk1/2 inhibitor-.

Protein expression has been evaluated by Western blot, immunocytochemistry and immunohistochemistry. mRNA expression has been quantified by qPCR. Cell proliferation has been assessed by the MTT assay. Cell migration has been evaluated by wound healing assays in cell monolayers.

RESULTS

1. *ALK1 heterozygosity is associated with a higher renal fibrosis after UUO.*

We demonstrated that obstructed (O) kidneys from ALK1^{+/-} mice developed more kidney fibrosis after UUO than O kidneys from ALK1^{+/+} mice, evaluated by Masson's trichrome and Sirius red staining, and also by the protein expression of collagen I and fibronectin (Figure 1). The abundance of myofibroblasts, measured by the expression of myofibroblasts markers *α-smooth muscle actin* (*α-SMA*) and S100A4, was similar in O kidneys from both ALK1^{+/+} and ALK1^{+/-} mice –see article 1-.

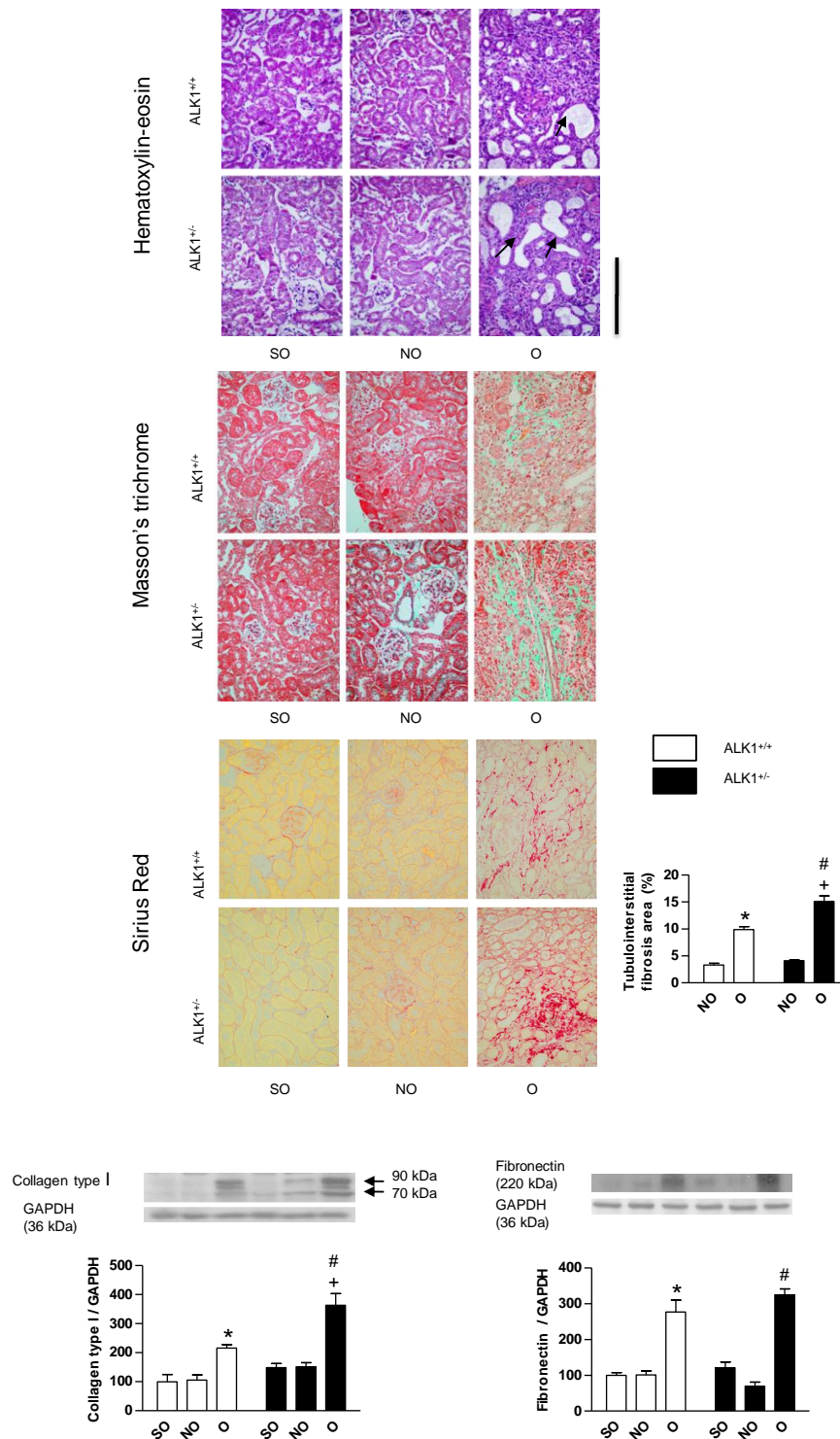


Figure 1: Effects of activin receptor–like kinase 1 (ALK1) haploinsufficiency in interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction. Hematoxylin–eosin staining in sham-operated (SO), nonobstructed (NO) and obstructed (O) kidneys in ALK1^{+/+} and ALK1^{+/-} mice. Arrows mark tubular dilatation, tubular atrophy and hypercellularity –main features of obstructive nephropathy–. Masson’s trichrome staining in SO, NO, and O kidneys from ALK1^{+/+} and ALK1^{+/-} mice. Sirius red–stained area in SO, NO, and O kidneys from ALK1^{+/+} and ALK1^{+/-} mice and quantification by Image-Pro

Plus in NO (n=6 different areas evaluated) and O kidneys (n=6) from ALK1^{+/+} and ALK1^{+/-} mice. Western blot analysis of collagen type I and fibronectin protein expression from SO (n=5), NO (n=5), and O kidneys (n=5) from ALK1^{+/+} and ALK1^{+/-} mice. Data represent the average ± s.e.m. of the optical density. *P<0.01 vs. SO kidneys from ALK1^{+/+} mice. #P<0.01 vs. SO kidneys from ALK1^{+/-} mice. +P<0.05 vs. O kidneys from ALK1^{+/+} mice. Original magnification: 400X. Bar= 100 µm.

Phospho-Smad2/3 and phospho-Smad1/5/8 expression increased after UUO in ALK1^{+/+} mice. However in O kidneys from ALK1^{+/-} mice phospho-smad3 expression was higher whereas phospho-Smad1/5/8 was lower than in control mice, indicating that this unbalance may enhance kidney fibrosis after UUO.

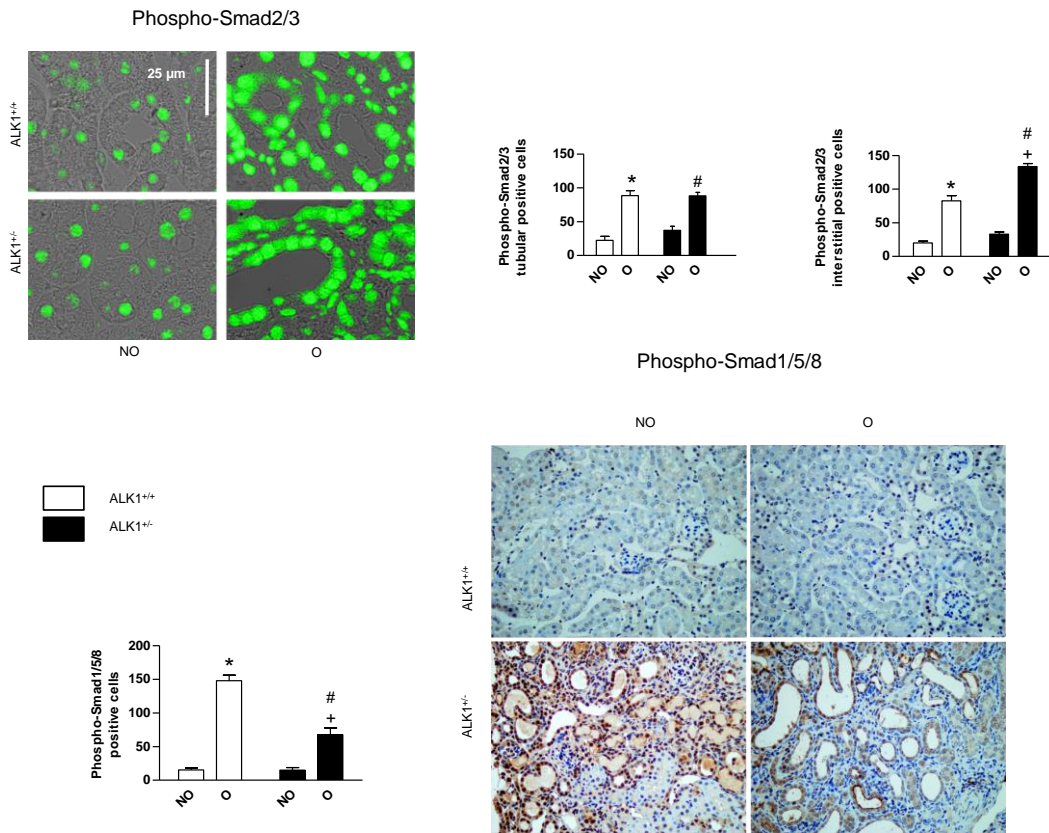


Figure 2: Effect of activin receptor–like kinase 1 (ALK1) haploinsufficiency in Smad signaling following ureteral obstruction. Immunofluorescence staining of phospho-Smad2/3 and bright-field, original magnification 1000X, and phospho-Smad1/5/8 immunostaining –original magnification 400X- in NO and O kidneys from ALK1^{+/+} and ALK1^{+/-} mice. Quantification (average ± s.e.m.) of tubular, interstitial or total positive-stained cells was carried out in 6 different areas in sham kidneys, 6 areas in NO kidneys, and in 12 areas in O kidneys. *P<0.05 vs. SO kidneys from ALK1^{+/+} mice. #P<0.01 vs. SO kidneys from ALK1^{+/-} mice. +P<0.05 vs. O kidneys from ALK1^{+/+} mice.

2. *ALK1 heterozygous MEFs show higher ECM protein synthesis, proliferation and migration*

ALK1 receptor –considered by many authors as an endothelial-specific receptor- is also expressed in MEFs. ALK1 heterozygous MEFs express more collagen I, fibronectin and connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) than control MEFs. On the other hand, ALK1 heterozygous MEFs proliferate more and migrate faster than ALK1^{+/+} MEFs (Figure 3). This phenotype observed in ALK1^{+/-} MEFs is due to an impairment of Smads signaling, being Smad1 phosphorylation lower and Smad2/3 phosphorylation higher in ALK1^{+/-} MEFs in basal conditions. ALK5 inhibition with SB431542 and Smad3 inhibition with SIS3 in ALK1^{+/-} MEFs reverted the higher ECM protein synthesis, proliferation and migration observed in these cells – see article 2-.

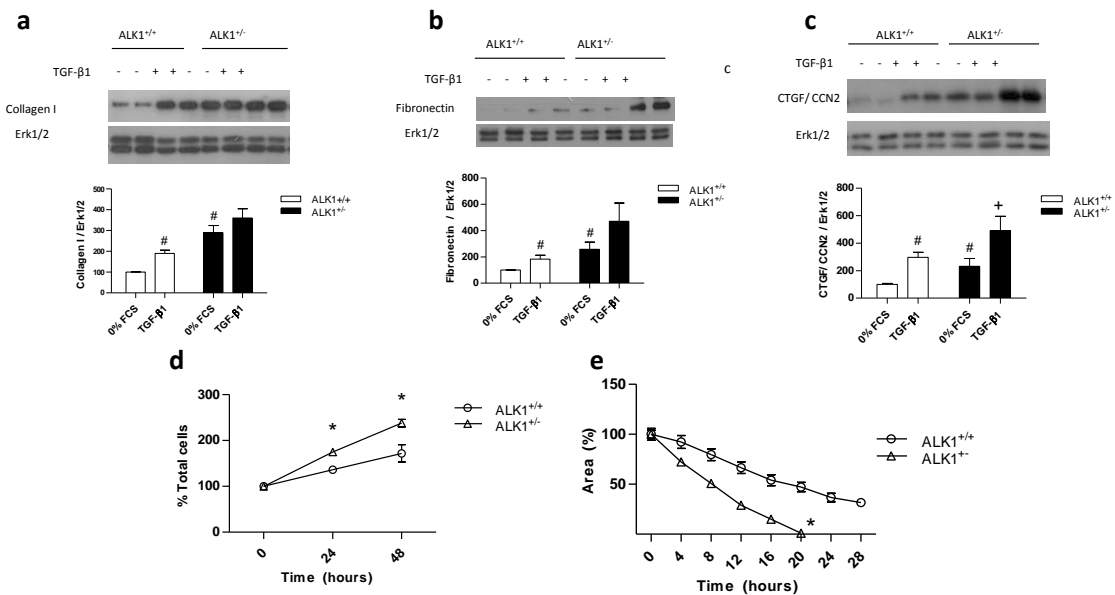


Figure 3: Effects of ALK1 heterozygosity in ECM protein synthesis, proliferation and migration. Expression of collagen I(a), fibronectin(b) and CTGF/CCN2 (c) in basal conditions and after treatment with 1ng/ml TGF-β1 (24 h) in ALK1^{+/+} and ALK1^{+/-} MEFs. Histograms represent the mean ± s.e.m of the optical density of the bands of 15 experiments expressed as percentage over basal values. (d) Fibroblasts proliferation measured at 0, 24 and 48 h by the MTT assay in ALK1^{+/+} and ALK1^{+/-} MEFs. (e) Analysis of wound closure area in ALK1^{+/+} and ALK1^{+/-} fibroblasts in basal conditions. #P<0.01 vs. ALK1^{+/+} MEFs in basal conditions. +P<0.01 vs. ALK1^{+/-} MEFs in basal conditions. *P<0.001 vs. ALK1^{+/+} MEFs in basal conditions.

3. *Overexpression of L-Endoglin leads to a higher renal fibrosis after UUO.*

We generated a transgenic mouse overexpressing L-Endoglin (*L-ENG*⁺) in order to evaluate the possible role of the L-Endoglin isoform in the development of kidney fibrosis after UUO. O kidneys from *L-ENG*⁺ mice developed more kidney fibrosis after UUO than O kidneys from WT,

evaluated by Masson's trichrome, Sirius red staining and also by the protein expression of collagen I and fibronectin (Figure 4). The abundance of myofibroblasts, measured by the expression of the myofibroblasts marker α -smooth muscle actin (α -SMA) was similar in O kidneys from L-ENG⁺ and WT mice –see article 3-.

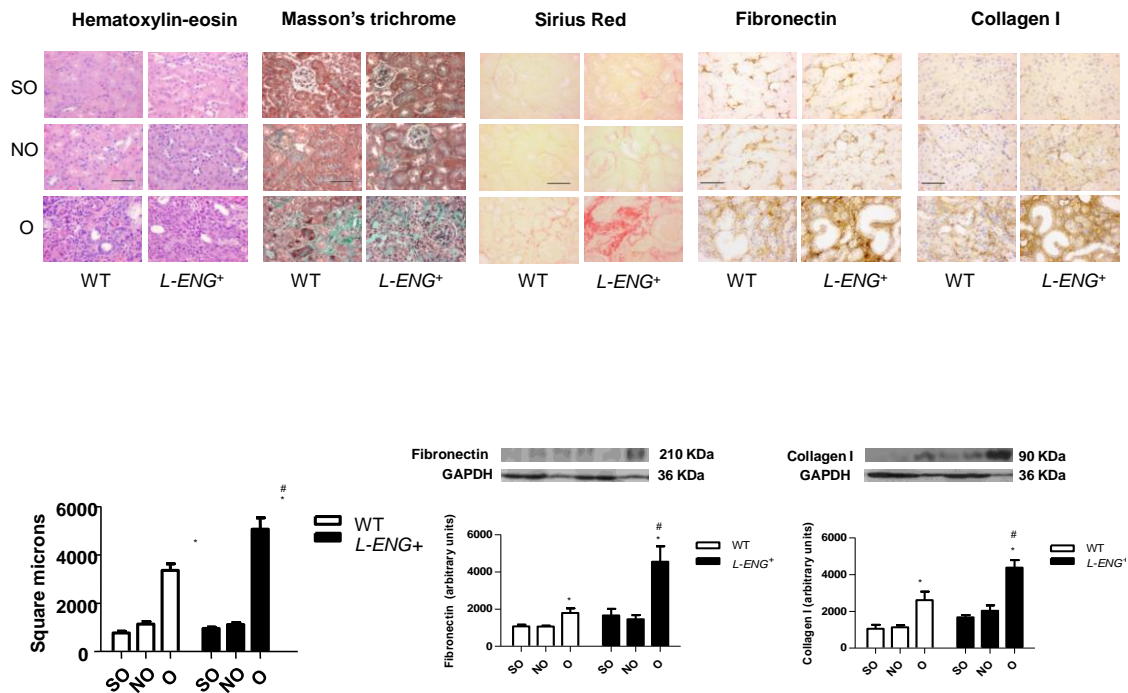


Figure 4: Effects of L-Endoglin overexpression in interstitial fibrosis after UUU. Hematoxylin-eosin, Masson's trichrome and Sirius red stainings, and immunohistochemistry for collagen I and fibronectin in SO, NO and O kidneys from WT and L-ENG⁺. Morphometric quantification (average \pm s.e.m) of stained area by Sirius Red; SO (n = 3), NO (n = 4), O (n = 4). *P<0.05 vs. their respective SO kidneys. #P<0.05 vs. O kidneys from WT mice. Representative western blots (among 5–7 performed in each group) of collagen I and fibronectin proteins are shown on top. Densitometry analysis is represented as the average \pm of all western blots performed per group. *P<0.01 vs. SO kidneys. #P<0.05 vs. O kidneys from WT mice.

Phospho-Smad2/3 and phospho-Smad1 expressions were higher in O kidneys from L-ENG⁺ than in O kidneys from WT, suggesting that the higher activation of both pathways after UUU in L-ENG⁺ could be responsible for the higher kidney fibrosis observed in mice that overexpress L-Endoglin (Figure 5).

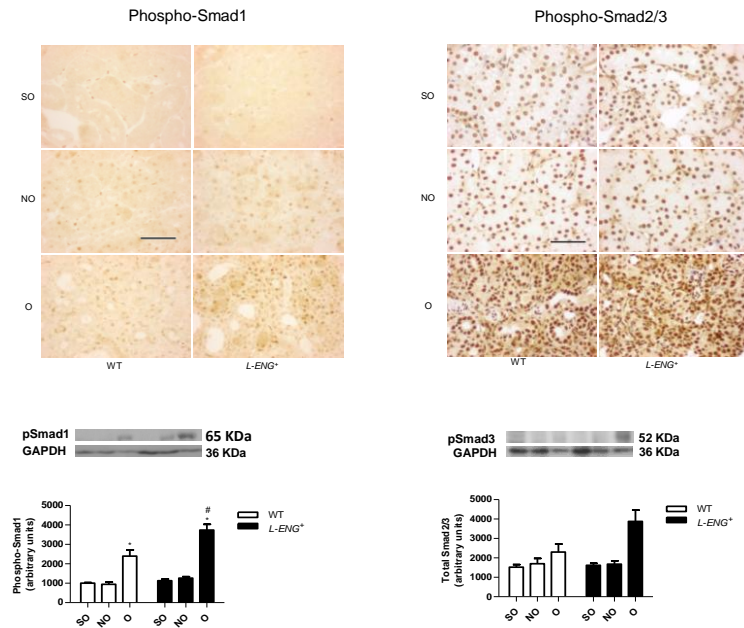


Figure 5: Effects of L-Endoglin overexpression on phospho-Smad1 and phospho-Smad2/3 expression following UUU. Representative immunohistochemistry images for phospho-Smad1 and phospho-Smad2/3 in SO, NO and O kidneys from WT and *L-ENG*⁺ mice. Bar = 100 μ m. Western blot analysis of phospho-Smad1 and phospho-Smad2/3 protein expression in SO, NO and O kidneys from WT and *L-ENG*⁺ mice. A representative western blot among 5–7 performed in each group is shown on top. Densitometry analysis is represented as the mean of 5–7 western performed per group. * P <0.01 vs. SO kidneys. # P <0.05 vs. O kidneys from WT mice.

4. BMP9 stimulation increases ECM protein synthesis through ALK1 and ALK5 receptors.

We stimulated cultured MEFs with BMP9 at different concentrations (1, 10 and 20 ng/ml). We observed that BMP9 (20 ng/ml) induced the phosphorylation of Smad1/5/8, Smad2/3 and Erk1/2. At this concentration, BMP9 promoted an increase in ECM proteins collagen I, fibronectin and CTGF/CCN2. Inhibition of ALK5 receptor with SB541542, Smad3 with SIS3, Erk1/2 with U0126 and ALK1,2,3,6 with dorsomorphin-1 reduced BMP9-induced ECM protein synthesis, suggesting that Smad1/5/8, Smad2/3 and Erk1/2 pathways were involved in this mechanism (Figure 6). BMP9 induced a lower phosphorylation of Smad1/5/8, Smad2/3 and Erk1/2 in MEFs after the inhibition of ALK1 with dorsomorphin-1, ALK1 knockdown with siRNA or in ALK1 heterozygous MEFs. However, the inhibition of ALK5 with SB431542 only reduced BMP9-induced Smad2/3 phosphorylation. Endoglin overexpression increased BMP9 activation of Smad1/5/8 and Smad2/3 pathways and its profibrotic response (*see article 4*).

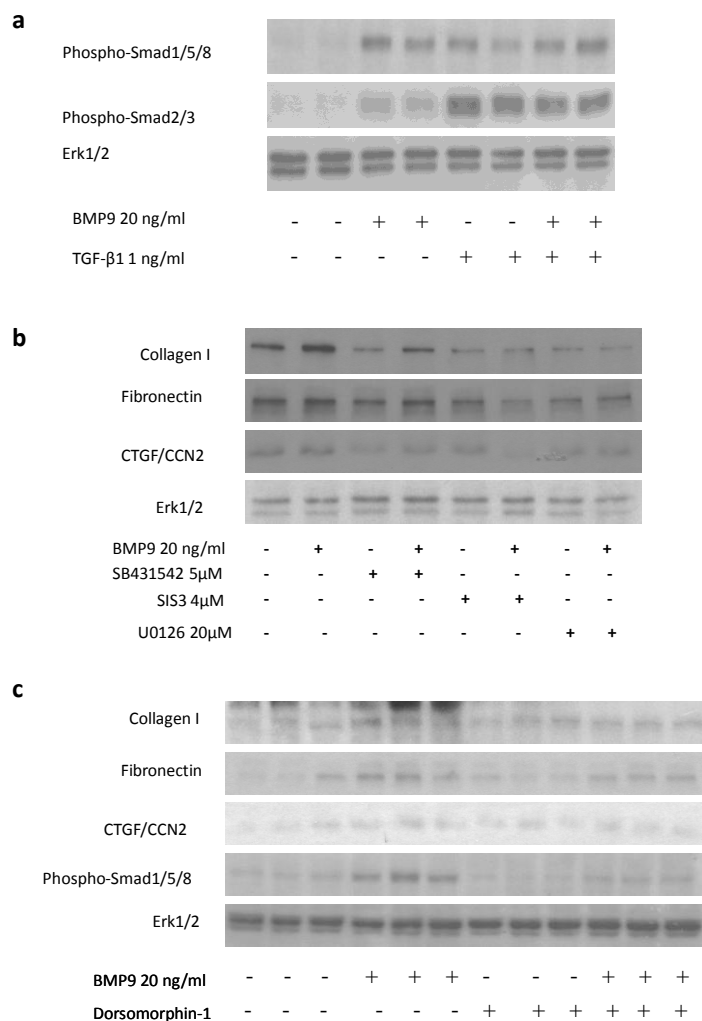


Figure 5: Effects of BMP9 stimulation on Smad pathways activation and ECM protein synthesis in MEFs. Effect of BMP9 stimulation on phospho-Smad1/5/8 and phospho-Smad2/3 expression in MEFs. TGF-β1 stimulation was used as positive control (a). Effect of BMP9 stimulation on collagen I, fibronectin and CTGF/CCN2 synthesis in MEFs and effect of ALK5 inhibition with SB431542, Smad3 inhibition with SIS3, MEK-Erk1/2 inhibition with U0126 in BMP9-induced ECM synthesis (b). Effect of ALK1, ALK2, ALK3 and ALK6 inhibition with dorsomorphin-1 in BMP9-induced ECM protein synthesis (c)

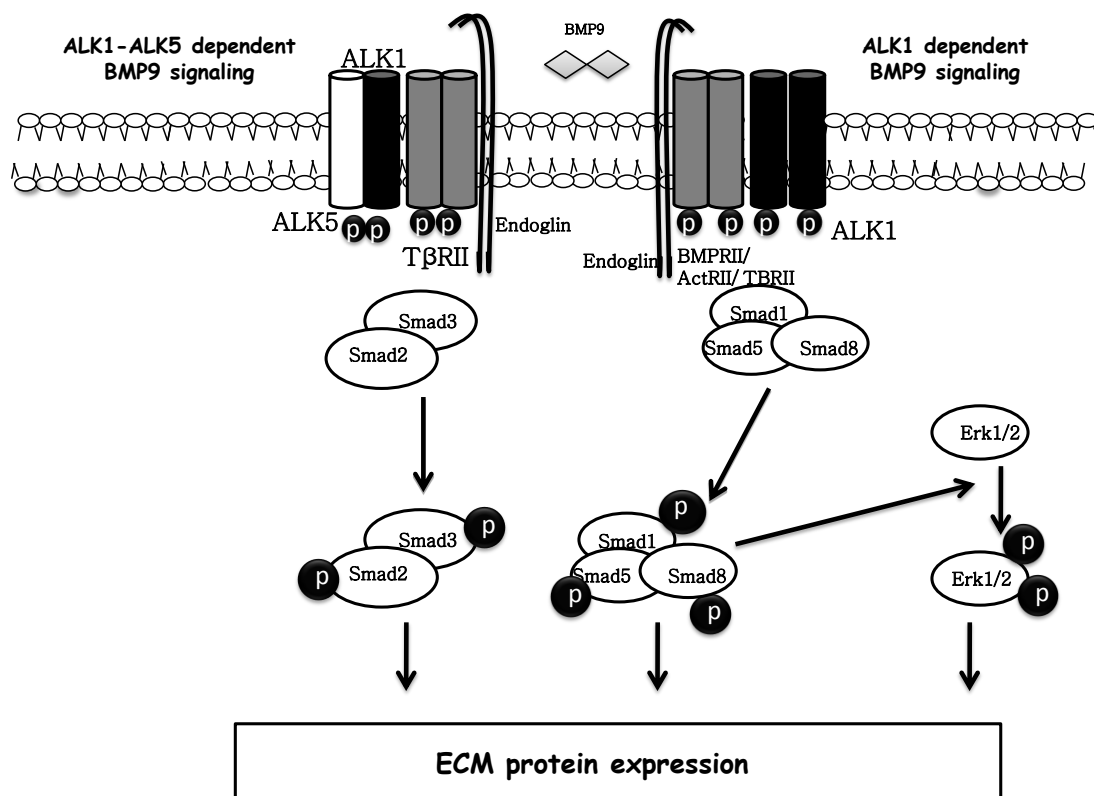
DISCUSSION

We have studied the role of ALK1 and endoglin in kidney fibrosis development. The study of these receptors has been linked to endothelial physiology, as mutations in the genes that encode endoglin or ALK1 lead to hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) types 1 and 2 respectively. However, the study of other receptors and their downstream pathways has been further addressed. It is well known the role of TGF-β1 type I receptor ALK5 and Smad2, Smad3, Smad4 and Smad7 proteins in kidney fibrosis. In addition the role of BMP7 and their receptor ALK3 has been well studied.

We have demonstrated that ALK1 and endoglin have an important role in regulating kidney fibrosis. In fact, the role of these receptors in fibrosis has been studied in other organs such as liver or skin. The initial hypothesis which held that ALK1 or endoglin are endothelial-specific receptors is wrong. Moreover, ALK1 and endoglin expressions are increased during renal fibrosis and play an important role in regulating ECM protein synthesis by myofibroblasts.

We have demonstrated that not only the Smad2/3 pathway regulates kidney fibrosis, since the Smad1/5/8 pathway also favours kidney fibrosis. In mice overexpressing L-Endoglin the higher activation of both pathways leads to a higher kidney fibrosis after UUO. However, in ALK1 heterozygosity we have observed that a lower Smad1/5/8 phosphorylation leads to a higher renal fibrosis. In this case, we suggest that this lower Smad1/5/8 phosphorylation after UUO may enhance Smad2/3 phosphorylation –the potential profibrotic pathway- due to the lateral antagonism between both pathways, thus increasing the fibrotic response after UUO.

BMP9, a potent ligand that binds to ALK1 in endothelial cells and promotes a strong phosphorylation of Smad1/5/8 proteins, also activates this pathway in fibroblasts and promotes ECM synthesis. However, BMP9 not only activates Smad1/5/8 in fibroblasts through ALK1. We demonstrated that BMP9 also activates the Smad2/3 pathway through ALK5 in presence of ALK1.





While the role of endoglin in kidney fibrosis is clearly profibrotic, we suggest a dual fibrotic/antifibrotic role for ALK1. While ALK1 heterozygosity is associated to a higher kidney fibrosis after UUO, ALK1 is necessary for BMP9 to induce ECM protein synthesis in fibroblasts. The fibrotic/antifibrotic behavior of ALK1 depends on the presence or absence of ligands such as BMP9 and the presence or absence of other ALK receptors which may be present in the different tissues or involved in pathological conditions.