

Gaceta Médica de México

Volumen
Volume **139**

Número
Number **2**

Marzo-Abril
March-April **2003**

Artículo:

Receptores y funciones del TGF-beta,
una citocina crucial en la cicatrización

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Academia Nacional de Medicina de México, A.C.

**Otras secciones de
este sitio:**

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Edigraphic.com

I. El papel fisiopatológico del TGF- β en las nefropatías de diversas etiologías: los inhibidores del TGF- β como agentes terapéuticos potenciales

M. Magdalena Vilchis-Landeros,* Patricia Juárez,* Fernando López-Casillas*

Recepción versión modificada 30 de abril de 2002; aceptación 23 de octubre de 2002

Introducción

Una de las complicaciones más frecuentes y generalmente fatal de la diabetes mellitus es la insuficiencia renal. Éste es un grave problema de salud en México, pues no sólo su incidencia va en aumento,¹ sino que la población mexicana parece ser particularmente susceptible a ella. Garza y colaboradores han encontrado que en los pacientes diabéticos tipo II (no dependientes de insulina) de origen mexicano, el deterioro de la función renal es más acelerado que en grupos de diferente origen étnico.² En la década pasada el entendimiento de la fisiopatología de la nefropatía, de etiología diabética en particular y de otras etiologías en general, ha revelado que uno de los principales mediadores del daño renal es una poderosa citocina llamada Transforming Growth Factor tipo beta (TGF- β).^{3,4} De ahí que, en principio, un tratamiento racional de las nefropatías debería basarse en inhibidores del TGF- β , los cuales, necesariamente, resultarán del conocimiento derivado de los mecanismos de señalamiento del TGF- β . Este campo de estudio ha tenido un desarrollo espectacular en los últimos años con el consecuente desarrollo de nuevos conceptos y la identificación de moléculas transductoras de sus señales, las cuales podrían ser blancos para una intervención terapéutica anti-TGF- β . En esta parte del simposio discutiremos conceptos básicos de la biología del TGF- β , sus mecanismos fisiopatológicos, y los agentes neutralizadores del TGF- β más promisorios para una eventual terapia en humanos.

Importancia funcional y procesamiento del TGF- β

El TGF- β es el miembro prototípico y mejor estudiado de una familia de factores de crecimiento celular, ubicuos, multifuncionales y esenciales para la sobrevivencia, que tienen un papel importante en el desarrollo embrionario, la proliferación celular, la inflamación, la reparación de tejidos y la respuesta inmune.^{5,6}

El TGF- β inhibe la división en muchos tipos celulares, incluyendo células de origen epitelial, endotelial y hematopoyético. El TGF- β actúa en el ciclo celular deteniendo a las células al final de la fase G1. Este efecto lo logra mediante la represión de c-myc, factor transcripcional mitogénico, así como con la inducción de inhibidores de las cdks (cyclin dependent kinases), cinasas que junto con las ciclinas son el motor del ciclo celular. El hecho de que ciertas deficiencias en la vía del TGF- β contribuyan al desarrollo de tumores malignos, le da el rango de supresor de tumores.⁷

El TGF- β también regula la respuesta inmune.⁸ El TGF- β suprime la proliferación y diferenciación de células B y T *in vitro*, antagonizando los efectos de citocinas que participan en inflamación como son IL-1 β , TNF- α o IFN- γ , y suprimiendo la expresión de receptores para IL-1 β e IL-2. En macrófagos, la producción de superóxido y óxido nítrico es bloqueada por TGF- β . Además, el TGF- β inhibe la adhesión de neutrófilos a células endoteliales, por lo tanto limita el reclutamiento de células inflamatorias en la lesión. La importancia de estas acciones fue descubierta al bloquear la expresión del gen para TGF- β 1 en el ratón. Alrededor de

*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Fernando López-Casillas, Apartado Postal 70-246, 04510 México D.F., Tel.: (55) 5622 5625, correo electrónico: fcasilla@ifisiol.unam.mx

50% de los animales carentes de TGF- β 1 mueren intrauterinamente, posiblemente por defectos letales del desarrollo embrionario. El 50% que sobrevive hasta el nacimiento desarrolla una respuesta inflamatoria excesiva que les ocasiona la muerte entre la tercera y cuarta semana de edad, lo cual confirma el papel central del TGF- β 1 en la modulación de la respuesta inflamatoria.⁹⁻¹⁰

Por otro lado, estudios con ratones transgénicos *knockout* para otras isoformas del TGF- β confirmaron la relevancia de las mismas en la regulación del desarrollo embrionario. Los ratones carentes del gen de TGF- β 2 mueren en el útero debido a múltiples defectos en el desarrollo cardiaco, pulmonar, craneofacial, de la columna vertebral, de las extremidades, de los ojos, del oído interno y del aparato urogenital.¹¹ Los ratones *knockout* del TGF- β 3 tienen paladar hendido y defectos del desarrollo embrionario pulmonar, que son incompatibles con la vida.¹² Es notable que la carencia de cualquiera de las tres isoformas del TGF- β sea letal, lo cual demuestra que a pesar de su estrecha similitud estructural, funcional y de vía de señalización, cada isoforma tiene funciones específicas, no redundantes.

El TGF- β controla la producción de los componentes de la matriz extracelular, la remodela, y altera la adhesión celular y, en consecuencia la interacción entre las células.⁵ Este factor incrementa la síntesis y depósito de componentes extracelulares tales como fibronectina, proteoglicanos y algunas formas de colágeno. Además, la síntesis de inhibidores de enzimas de degradación tales como el inhibidor del activador del plasminógeno y el inhibidor tisular de metaloproteasas se incrementa, mientras que la expresión de proteasas tales como la colagenasa y el activador del plasminógeno se disminuye por acción del TGF- β . Este aumento en la síntesis de inhibidores y disminución en la síntesis de proteasas conduce a la acumulación neta de proteínas de matriz, la cual es indispensable para el proceso de reparación tisular. La liberación plaquetaria de TGF- β en el sitio de una herida inicia una cascada de eventos que incluyen reclutamiento de células, formación de nuevos vasos sanguíneos y síntesis de matriz para dar soporte a la herida.⁶ El TGF- β también es un factor quimiotáctico y activador de macrófagos y fibroblastos. Estas actividades son benéficas y de duración limitada dentro del contexto de la reparación de heridas. Sin embargo, en algunas ocasiones existe un incremento incontrolado en la producción y/o activación del TGF- β , lo que lleva a la producción excesiva de tejido conectivo. Este fenómeno, que ha sido llamado "el lado oscuro del TGF- β " se presenta en una variedad de enfermedades como cirrosis hepática, fibrosis pulmonar idiopática, escleroderma, glomerulonefritis, ciertas formas de artritis reumatoide, esquistosomiasis y vitreoretinopatía proliferativa. Estas enfermedades se caracterizan por inflamación crónica y

acumulación patológica de matriz, que algunas veces está acompañada por cicatrización.^{13,14}

Todas las isoformas del TGF- β son sintetizadas como precursores diméricos y secretados al medio extracelular como formas inactivas, los pro-TGF- β . A partir de estos precursores se originan las formas maduras, activas del factor que también son diméricas.^{15,16} El precursor del TGF- β 1 es de 390 aminoácidos y son los 112 residuos localizados en el extremo carboxilo-terminal los que constituyen la forma madura. Los residuos restantes, localizados en la porción amino-terminal, constituyen el llamado *péptido asociado de latencia* o simplemente LAP, por sus siglas en inglés (*latency associated peptide*). Como parte de su proceso de secreción, el pro-TGF- β sufre proteólisis, mediada por endopeptidasas como la furina, la cual rompe el enlace peptídico entre el factor maduro y el LAP. El LAP tiene un papel importante para mediar el plegamiento correcto y la dimerización de las regiones maduras, y es necesario para un procesamiento posttraduccional eficiente. El TGF- β procesado es secretado como un complejo latente formado por la asociación no covalente entre el LAP y la región madura de la molécula. En el complejo latente el TGF- β carece de actividad, presumiblemente porque su asociación con el LAP le impide unirse a su receptor. Este complejo latente puede ser secretado o almacenado en los gránulos plaquetarios que son el reservorio más grande de TGF- β en el organismo. Para que el TGF- β se active es indispensable que se disocie del LAP, este proceso puede lograrse *in vitro* por medios físicos como cambios de temperatura o de pH, lo que indica la naturaleza no covalente de la unión LAP-TGF- β . Sin embargo, *in vivo* el proceso de activación del TGF- β es mucho más complejo y aún no entendido completamente. Un mecanismo propuesto para explicar la activación *in vivo* del TGF- β involucra la acción de la plasmina en colaboración con el receptor de la manosa-6-fosfato y una actividad de transglutaminasa, en un proceso que requiere de varias estirpes celulares. También se ha propuesto que la trombospondina-1 (TSP-1), una glicoproteína de matriz extracelular, participa en la activación *in vivo* del TGF- β .¹⁶ Estudios con animales sugieren que el TGF- β es liberado del complejo LAP-TGF- β por la TSP-1.¹⁷ Se ha sugerido que la TSP-1 se une al complejo LAP-TGF- β cambiándole su conformación y permitiendo que el TGF- β se una con su receptor. Para que esto ocurra es indispensable la unión específica entre TSP-1 y LAP, la cual es mediada por dos péptidos cortos localizados en cada una de estas proteínas, las secuencias KRFK₄₁₅ en la TSP-1 y LSKL₅₇ en la LAP.¹⁸ Cabe resaltar que el péptido KRFK es suficiente para activar al TGF- β , mientras que el péptido LSKL puede bloquear su activación, tanto la mediada por la TSP-1 completa como la inducida por el péptido KRFK. La integrina α v β 6 es otra proteína capaz de activar al TGF- β , gracias a su unión con el LAP, la cual no libera al TGF- β .

del complejo LAP-TGF- β , pero le permite unirse a su receptor.¹⁹

Una vez liberado, el TGF- β tiene una vida media corta, puede unirse a otras proteínas como la α -macroglobulina y la decorina, las cuales inhiben su actividad, o a acarreadores como la albúmina y las IgGs, que no interfieren con su actividad. Los complejos TGF- $\beta 2$ - α -macroglobulina son atrapados y probablemente catabolizados en el hígado. El TGF- β activo puede ser degradado por proteasas y elastasas en el sitio de la inflamación o puede ser excretado en la orina.²⁰ Otras proteínas que unen al TGF- β incluyen al biglicano, al precursor β -amiloide y a la α -fetoproteína, estas uniones podrían alterar la disponibilidad del TGF- β para unirse a su receptor; sin embargo, aún se desconoce su relevancia biológica.

Vía de transducción del TGF- β

La vía de transducción del TGF- β es un tema en auge sobre el cual se han publicado excelentes revisiones recientes,²¹⁻²⁵ por lo cual aquí sólo mencionaremos sus rasgos generales. El TGF- β transmite su señal al interior celular mediante su interacción con los receptores tipo I y II, los cuales son glicoproteínas transmembranales con actividad de cinasas de proteínas. Cuando el TGF- β se une a su receptor, el receptor tipo II fosforila al receptor tipo I. A su vez, el receptor tipo I fosforila a los R-Smads, los únicos sustratos fisiológicos de esta cinasa que se han identificado a la fecha.²³ Los R-Smads forman parte de una novedosa familia de reguladores transcripcionales que controlan la expresión de genes blanco a través de los cuales el TGF- β ejerce múltiples funciones. Las R-Smads fosforiladas se asocian con otro tipo de Smads, las Co-Smads (las cuales no son sustratos de las cinasas de los receptores tipo I), formando complejos que llevan la señal del TGF- β al núcleo celular. Los Smads son un punto importante de autorregulación de la señal del TGF- β . Dicha autorregulación es mediada por variantes de las Smads que carecen de alguno de sus dominios y por ello bloquean la vía del TGF- β . El Smad7, por ejemplo, es inducido por el mismo TGF- β , presumiblemente como una manera de autolimitar sus efectos.^{26,27} No obstante la sencillez de su vía de transducción, la evidencia experimental actual indica que todos los efectos de las 3 isoformas del TGF- β son mediados por esta vía de señalamiento. Para una discusión más amplia de cómo se generan las distintas respuestas celulares del TGF- β se recomienda consultar el artículo III de este Simposio.

Fisiopatología del TGF- β en la nefropatía

Debido a las importantes funciones del TGF- β , no es de extrañar que los trastornos en su regulación o en los

mecanismos de su señalización puedan ocasionar condiciones patológicas.^{7,28} Una de estas condiciones, el *lado oscuro*, deriva directamente de una de las principales funciones del TGF- β , la de regular la producción de las proteínas de la matriz extracelular. Este es un proceso fibrótico que resulta de un exceso del TGF- β y que ocurre en las nefropatías de diversas etiologías.^{3,13} Uno de los modelos mejor estudiados es el de la nefropatía diabética en el cual se observan trastornos estructurales tales como la hipertrofia renal, el aumento del grosor de la membrana basal glomerular, la acumulación de matriz extracelular en el glomérulo, la atrofia tubular y la fibrosis tubulointersticial. Los trastornos funcionales incluyen el aumento en la tasa de filtración glomerular, hipertensión glomerular, proteinuria, hipertensión sistémica y finalmente insuficiencia renal.⁴ Prácticamente en todos los modelos experimentales de enfermedad renal, incluyendo el diabético, se ha encontrado un aumento del TGF- β en la nefrona como común denominador. Entre los estímulos que inician la sobreproducción del TGF- β renal en la diabetes se encuentran la hiperglucemia, la angiotensina II y los llamados AGE (proteínas circulantes o tisulares glicosiladas por mecanismos no enzimáticos).²⁹ Es de destacar que el TGF- β estimula su propia síntesis, estableciendo un círculo vicioso de autoestimulación, que puede mantenerse aun en ausencia del estímulo inicial. Recientemente se han documentado efectos directos del TGF- β como mediador del deterioro funcional del riñón diabético. Lang y colaboradores han encontrado que el TGF- β induce la síntesis de SGK (Serum and Glucocorticoidregulated Kinase), una cinasa de proteínas que activa al transportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{2Cl}^-$, sensible a furosemida y al canal epitelial de sodio.³⁰ Como consecuencia de la activación de estos transportadores se altera el mecanismo de retroalimentación tubuloglomerular hacia una mayor filtración glomerular. Las consecuencias funcionales de esto podrían explicar la hiperfiltración glomerular y la hipertensión sistémica que se observan en la nefropatía diabética.^{4,29}

El hecho de que el daño renal (morfológico, bioquímico y funcional) puede ser prevenido por la administración de anticuerpos neutralizantes del TGF- β es una pieza clave de la evidencia experimental que indica que el TGF- β es el mediador fisiopatológico de la nefropatía diabética.³¹⁻³³ Esto último indica que el TGF- β es causa y no consecuencia de la nefropatía. Finalmente, el hecho de que en los pacientes diabéticos haya un aumento de la producción renal de TGF- β y en sus niveles circulantes, sugiere que los mismos mecanismos fisiopatológicos operan en la enfermedad humana.^{34,35}

Inhibidores del TGF- β

De la discusión anterior se desprende la importancia de la búsqueda de inhibidores para el TGF- β que podrían

servir para detener el desarrollo de estados patológicos asociados con fibrosis mediada por un exceso de TGF- β . Se ha desarrollado un grupo importante de inhibidores que consisten en proteínas capaces de unir al TGF- β e impedir su interacción con los receptores tipo I y II. Algunas de estas proteínas se han obtenido como proteínas recombinantes, lo cual permite producirlas en cantidades suficientes para pruebas *in vivo*. Inhibidores de otro tipo incluyen péptidos que bloquean la activación del TGF- β , ácidos nucleicos antisentido que bloquean su producción, o agentes que impiden alguno de los pasos de su vía de señalamiento intracelular. A continuación discutiremos aquellos que han mostrado actividad neutralizadora del TGF- β en modelos animales.

Una de las primeras proteínas neutralizadoras del TGF- β descritas fue la decorina, un proteoglicano de matriz extracelular rico en leucinas. La administración de decorina recombinante o purificada de tejido bovino, evita la glomeruloesclerosis en un modelo de glomerulonefritis en rata.³⁶ Además, las lesiones causadas por daño glomerular pueden ser disminuidas por terapia génica con un vector de expresión para decorina directamente transfectado en músculo esquelético.³⁷ Recientemente se ha demostrado que la expresión transitoria de decorina en el pulmón de ratones tratados con bleomicina, reduce la respuesta fibrogénica en estos animales, por lo que la decorina podría tener un uso potencial en procesos fibróticos en pulmón.³⁸ Aunque estas evidencias implican que la decorina bloquea la acción del TGF- β , aún existe controversia en cuanto a si este efecto es general. En ciertos sistemas celulares la decorina aumenta la bioactividad del TGF- β , como es el caso de osteoblastos en los que incrementa la unión del TGF- β a sus receptores.³⁹ Una actividad insospechada de la decorina es su capacidad de unirse al receptor del EGF (factor de crecimiento epidérmico) y así desencadenar los efectos mitogénicos propios de este factor.⁴⁰ Estas propiedades de la decorina hacen dudar de su utilidad como un agente anti-TGF- β en humanos.

Otra proteína recombinante capaz de unir y neutralizar al TGF- β es la proteína químérica T β RII-Fc que resulta de fusionar el dominio extracelular del receptor tipo II y el dominio Fc de la inmunoglobulina G. La forma soluble del receptor tipo II, es decir, su ectodominio es capaz de unir al TGF- β pero tiene una afinidad 10 veces menor que el receptor de membrana, probablemente porque el receptor tipo II soluble es una molécula monomérica y el receptor de membrana es un homodímero al igual que el TGF- β .⁴¹ En la quimera T β RII-Fc, gracias a su fusión con la región Fc de las IgGs, el ectodominio del receptor se presenta en forma dimérica, y así incrementa su afinidad por el ligando. El T β RII-Fc recombinante ha sido efectivo para disminuir la fibrogénesis experimental inducida por ligadura del conducto biliar en ratas, un efecto mediado por

TGF- β .⁴² También se ha demostrado que esta molécula químérica es capaz de revertir la respuesta antiprolifativa inducida por TGF- β 1 en células Bnul-7 en cultivo, y de disminuir la producción de fibronectina EIIIA-positiva inducida por TGF- β 1 en cultivos de células renales de ratas normales.⁴³ Empleando un esquema de terapia génica experimental, el cDNA del T β RII-Fc se inyectó en el músculo esquelético de ratas nefríticas. Este tratamiento produce suficiente proteína químérica para suprimir la expresión de proteínas de matriz extracelular como la fibronectina y la colágena I en los riñones de estas ratas.⁴³

Otra proteína recombinante capaz de inhibir los efectos nocivos del exceso de TGF- β *in vivo* es el péptido asociado de latencia (LAP). Böttiger y colaboradores usaron ratones transgénicos que sobreexpresan TGF- β 1 en hígado para demostrar la capacidad anti-TGF- β del LAP- β 1 recombinante. La administración de éste suprimió el efecto antiproliferativo que el TGF- β tiene en hígado cuando estos animales se someten a hepatectomía parcial, el cual es un modelo experimental bien conocido de regeneración hepática.⁴⁴

En varios modelos la fibrosis inducida por TGF- β ha sido bloqueada por la inyección de anticuerpos neutralizantes. La administración de anticuerpos anti-TGF- β al mismo tiempo que la inducción de glomerulonefritis suprime el incremento en la producción de matriz extracelular y atenúa dramáticamente las manifestaciones histológicas de la enfermedad.³¹ En ratones con diabetes inducida por estreptozotocina se observa un incremento en la expresión renal de TGF- β , colágena y fibronectina, también se observa TGF- β en orina e hipertrofia renal; la administración de anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β suprime todos estos efectos.³² Recientemente, se ha demostrado que la administración crónica de anticuerpo monoclonal anti-TGF- β previene la insuficiencia renal y glomeruloesclerosis en ratones db/db que son un modelo genético de diabetes tipo 2. En este caso el anticuerpo disminuyó la concentración de TGF- β 1 en el plasma, evitó el incremento de la concentración de creatinina en el suero y la expansión de matriz mesangial.³³

El uso de péptidos sintéticos para bloquear la actividad del TGF- β puede ser de gran utilidad, pueden prepararse *in vitro*, en grandes cantidades con gran pureza y en principio, tienen una libre distribución sistémica y local. A partir de la secuencia de las isoformas del TGF- β se han desarrollado los péptidos correspondientes a los aminoácidos 41 a 65 del factor maduro. Aunque estos péptidos inhiben la unión de isoformas marcadas de TGF- β a los receptores de células de epitelio pulmonar de visón y bloquean las acciones *in vitro* del TGF- β en estas células no se ha demostrado⁴⁵ su utilidad *in vivo*. En cambio, el péptido LSKL derivado de la secuencia del LAP que bloquea la activación del TGF- β dependiente de trombospondina, se

ha usado en un modelo experimental de nefropatía, y se ha mostrado que es capaz de reducir el daño renal.⁴⁶ Estos hallazgos, junto con el hecho de que este mismo péptido LSKL puede recrear algunos de los aspectos fenotípicos del ratón knockout de TGF- β 1, indican claramente el importante papel que la trombospondina tiene en la activación fisiológica del pro-TGF- β (ver la sección "El procesamiento postraduccional del TGF- β ").

La tecnología de los ácidos nucleicos RNA antisentido se considera una forma efectiva de bloquear o disminuir la cantidad intracelular o la secreción de un producto génico dado. Esto se basa en el hecho de que una secuencia antisentido puede hibridar a un mRNA específico evitando su procesamiento y/o traducción y por lo tanto la expresión de la proteína que codifica. La administración de oligonucleótidos antisentido bloquea la expresión de genes específicos *in vitro* e *in vivo*. Se ha observado que la inhibición de la expresión del gen de TGF- β por oligonucleótidos antisentido suprime el desarrollo de glomerulonefritis experimental.⁴⁷ Además, utilizando esta metodología también se bloquea la expresión del gen para TGF- β en células hepáticas en cultivo. Por otro lado, el tratamiento con oligonucleótidos de TGF- β antisentido disminuyó los niveles de TGF- β 1 y colágena tipo I en ratas con obstrucción uretral unilateral.⁴⁸ Recientemente se ha observado que la terapia con oligonucleótidos de TGF- β 1 antisentido en ratones diabéticos disminuyó la producción de TGF- β 1 y la hipertrofia de células del túbulo proximal inducida por altas concentraciones de glucosa *in vitro*, y previno parcialmente el incremento de peso y la expresión de matriz extracelular.⁵⁰

Otras estrategias para la inhibición terapéutica del TGF- β consisten en administrar inhibidores intracelulares de su vía de señalamiento. Para este propósito se han usado vectores adenovirales que causan la sobreexpresión de Smad7, una proteína Smad inhibitoria (ver la sección "Vía de Transducción del TGF- β "). Estos vectores se han usado con éxito en el tratamiento de la fibrosis pulmonar experimental ocasionada por bleomicina.⁵¹ Además de la relativa promiscuidad de expresión en órganos distintos al blanco terapéutico, otras limitantes para el uso clínico crónico de los vectores adenovirales incluyen su difícil administración sistémica y su falta de expresión sostenida a largo plazo. De ahí que una estrategia altamente promisoria sea desarrollar moléculas pequeñas que inhiban a las cinasas de los receptores del TGF- β . Algunos de estos inhibidores en desarrollo ya han demostrado su tremenda potencia y selectividad en diversos ensayos *in vitro*. Laping y colaboradores han ensayado un inhibidor de la cinasa del receptor tipo I, el compuesto llamado SB431542, tiene una alta especificidad contra esta cinasa al punto de que ha servido para discernir entre los genes sensibles al TGF- β que son activados en forma exclusiva por la vía de las Smads y los que pueden ser activados por

cinasas de la vía de señalización de otros factores de crecimiento celular.⁵² Este tipo de moléculas están siendo desarrolladas con gran ímpetu por las empresas farmacéuticas debido al éxito clínico que han tenido inhibidores de otras cinasas de proteínas. Un caso sobresaliente es el del Gleevec, o compuesto STI-571, un inhibidor específico de la cinasa BCR-ABL. Esta cinasa, que es generada por la fusión fortuita de los genes recombinados en el cromosoma Filadelfia, es la medidora del estímulo mitogénico causante de la leucemia mielogénica crónica. El Gleevec ha resultado de gran efectividad para el tratamiento de este tipo de leucemia.⁵³

El betaglicano soluble, ¿el inhibidor ideal del TGF- β ?

Además de los receptores tipo I y II, existen otros receptores accesorios del TGF- β , el betaglicano y la endoglinina.²¹ El betaglicano se expresa en células mesenquimales, epiteliales, neuronales y otros tipos celulares de tejido fetal y adulto. Sin embargo, no está presente en células como mioblastos, endotelios y células hematopoyéticas que también tienen la capacidad de responder al TGF- β , lo cual sugiere que no participan directamente en la transducción del TGF- β , de ahí su clasificación como accesorio. Un término más apropiado para este tipo de moléculas es el de *co-receptores*, pues se unen TGF- β con alta afinidad regulando el acceso del TGF- β a los receptores I y II y con ello modulan o aun determinan su efecto celular.²¹ De hecho, el betaglicano fue el primer co-receptor cuya actividad se demostró en líneas celulares en cultivo y para el cual se propuso un mecanismo bioquímico específico.^{54,55} El betaglicano, también conocido como el receptor tipo III del TGF- β , es una glicoproteína membranal sintetizada a partir de un precursor de 853 aminoácidos con un gran dominio extracelular, una región transmembranal y una pequeña cola citoplasmática de 43 aminoácidos rica en serinas y treoninas, la cual carece de motivos estructurales que indiquen alguna acción obvia en la vía de señalamiento del TGF- β .⁵⁶ El dominio extracelular contiene sitios potenciales de N-glicosilación y dos residuos serina (Ser⁵³³ y Ser⁵⁴⁴ en el betaglicano de ratón) en donde se unen glicosaminoglicanos (GAG) del tipo de los sulfatos de heparano y condroitina.⁵⁷ Debido a estas cadenas de GAGs, el betaglicano tiene una movilidad electroforética heterogénea en un rango de 280 a 330 kDa. El TGF- β se une en dos dominios separados de la porción extracelular de la proteína medular y para esta unión no requiere GAGs.^{58,59} Es interesante mencionar que las cadenas de heparán sulfato del betaglicano pueden unir al FGF (factor de crecimiento fibroblástico), una propiedad cuya relevancia fisiológica aún se desconoce.⁶⁰

A la fecha las funciones mejor conocidas del betaglicano son las relacionadas con actividad de *co-receptor*,

es decir, con su capacidad de modular la interacción de sus ligandos con los receptores de señalamiento. El caso del betaglicano es particularmente interesante pues no sólo regula al TGF- β , sino también a las activinas y las inhibinas, otros miembros de la *superfamilia* de factores del TGF- β .⁶¹ Una propiedad sorprendente del betaglicano es que puede establecer complejos dependientes de ligando con receptores tipo II del TGF- β y de la activina. Estos complejos regulan la asociación de los receptores II y I en complejos activos de señalamiento y por lo tanto, modulan la actividad biológica de los ligandos. Por ejemplo, el complejo ternario compuesto por betaglicano, receptor II del TGF- β y TGF- β es un intermediario que promueve la formación de un complejo activo de señalamiento compuesto por TGF- β y sus receptores I y II.^{54,59} En cambio, el complejo ternario compuesto por betaglicano, receptor II de activina y la inhibina es un intermediario inactivo que impide la formación del complejo formado por la activina y sus receptores tipo I y II.⁶¹ Aunque existen aún ciertos criterios insatisfechos, este mecanismo es el que mejor explica los efectos antagonicos de las inhibinas sobre los efectos de las activinas⁶² y esto situaría al betaglicano como el receptor funcional de las inhibinas.

Otro aspecto notable del betaglicano es que, debido a la existencia de una forma soluble del receptor, puede ejercer efectos opuestos a los del TGF- β . La forma soluble del betaglicano se encuentra normalmente en suero y matrices extracelulares y se produce a partir del corte proteolítico (*shedding*) aún no bien caracterizado, de la porción extracelular del receptor membranal.^{56,58,63,64} La versión recombinante del betaglicano soluble es inhibitoria del TGF β .^{58,65} Estos hallazgos sugieren que el betaglicano sirve como un interruptor que puede prender o apagar los efectos del TGF- β : la forma membranal los incrementa, mientras que la forma soluble los inhibe.⁶⁶ Por extensión, los mecanismos que puedan regular el *shedding* de betaglicano también podrían regular *in vivo* los efectos del TGF- β , de ahí la importancia de estudiar tales mecanismos (Figura 1).

Considerando que la forma soluble del betaglicano es un antagonista del TGF- β , es válido suponer que una forma recombinante del receptor soluble podría utilizarse como un agente terapéutico para prevenir y/o revertir los daños tisulares derivados del exceso de TGF- β . En vista de esta posibilidad hemos preparado y caracterizado la forma recombinante del betaglicano usando el sistema de expresión del baculovirus en células de insecto. Con este

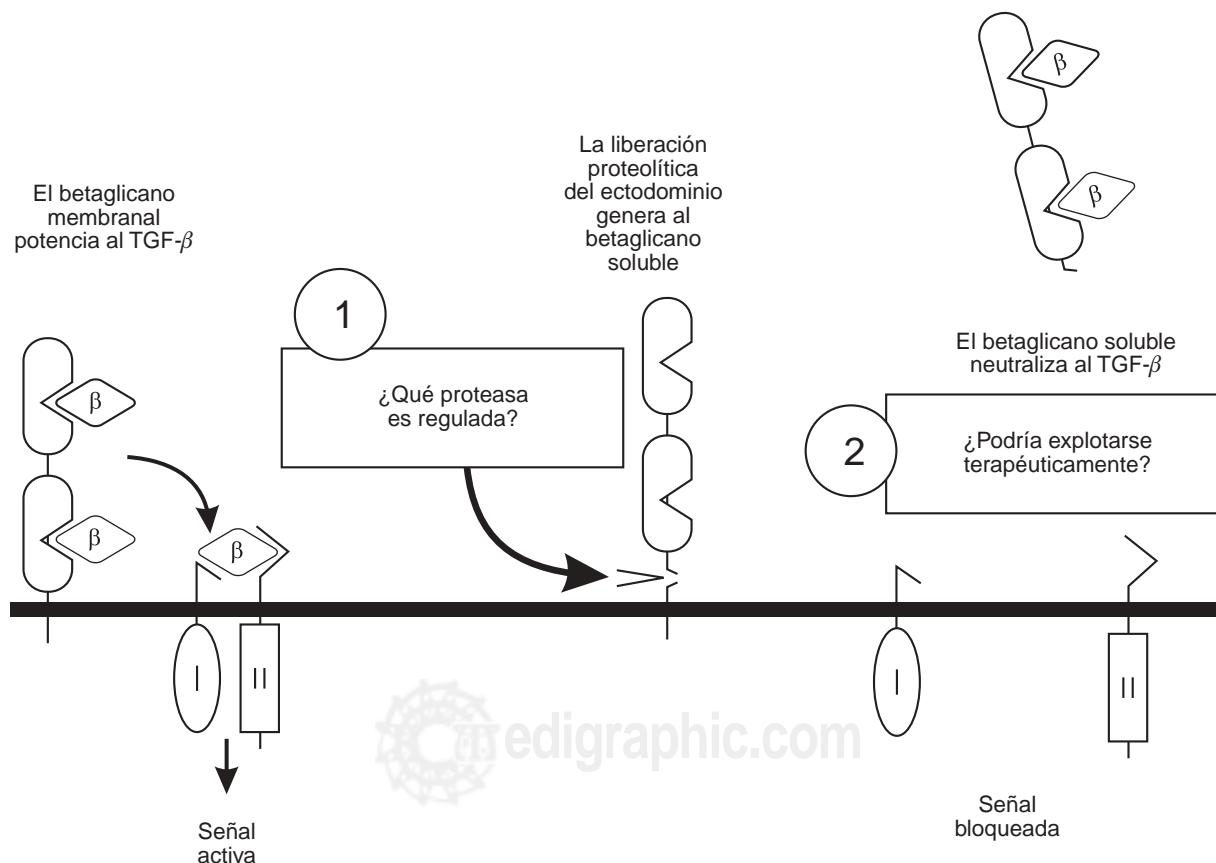


Figura 1. El betaglicano o receptor tipo III del TGF- β , como un regulador bifuncional del TGF- β .

propósito, el cDNA silvestre del betaglicano de rata se modificó para producir una proteína secretaria que contuviese el dominio extracelular de receptor.⁶⁵ El betaglicano soluble recombinante baculoviral (BGSR) se expresa eficientemente en las células de insecto como una glicoproteína homodimérica formada por monómeros de 110 kDa, unidos no covalentemente. A diferencia del betaglicano soluble presente en la naturaleza, el BGSR carece de glicosaminoglicanos y tiene una menor carga de otros oligosacáridos, lo cual podría favorecer su distribución sistémica cuando se administre a animales de experimentación. El BGSR, al igual que el betaglicano soluble natural, tiene una alta afinidad por las 3 isoformas del TGF- β , con rangos constantes de disociación (Kd) que van de 3.5 nM para el TGF- β 1, hasta de aproximadamente 0.5 nM para el TGF- β 2. Esta selectividad relativa de isoforma refleja con precisión las afinidades selectivas mostradas por el receptor silvestre.^{59,63,65} Estas constantes indican también una mayor afinidad del BGSR por el TGF- β , comparada con las de otras proteínas recombinantes que unen e inhiben al TGF- β . Por ejemplo, las Kds del LAP y del receptor tipo II soluble recombinantes por el TGF- β 1 son de 8 nM y 120 nM respectivamente.⁴⁴ Como era de esperarse, la mayor afinidad del BGSR por el TGF- β se traduce en una actividad antagonista al TGF- β mucho más potente en diversos ensayos *in vitro*. Por ejemplo, en el ensayo con un reportero sensible al TGF- β , el llamado p3TP-lux, el BGSR inhibe la inducción de luciferasa en células Mv1Lu, las cuales son altamente sensibles al TGF- β . Esta inhibición depende de la concentración de BGSR añadido y es al menos 10 veces mayor en contra el TGF- β 2 que contra el TGF- β 1. Además, comparada con la potencia que tiene un anticuerpo comercial neutralizador del TGF- β , el BGSR tiene una potencia similar contra el TGF- β 1 y mayor contra el TGF- β 2.⁶⁵

Ensayos preliminares en nuestro laboratorio, han mostrado que el BGSR también bloquea el efecto del TGF- β *in vivo* en un modelo de glomerulonefritis experimental. En este caso se ha observado la disminución de los niveles de los mRNAs y de proteínas de matriz extracelular como colágena y fibronectina en el riñón de ratas con glomerulonefritis inducida por anticuerpos anti-timocito.⁶⁷ Estos datos confirman la actividad *in vivo* del BGSR, lo cual lo coloca como un agente anti-TGF- β muy promisorio, cuya efectividad y potencia podrán ser tan buenos o aun mejores que las de los anticuerpos u otros agentes neutralizadores descritos y usados *in vivo*. Un problema potencial del uso crónico de los anticuerpos anti-TGF- β podría ser la respuesta inmune que se desarrollaría en su contra, la cual podría afectar al paciente y/o la potencia del anticuerpo. En principio, es probable que el BGSR esté exento de estas complicaciones. La existencia de un betaglicano soluble endógeno o nativo, presupone una tolerancia inmunológica que evitaría las reaccio-

nes adversas que podrían resultar de la administración de la proteína recombinante. Por lo anterior, es razonable concluir que el betaglicano soluble recombinante tiene propiedades que lo hacen un fármaco potencial para bloquear la actividad del TGF- β implicada en un buen número de patologías de relevancia humana, tales como la nefropatía y el cáncer.⁶⁸

Referencias

1. Escobedo-De la Peña J, Rico-Verdín B. Incidencia y letalidad de las complicaciones agudas y crónicas de la diabetes mellitus en México. Salud Pública de Méx 1996;38:236-242.
2. Garza R, Medina R, Basu S, Pugh JA. Predictors of the rate of renal function decline in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Am J Nephrol 1997;17:59-67.
3. Sharma K, Ziyadeh FN. The emerging role of transforming growth factor- β in kidney diseases. Am J Physiol 1994;266:F829-F842.
4. Reeves WB, Andreoli TE. Transforming growth factor β contributes to progressive diabetic nephropathy. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:7667-7669.
5. Massagué J. The transforming growth factor- β family. Annu Rev Cell Biol 1990;6:597-641.
6. Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (TGF- β). Growth Factors 1993;8:1-9.
7. Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. Cell 2000;103:295-309.
8. Letterio JL, Roberts AB. Regulation of the immune response by TGF- β . Annu. Rev. Immunol. 1998;16:137-161.
9. Shuill MM, Ormsby I, Kier AB, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory response. Nature 1992;359:693-699.
10. Kuikarni AB, Karisson S. Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. Am J Pathol 1993;143:3-9.
11. Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot A, et al. TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are not overlapping with other TGF β knockout phenotypes. Development 1997;124:2659-2670.
12. Kaartinen V, Voncken JW, Shuier C, et al. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects in epithelial-mesenchymal interaction. Nature Genet 1995;11:415-421.
13. Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor- β in disease: the dark side of tissue repair. J Clin Invest 1992;90:1-7.
14. Wahi SM. Transforming growth factor beta (TGF- β) in inflammation: a cause and a cure. J Clin Immunol 1992;12:61-74.
15. Munger JS, Harpel JG, Gleizes P-E, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB. Latent transforming growth factor- β : structural features and mechanisms of activation. Kidney Int 1997;51:1376-1382.
16. Murphy-Ulrich JE, Poczatek M. Activation of latent TGF- β by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. Cytokine Growth Factor Rev 2000;11:59-69.
17. Crawford SE, Stelmach V, Murphy-Ulrich JE, et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 *in vivo*. Cell 1998;93:1159-1170.
18. Ribeiro SMF, Poczatek M, Schultz-Cherry S, Villain M, Murphy-Ulrich JE. The activation sequence of thrombospon-

- din-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent Transforming Growth Factor- β . *J Biol Chem* 1999; 274:13586-13593.
19. **Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, et al.** The integrin avb6 binds and activates latent TGF β 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999; 96:319-328.
 20. **Ciark DA, Coker R.** Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30:293-8.
 21. **Massagué J.** TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:753-791.
 22. **Massagué J, Chen Y-G.** Controlling TGF- β signalling. *Genes Dev* 2000; 14:627.
 23. **Massagué J.** How cells read TGF- β signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1:169-178.
 24. **Piek E, Heidin C-H, ten Dijke P.** Specificity, diversity and regulation in TGF- β superfamily signaling. *FASEB J* 1999; 13:2105-2124.
 25. **Wrana JL.** Regulation of Smad activity. *Cell* 2000; 100:189-192.
 26. **Hayashi H, Abdollah S, Qui Y, et al.** The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFP receptor and functions as an antagonist of TGF β signaling. *Cell* 1997; 89:1165-1173.
 27. **Nakao A, Afrakhte M, Moren A, et al.** Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signaling. *Nature* 1997; 389:631-635.
 28. **Biobe GC, Schiemann WP, Lodish HF.** Role of Transforming Growth Factor β in Human Disease. *N Engl J Med* 2000; 342:1350-1358.
 29. **López-Casillas F.** El TGF- β (Transforming Growth Factor tipo beta), piedra angular en la nefropatía diabética. *Rev Invest Clin* 2000; 52:487-490.
 30. **Lang F, Kiengel K, Wagner CA, et al.** Deranged transcriptional regulation of celivolume-sensitive kinase HSGK in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:8157-8162.
 31. **Border WA, Okuda S, Languino LR, Spom MB, Ruoslahti E.** Suppression of experimental glomerulonephritis by anti-serum against transforming growth factor β 1. *Nature* 1990; 346:371-374.
 32. **Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN.** Neutralization of TGF- β by anti-TGF- β antibody attenuates kidney hypertrophy and enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 1996; 45:522-530.
 33. **Ziyadeh FN, Hoffi-nan BB, Han DC, et al.** Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor- β antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:8015-8020.
 34. **Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA.** Expression of transforming growth factor β is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:1814-1818.
 35. **Sharma K, Ziyadeh FN, Alzahabi B, et al.** Increased renal production of transforming growth factor- β 1 in patients with type II diabetes. *Diabetes* 1997; 46:854-859.
 36. **Border WA, Noble NA, Yamamoto T, et al.** Natural inhibitor of transforming growth factor- β protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 1992; 360:361-364.
 37. **Isaka Y, Brees DK, Ikegaya K, et al.** Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. *Nat Med* 1996; 2:418-23.
 38. **Koib M, Margetts PJ, Galt T, et al.** Transient transgene expression of decorin in the lung reduces the fibrotic response to bleomycin. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:770-7.
 39. **Takeuchi Y, Kodama Y, Matsumoto T.** Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity. *J Biol Chem* 1994; 269:32634-8.
 40. **Iozzo RV, Moscatello DK, McQuillan DJ, Eichstetter I.** Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1999; 274:4489-4492.
 41. **Lin HY, Moustakas A, Knaus P, Weiis RG, Henis YI, Lodish HF.** The soluble extracellular domain of the type II transforming growth factor (TGF)- β receptor. *J Biol Chem* 1995; 270:2747-2754.
 42. **George J, Roulot D, Koteliansky VE, Bissell DM.** *In vivo* inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:12719-12724.
 43. **Isaka Y, Akagi Y, Ando Y, et al.** Gene therapy by transforming growth factor-beta receptor-IgG Fc chimera suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999; 55:465-475.
 44. **Böttiger EP, Factor VM, Tsang MLS, et al.** The recombinant proregion of transforming growth factor β 1 (Latency-associated peptide) inhibits active transforming growth factor β 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:5877-5882.
 45. **Huang SS, Liu Q, Johnson FE, Konishi Y, Huang JS.** Transforming growth factor beta peptide antagonists and their conversion to partial agonists. *J Biol Chem* 1997; 272:27155-27159.
 46. **Hugo CPM, Pichler RP, Schuize-Lohoff E, et al.** Thrombospondin peptides are potent inhibitors of mesangial and glomerular endothelial cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Vjdney Int* 1999; 55:2236-2249.
 47. **Akagi Y, Isaka Y, Aral M, et al.** Inhibition of TGF-beta 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996; 50:148-55.
 48. **Armendariz-Borunda J, LeGros L, Jr., Campollo O, Panduro A, Rincon AR.** Antisense S-oligodeoxynucleotides down-regulate TGFbeta-production by Kupffer cells from CCl4-injured rat livers. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1353:241-252.
 49. **Isaka Y, Tsujie M, Ando Y, et al.** Transforming growth factor-beta 1 antisense oligodeoxynucleotides block interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 2000; 58:1885-92.
 50. **Han DC, Hoffman BB, Hong SW, Guo J, Ziyadeh FN.** Therapy with antisense TGF-beta1 oligodeoxynucleotides reduces kidney weight and matrix mRNAs in diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278:F628-34.
 51. **Nakao A, Fujii M, Matsumura R, et al.** Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Clin Invest* 1999; 104:5-11.
 52. **Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, et al.** Inhibition of TGF-beta 1-induced extracellular matrix with a novel selective inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:595A.
 53. **Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al.** Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344:1031-1037.
 54. **López-Casillas F, Wrana JL, Massagué J.** Betaglycan presents ligand to the TGF- β signaling receptor. *Cell* 1993; 73:1435-1444.
 55. **Headlines.** Receptor of the third kind. *Trends in Cell Biol* 1993; 3:334.
 56. **López-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andrés JL, Lane WS, Massagué J.** Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. *Cell* 1991; 67:785-795.

57. **Ponce-Castañeda MV, Esparza-López J, Vilchis-Landeros MM, Mendoza R. V, López-Casillas F.** Murine betaglycan primary structure, expression and glycosaminoglycan attachment sites. *Biochim Biophys Acta* 1998;1384:189-196.
58. **López-Casillas F, Payne HM, Andrés JL, Massagué J.** Betaglycan can act as dual modulator of TGF- β access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* 1994;124:557-568.
59. **Esparza-López J, Montiel JL, Vilchis-Landeros MM, Okadome T, Miyazono K, López-Casillas F.** Ligand binding and functional properties of betaglycan, a coreceptor of transforming growth factor- β superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor- α and inhibin. *A J Biol Chem* 2001;276:14588-14596.
60. **Andres J, DeFalcis D, Noda M, Massagué J.** Binding of two growth factor families to separate domains of the proteoglycan betaglycan. *J Biol Chem* 1992;267:5927-5930.
61. **Lewis KA, Gray PC, Blount AL, et al.** Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signaling. *Nature* 2000;404:411-414.
62. **Bernard DJ, Chapman SC, Woodruff TK.** Inhibin binding protein (inhBP1p/2O), betaglycan, and the continuing search for the inhibin receptor. *Mol Endocrinol* 2002;16:207-212.
63. **Andres JL, Stanley K, Cheifetz S, Massagué J.** Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor- β . *J Cell Biol* 1989;109:3137-3145.
64. **Arribas J, López-Casillas F, Massagué J.** Role of juxtamembrane domains of the transforming growth factor- α precursor and the β -amyloid protein in the regulated ectodomain shedding. *J Biol Chem* 1997;272:17160-17165.
65. **Vilchis-Landeros MM, Montiel JL, Mendoza V, Mendoza-Hernández G, López-Casillas F.** Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor- β neutralizing agent. *Biochem J* 2001;355:215-222.
66. **Attisano L, Wrana JL, López-Casillas F, Massagué J.** TGF- β receptors and actions. *Biochim Biophys Acta* 1994;1222:71-80.
67. **López-Casillas F, Vilchis-Landeros MM, Mendoza M, Aguiar-León D, Hernández-Pando R.** Anti-thymocyte serum-induced glomerulonephritis is prevented by recombinant soluble betaglycan, an inhibitor of Transforming Growth Factor- β . *J Am Soc Nephrol* 2001;12:684A.
68. **Bandyopadhyay A, Lopez Casillas F, Malik SN, Montiel JL, Mendoza V, Yang J, Sun L-Z.** Antitumor activity of recombinant soluble betaglycan in human breast cancer xenograft. *Cancer Research* 2002;62:4690-4695.



II. Participación del factor de transformación tumoral- β en la regulación de la inflamación y la respuesta inmunológica

Rogelio Hernández-Pando*

Introducción

Los factores de transformación tumoral beta (TGF- β) son una familia de citocinas con actividades multifuncionales que regulan diversos eventos en el desarrollo embrionario, la carcinogénesis, la inflamación, la regeneración tisular, la cicatrización y la respuesta inmunológica.¹ En los mamíferos existen tres isoformas de TGF- β , de las cuales predomina el TGF- β -1 que es producido por diversas células del sistema inmunológico, incluidos linfocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas.² El TGF- β producido por estas células participa en la atracción quimiotáctica de células inflamatorias y en la activación o supresión de las mismas, dependiendo de la concentración local de esta citocina y del grado de diferenciación de las células blanco.² La producción y activación excesiva del TGF- β se ha relacionado con inmunosupresión en diversas enfermedades autoinmunes, neoplásicas e infecciosas.^{1,2} El conocimiento sobre las funciones del TGF- β en modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren la posibilidad de nuevas estrategias terapéuticas fundamentadas en la modulación de esta familia de citocinas.

Participación del TGF- β en el reclutamiento y activación de células inflamatorias

El TGF- β es un factor esencial en la regulación de la respuesta inflamatoria desde su inicio hasta su total resolución.³ El proceso de inflamación y reparación tisular se caracteriza por el reclutamiento ordenado y progresivo de células inflamatorias, empezando por las plaquetas, seguido por la emigración de neutrófilos, macrófagos y linfocitos, para concluir con la participación de los fibroblastos.³ La agregación y degranulación plaquetaria son de los eventos más tempranos en la respuesta inflamatoria, durante ésta hay una importante liberación de mediadores inflamatorios, incluido el TGF- β que es almacenado en los gránulos plaquetarios alfa. En esta fase inicial de la inflamación existen bajas concentraciones de TGF- β (fentogramos), que participan eficientemente en la quimiotaxis de mono-

citos y linfocitos sanguíneos.⁴ Al progresar la respuesta inflamatoria hay una mayor cantidad de células participantes que constituyen otra fuente de TGF- β , por lo cual aumenta su concentración (picomoles). En estas concentraciones, el TGF- β activa a los monocitos, incrementando la expresión genética de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor de crecimiento liberado de plaquetas, entre otras.⁵ Cada una de estas citocinas tiene a su vez importantes funciones promotoras de la inflamación y activación de la respuesta inmunológica, por lo tanto se considera que durante el proceso inflamatorio, la participación proinflamatoria del TGF- β es indirecta, ya que es mediada a través de la atracción y activación de monocitos para que éstos, a su vez generen otras citocinas que magnifican la respuesta inflamatoria. También es durante estas etapas de la inflamación cuando el TGF- β participa en el inicio de la regeneración y cicatrización del tejido lesionado, al atraer quimiotácticamente y activar a fibroblastos y células endoteliales.⁶ Otro aspecto de importancia en este proceso es el control autocrino que tiene el TGF- β que consiste en inducir su propia producción actuando sobre todo en monocitos.⁷

Si el efecto proinflamatorio que tiene el TGF- β al inicio de la inflamación fuera constante, éste se convertiría en un mecanismo de lesión tisular, debido al continuo reclutamiento y activación de células inflamatorias. Sin embargo, la misma respuesta inflamatoria está dotada de mecanismos que suprime las respuestas proinflamatorias y así evitan la inflamación excesiva que es capaz de producir daño tisular. Cuando la inflamación es extensa existen muchas células que producen TGF- β induciendo altas concentraciones de esta citocina (nanomoles). Cuando el TGF- β alcanza estas concentraciones actúa como una citocina antiinflamatoria tal vez porque en este momento existen células macrofágicas más diferenciadas que se desactivan ante la exposición a altas concentraciones de TGF- β .⁸ Por lo tanto, el efecto regulador del TGF- β en la inflamación es dependiente de sus concentraciones y del grado de maduración de sus células blanco. Otro mecanismo de control es la maduración bioquímica que esta citocina sufre durante su

*Sección de Patología Experimental, Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Rogelio Hernández-Pando, Calle Vasco de Quiroga, 15. 14000, Tlalpan, México DF. Tel.: 5254 853491. Número de Fax: 52-56-55-10-76 E-mail: rhdezpando@hotmail.com o rhpando@quetzal.innsz.mx

producción. El TGF- β es producido en su forma latente, la cual es biológicamente inactiva porque no puede asociarse a sus receptores celulares. El TGF- β latente está unido de forma no covalente a una glicoproteína de 75 kD y debe ser escindido enzimáticamente para dar origen al TGF- β activo. La actividad biológica del TGF- β es también controlada por otras citocinas, factores de crecimiento y hormonas, las cuales también están presentes en el microambiente de la respuesta inflamatoria.⁹

Efectos del TGF- β sobre la respuesta inmunológica

El TGF- β es una citocina única entre las interleucinas ya que suprime eficientemente la inmunidad celular actuando en varios niveles.² Como sucede con muchos otros tipos celulares, el TGF- β inhibe la proliferación de linfocitos, especialmente T maduros que ya han sido activados,¹⁰ mientras que los linfocitos T vírgenes o no activados son relativamente resistentes al efecto anti-mitogénico del TGF- β . Por lo tanto, como sucede con los monocitos, el efecto del TGF- β es altamente dependiente del grado de diferenciación celular de los linfocitos.²

También hay relación con el subtipo de linfocito, puesto que el efecto inhibitorio del TGF- β es considerablemente mayor en las células CD-4 que en las CD-8.¹¹ El TGF- β también inhibe la proliferación de los linfocitos B, les induce muerte celular por apoptosis¹² y suprime la diferenciación y actividad citolítica de las células NK y T.¹²

Otro efecto inhibitorio del TGF- β es la supresión de la expresión de las moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en macrófagos,¹³ con lo cual interfiere en el proceso de presentación antigenica evitando la activación de los linfocitos T. El resultado más importante de esta interferencia es la inhibición de la secreción de interleucina 2 (IL-2), que es un factor inductor de proliferación celular. De hecho, se considera que éste es el principal mecanismo por el cual el TGF- β inhibe la proliferación linfocitaria. Otra citocina mitogénica de linfocitos T y activadora de macrófagos es la interleucina 1 (IL-1). El TGF- β también inhibe su producción de manera directa e indirecta a través de suprimir la expresión de su receptor específico y al mismo tiempo aumentar la liberación del receptor soluble antagonista de IL-1, cuya función es atrapar y evitar la unión de esta citocina con su receptor.¹⁴

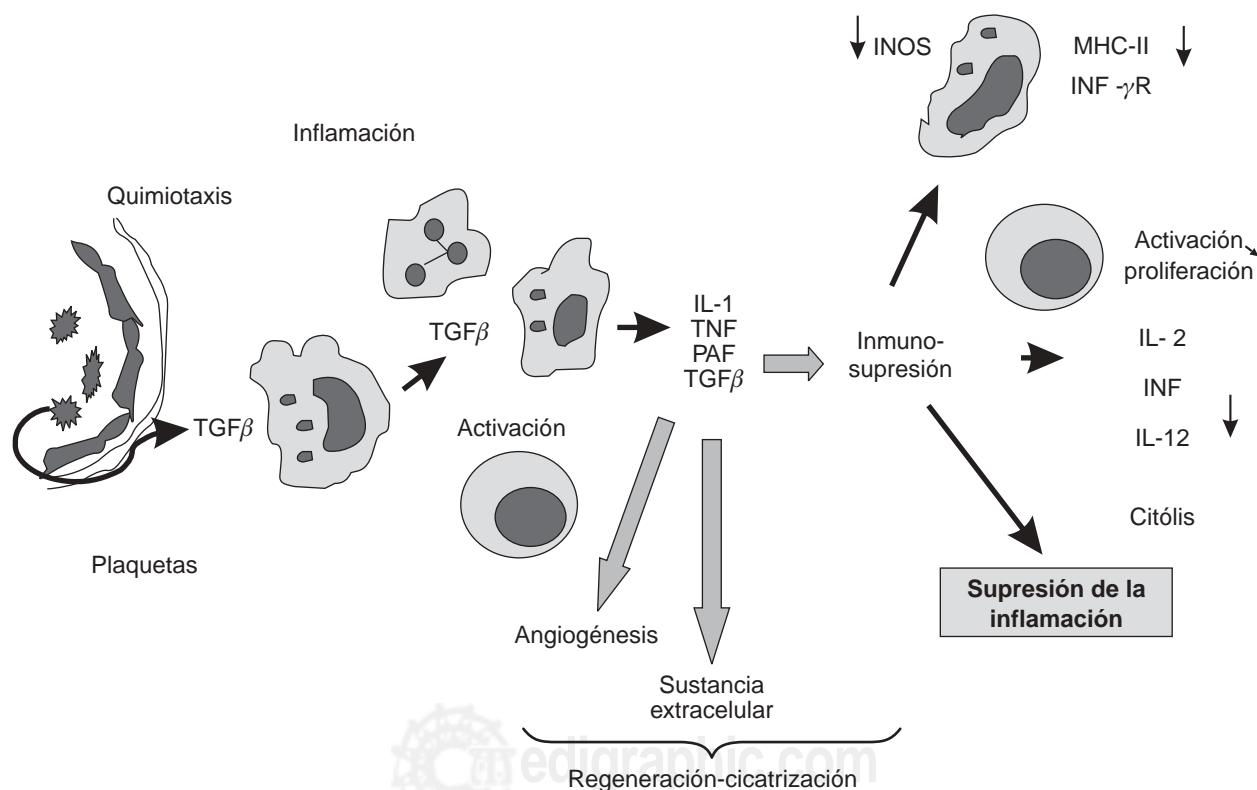


Figura 1. Participación del TGF- β en la inflamación e inmunomodulación. Al inicio de la inflamación las plaquetas liberan cantidades fentomolares de TGF- β , que por quimiotaxis atraen a los monocitos, los cuales producen TGF- β en concentraciones picomolares que a su vez estimulan la producción de citocinas proinflamatorias y de esta manera inducen regeneración y cicatrización tisular. Cuando la inflamación es intensa, el TGF- β es producido en concentraciones nanomolares que actúan suprimiendo la inflamación y la respuesta inmunológica.

Uno de los efectos fundamentales del TGF- β sobre el sistema inmunológico es la desactivación de los macrófagos, la cual puede llevarse a cabo a través de la inhibición directa de la producción de radicales libres de oxígeno y óxido nítrico, o de forma indirecta al suprimir la producción de citocinas activadoras de macrófagos como el TNF- α y el INF- γ y sus receptores.^{15,16} Para la producción de óxido nítrico es necesario que el TNF- α y el INF- γ activen la enzima óxido nítrico sintetasa inducible y el TGF- β inhibe tanto la transcripción como la traducción del gen que codifica esta enzima.¹⁷ Por otro lado, el INF- γ activa a los macrófagos como parte de la respuesta Th-1 y uno de los efectos inmunosupresores más eficientes del TGF- β es inhibir la producción de INF- γ y de su receptor expresado en la membrana de macrófagos.¹⁶ El TGF- β es un eficiente promotor de citocinas Th-2, particularmente de interleucina 10.¹⁸⁻²⁰ De hecho existe un subtipo especial de linfocito T el cual además de producir IL-4 e IL-10 (como las células Th-2) también secreta TGF- β , a esta subpoblación se le denomina Th-3 y está capacitada especialmente para suprimir las respuestas de inmunidad celular, además de ser la base de la tolerancia inmunológica de antígenos administrados por vía oral.²¹ Recientemente se han descrito las células T reguladoras CD4+CD25+ que al contactar con la membrana de linfocitos CD4 o CD8 suprimen su actividad a través del TGF- β .³³

Contribución del efecto inmunosupresor del TGF- β en la patogenia de enfermedades infecciosas

La producción sostenida y excesiva de TGF- β se ha sugerido como un factor patogénico en la fibrosis y el daño tisular presente en diferentes enfermedades.¹ Además de este efecto inductor de fibrosis existe anergia de la inmunidad celular, en varias enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide, lepra y tuberculosis y ésta también se ha atribuido, al menos en parte, a la excesiva producción de TGF- β .^{1,2,22} Este mecanismo patogénico es apoyado, por un lado, por las observaciones realizadas en animales transgénicos con sobreexpresión del gen de TGF- β en los cuales se observa intensa inmunosupresión y, por el otro, por la extensa inflamación multifocal que presentan los ratones con disrupción del gen que codifica al TGF- β 1.²³ En modelos animales de infecciones por gérmenes intracelulares facultativos como leishmaniasis y tripanosomiasis, se ha observado que hay un exceso en la producción de TGF- β y que esto favorece la progresión incontrolable de la enfermedad.^{24,25} En leishmaniasis y filariasis humana también se ha documentado la participación del TGF- β en la inducción de la inmunosupresión.^{26,27} En relación con infecciones virales, se ha observado que la inmunodeficiencia progresiva durante el SIDA se asocia a incremen-

to paulatino del TGF- β ²⁸ y en los casos de coinfección HIV y *M. tuberculosis* hay un efecto potenciador sinérgico en la producción del TGF- β lo cual incrementa la actividad viral y acelera la enfermedad.^{28,29}

El *Mycobacterium tuberculosis*, sus derivados proteicos purificados (PPD) y algunos de sus componentes moleculares como lipoarabinomanan inducen a los macrófagos a producir y secretar grandes cantidades de TGF- β .²² La participación de INF- γ es fundamental para activar a los macrófagos como parte de la respuesta Th-1, la cual es esencial en el control de enfermedades infecciosas producidas por gérmenes intracelulares facultativos, como la tuberculosis y la leishmaniasis.³⁰ Debido a que el TGF- β es un eficiente bloqueador de la producción de INF- γ y al mismo tiempo induce la producción de citocinas Th-2,¹⁸⁻²⁰ favorece la progresión de la enfermedad. En realidad, es probable que en este tipo de enfermedades infecciosas el TGF- β pueda tener una función dual, que por un lado estimule el reclutamiento y activación de células inflamatorias y por el otro inhiba a la inflamación y la activación de linfocitos T y macrófagos. El fino balance de la liberación y activación del TGF- β (durante el proceso infeccioso e inflamatorio) y la relación entre sus concentraciones y el grado de diferenciación de los diferentes tipos celulares con los que interactúa, determinarán que la respuesta inflamatoria e inmunológica sea o no adecuada. En modelos experimentales de tuberculosis pulmonar y en la enfermedad humana activa se ha demostrado una alta producción de TGF- β ,^{31,32} lo cual coincide con disminución de la actividad inmunológica protectora mediada por las citocinas producidas por los linfocitos Th-1 (INF- γ , IL-2) y el TNF- α . Estudios *in vitro* han demostrado que la anergia de la inmunidad celular que generalmente existe en pacientes con tuberculosis pulmonar activa puede ser corregida con la administración de anticuerpos bloqueadores o bloqueadores naturales del TGF- β , lo cual reduce significativamente el crecimiento intracelular del bacilo tuberculoso.³² Experimentos *in vivo* actualmente en curso en nuestro laboratorio, han mostrado que el bloqueo de la actividad del TGF- β por la administración de anticuerpos o bloqueadores naturales (betaglicano receptor tipo III soluble recombinante) administrados durante la fase avanzada de la tuberculosis pulmonar murina, reactiva eficientemente a la inmunidad protectora pero la respuesta inflamatoria es excesiva y produce extensas áreas de neumonía e insuficiencia respiratoria fatal. Esto demuestra claramente el papel que el TGF- β tiene como mediador antiinflamatorio. Es interesante que cuando además del bloqueador de TGF- β se administra un medicamento antiinflamatorio, específicamente un supresor de la síntesis de prostaglandinas, hay un efecto sinérgico de incremento en la producción de citocinas Th-1 y disminución significativa de la carga bacilar y de la extensión de la neumonía. Este tipo de agentes bloqueadores del

TGF- β administrados solos o en combinación con otros medicamentos pueden constituir un nuevo tipo de inmu-no-terapia, que contribuiría a reducir eficientemente el tiempo de antibioticoterapia y/o permitiría un mejor control de la enfermedad producida por microorganismos resistentes a antibióticos.

Referencias

1. **Wahl SM.** Transforming growth factor beta: the good, the bad and the ugly. *J Exp Med* 1994;180:1587-90.
2. **Letterio JJ, Roberts AB.** Regulation of immune response by TGF β . *Annu Rev Immunol* 1998;16:137-61.
3. **Wahl SM, Mc Cartney-Francis N, Mergenhagen ES.** Inflammatory and immunomodulatory release of TGF- β . *Immunol Today* 1989;10:258-262.
4. **Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, Mc Cartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB.** Transforming growth factor beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5788-5792.
5. **McCartney-Francis N, Mizel D, Wong L, Whal L, Whal S.** TGF- β regulates production of growth factors and TGF- β by human peripheral blood monocytes. *Growth Factors* 1990;4:27-35.
6. **Wahl SM.** Transforming growth factor beta in inflammation: a cause and a cure. *J Clin Immunol* 1992;12:61-68.
7. **Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB, Karin M, Roberts AB.** Autoinduction of transforming growth factor beta is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol* 1990;10:1492-1495.
8. **Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C.** Deactivation of macrophages by transforming growth factor beta. *Nature* 1988;334:260-262.
9. **Sporn M, Roberts AB.** Autocrine secretion-10 years later. *Ann Int Med* 1992;117:408-414.
10. **Kehrl JH, Wakefield LM, Robert AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Deryck R, Sporn M, Fauci AS.** Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 1986;163:037-50.
11. **Inge TH, Mc Coy KE, Susskind BM, Barret SK, Zhao G, Bear HD.** Immunomodulatory effects of transforming growth factor beta on T lymphocytes. Induction of CD-8 expression in the CTLL-2 cell line in normal thymocytes. *J Immunol* 1992;148:3847-53.
12. **Lomo J, Blomhof HK, Beiske K, Stokke T, Smedland EB.** TGF- β 1 and cyclic AMP promotes apoptosis in resting human B lymphocytes. *J Immunol* 1995;154:1634-43.
13. **Czarniecki CW, Chiu HH, Wong GH, Mc Cabe SM, Palladino MA.** Transforming growth factor beta I modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. *J Immunol* 1988;140:4217-4232.
14. **Tumer M, Chantry D, Katsikis T, Berger A, Brennan FM, Feldman M.** Induction of interleukin 1 receptor antagonist protein by transforming growth factor beta. *J Immunol* 1991;151:1635-1639.
15. **Ranges GE, Figari IS, Espevik T, Palladino MA.** Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1987;166:991-999.
16. **Pinson DM, Le Claire RD, Lorsbach RB, Parmely MJ, Russell R.** Regulation by transforming growth factor beta-1 of expression and function of the receptor for INF gamma on mouse macrophages. *J Immunol* 1992;149:2028-2038.
17. **Vodovotz Y, Bogdan C.** Control of nitric oxide synthase expression by transforming growth factor beta: implications for homeostasis. *Prog Growth Factor Res* 1994;5:341-351.
18. **Schmitt E, Hoehn P, Hueis C, Goedert S, Palm N, Rude E, Germann T.** Helper type 1 development of naive CD-4 T cells requires the coordinated action of interleukin 12 and interferon gamma and is inhibited by transforming growth factor beta. *Eur J Immunol* 1994;24:793-798.
19. **Strober W, Kelsali B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R, Neurath M.** Reciprocal IFN gamma and TGF- β responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today* 1997;18:61-64.
20. **Maeda Y, Kuwahara H, Ichimura Y, Ohtsuki M, Kurakata S, Shirahishi A.** TGF β enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal and tumor bearing mice. *J Immunol* 1995;15:4926-4932.
21. **Fukaura H, Kent SC, Pietrusiewicz MJ, Khouri SJ, Weiner HL, Haffer DA.** Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor beta-1 secreting Th-3 cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1996;98: 70-77.
22. **Tossi Z, Ellner J.** The role of TGF β in the pathogenesis of human tuberculosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;87:107-114.
23. **Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawloski S, Diebold R, Yin M, Alien R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D.** Targeted disruption of the mouse transforming growth factor beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359:693-99.
24. **Barral Neto M, Barral A, Brownell CE, Skeiki YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed SG.** Transforming growth factor beta in leishmanial infection; a parasite escape mechanism. *Science* 1992;257:545-48.
25. **Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A.** The microbicidal activity of interferon gamma treated macrophages against *Trypanosoma cruzi*, involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhabitable by interleukin 10 and transforming growth factor beta. *Eur J Immunol* 1992;22:2501-06.
26. **Barral Neto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho EM.** Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1995;17:21-28.
27. **King CL, Mahanty S, Kumaraswami V, Abrams JS, Regunthan J, Jeyamaran K, Ottesen EA, Nutman TB.** Cytokine control of parasite specific anergy in human lymphatic filariasis. *J Clin Invest* 1993;92:1667-1673.
28. **Lotz M, Seth P.** TGF beta and HIV. *Annu NY Acad Sci* 1993;685:501-511.
29. **Maltman J, Pargnelli IB, Graham GJ.** Specificity and reciprocity in the interactions between TGF- and macrophage inflammatory protein 1 -alpha. *J Immunol* 1996;156: 1566-1571.
30. **Rook GAW, Hemández Pando R.** The pathogenesis of tuberculosis. *Annu Rev Microbiol* 1996;50:259-284.
31. **Hernández Pando R, Orozco EH, Arriaga K, Sampieri A, Larriva Sahd J, Madrid MV.** Analysis of the local kinetics and localization of interleukin 1 alpha, tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1997;90:607-17.
32. **Hirsch C, Ellner J, Blinkom R, Tossi Z.** *In vitro* restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against *Mycobacterium tuberculosis* by natural inhibitors of transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:3926-3931.
33. **Shevaen EM.** CD4+CD25+ suppressor T cells more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002;2:389-400.

III. TGF- β : receptores, señales y acciones

Fernando López-Casillas,* Joan Massagué**

Introducción

El Transforming Growth Factor tipo beta, o simplemente TGF- β , es un factor de crecimiento involucrado en el control de la proliferación y diferenciación celular, el desarrollo embrionario, la reparación tisular y la respuesta inmune.^{1,2} Son tantas y tan diversas las acciones del TGF- β , que no es sorprendente encontrar que defectos en su fisiología normal pueden llevar a enfermedades de muy diversa naturaleza.^{3,4} Lo que sí sorprende es que todas las acciones del TGF- β estén mediadas por un mecanismo de transducción tan elegantemente sencillo,⁵⁻⁸ (Figura 1). En los últimos años el conocimiento de este mecanismo ha permitido poner nombres y apellidos a las moléculas que dan sustento material al nebuloso concepto del "contexto celular", muchas veces invocado para ocultar nuestra ignorancia sobre cómo es que las células responden al TGF- β . También ha permitido proponer mecanismos fisiopatológicos para una pléyade de enfermedades, incluyendo algunos tipos de cáncer, haciendo factible el eventual desarrollo de tratamientos racionales y efectivos.

La generación de la señal: los receptores

El TGF- β es un factor polipeptídico dimérico que se une con alta afinidad a diversas proteínas membranales. Sin embargo, sólo dos de ellas, el receptor tipo I y el tipo II, son indispensables para transmitir al interior celular la señal del TGF- β , de ahí que se les considera como los auténticos "receptores de señalamiento". Otras dos glicoproteínas transmembranales, el betaglicano y la endoglinina, se consideran "co-receptores" del TGF- β , pues aunque no son requeridas para la generación de su señal, son capaces de modularla al controlar la interacción del factor con los receptores de señalamiento.⁹

Los receptores tipo I y II del TGF- β son proteínas con un pase transmembranal cuyas porciones extracelulares unen al factor y sus regiones intracelulares son cinasas de proteínas que fosforilan residuos serina y treonina. Esta especificidad es una de las diferencias notables con respecto a los receptores de factores mitogénicos como el EGF (Epidermal Growth Factor) o el NGF (Neural Growth Factor), los cuales al unir a sus ligandos forman homodímeros activos cuyas cinasas fosforilan residuos tirosina

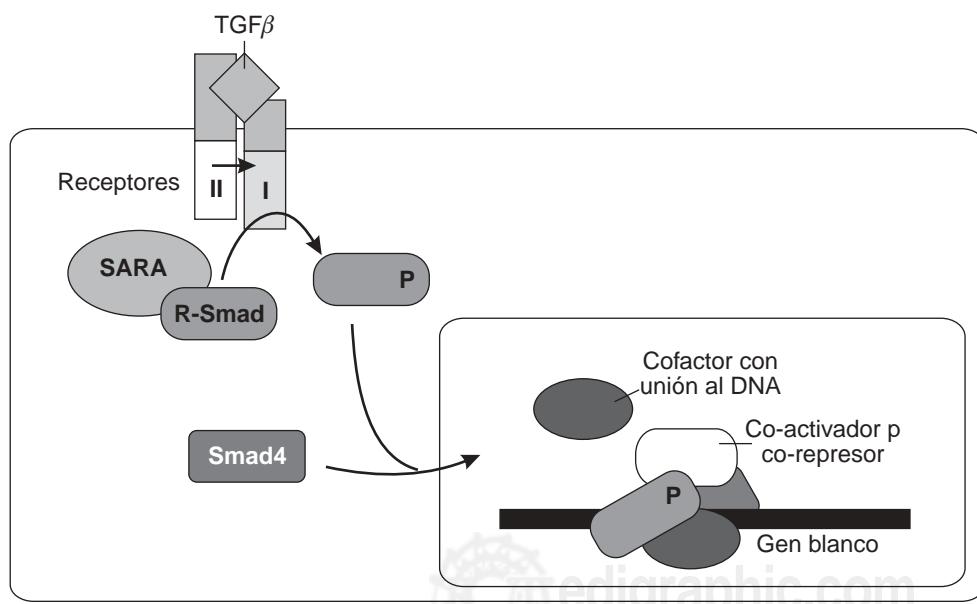


Figura 1. La vía de señalamiento del TGF-β.

*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México

**Memorial Sloan-Kettering Cancer Center and Howard Hughes Medical Institute New York City, N. Y., U.S.A. e-mail: j-massague@ski.mskcc.org
Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Fernando López-Casillas. *Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-246, México D.F., 04510, Tel.: (55) 56 22 56 25. e-mail: fcasilla@ifisiol.unam.mx

en sus sustratos. Otra diferencia es la forma asimétrica y direccional como los receptores del TGF- β forman un complejo activo. La unión del TGF- β al receptor tipo II induce la formación de un complejo con el receptor tipo I, receptor que es incapaz de unir por sí mismo al ligando. Esta asociación permite que la cinasa del receptor tipo II, la cual es constitutivamente activa, fosforile una importante región reguladora exclusiva del receptor tipo I, la región GS, llamada así por su alto contenido de glicinas y serinas. La fosforilación de GS resulta en la activación de su cinasa y en la propagación de la señal del TGF- β .¹⁰ La fosforilación de los residuos Thr,¹⁸⁵ Ser,¹⁸⁷ Ser,¹⁸⁹ y Ser¹⁹¹ de la región GS del receptor tipo I del TGF- β induce un cambio conformacional de la cinasa que favorece la unión y fosforilación específica de sus sustratos fisiológicos y simultáneamente favorece la separación de una proteína inhibitoria del TGF- β , la inmunofilina FKBP12.¹¹ La FKBP12 se une a la región GS en su estado desfosforilado y mantiene a la cinasa en una conformación incapaz de actividad catalítica. La fosforilación de la región GS no sólo impide la unión de FKBP12, sino que crea un sitio de unión para los sustratos de la cinasa del receptor, por ejemplo la proteína Smad2. En este complejo el extremo carboxilo de Smad2, en donde residen las serinas por fosforilar, queda orientado hacia el sitio activo de la cinasa. Estos hallazgos indican que a nivel molecular, el proceso de "activación" de la cinasa del receptor tipo I consiste en la conversión de la región GS de un sitio de unión de un inhibidor en un eficiente sitio reclutador de su sustrato.¹¹

La propagación de la señal: los SMADS

Algunos miembros de una novedosa familia de reguladores transcripcionales, las proteínas Smad, son los sustratos fisiológicos de la cinasa del receptor tipo I.¹²

Existen tres variedades estructural y funcionalmente distintas de Smads. Las que son fosforiladas por la cinasa de un receptor tipo I se denominan "R-Smads", para distinguirlas de los Co-Smads y los Smads inhibitorios, otros miembros de la familia que no son sustratos de estas cinasas. El receptor tipo I del TGF- β fosforila a Smad2 y/o Smad3 en las serinas del motivo Ser-Xxx-Ser que se localiza en el extremo carboxilo de la proteína. Esta fosforilación induce la asociación del R-Smad con Smad4 (con un Co-Smad), dando lugar al complejo Smad2/Smad4 (o Smad3/Smad4) el cual se trasloca al núcleo celular en donde interactúa con otros reguladores transcripcionales para modular, positiva o negativamente, la expresión de los genes regulados por TGF- β . Este novedoso y sencillo mecanismo de señalamiento también es usado por los otros factores celulares que constituyen a la superfamilia del TGF- β . Esta superfamilia incluye factores de gran importancia biológica como las activinas, los BMP (Bone Morphogenetic Proteins), el MIH (Mulierian Inhibitory Hormone), así como otros factores localizados en invertebrados como el dpp (decapentaplégico) que es un importante director del desarrollo en la mosca de la fruta.²

Los receptores tipo I de algunos de ellos, como los de la activina, también fosforilan a Smad2 y Smad3, en cambio, los receptores tipo I de los BMPs fosforilan selectivamente a Smad1, Smad5 y Smad8. No obstante, las formas fosforiladas de estos R-Smads se asocian con Smad4, el único Co-Smad de mamíferos conocido. Las proteínas Smads consisten de dos dominios globulares evolutiva y funcionalmente conservados, los dominios MH1 y MH2 que se localizan al extremo amino y carboxilo de la proteína, respectivamente. El dominio MH1 une DNA reconociendo secuencias CAGAC, mientras que el dominio MH2 posee la actividad reguladora de la transcripción. Los Smads 2 y 3 (y posiblemente otros Smads también) tienen una tendencia intrínseca para localizarse en el núcleo celular, no obstante, en la célula la mayor parte de ellos se mantiene en el citoplasma. Esta retención está mediada, en parte, por su asociación con la proteína SARA (Smad Anchor for Receptor Activation), la cual tiene al menos 3 funciones: mantener a los Smads en el citoplasma, ocultar la señal de localización nuclear presente en el dominio MH2 de los Smads y facilitar la presentación de los Smads a los receptores tipo I activados.¹³ Un efecto de la fosforilación de los R-Smads por el receptor tipo I es disminuir su afinidad por SARA, liberándolos de esta asociación, lo cual permite su unión con Smad4 y el desenmascaramiento de su señal de localización nuclear, lo cual resulta en su migración al núcleo celular.¹⁴

Una variante estructuralmente distinta de la familia son los I-Smads, o Smads inhibitorios (Smad6 y Smad7), los cuales tienen un dominio MH1 truncado y un dominio MH2 carente del motivo Ser-Xxx-Ser, pero con capacidad para unirse con los MH2 de los R-Smads. El Smad7 sobreexpresado por transfección, puede formar complejos estables con los receptores tipo I y II del TGF- β , pero a concentraciones fisiológicas el mecanismo que explica su efecto inhibitorio del TGF- β es su capacidad para formar complejos con los R-Smads, lo cual resulta en el bloqueo de su fosforilación por los receptores tipo I.⁵ La relevancia de los I-Smads es que pueden ser inducidos por TGF- β lo cual, en principio, les permitiría establecer asas de retroalimentación negativa moduladora de las acciones del factor.¹⁵

El contexto celular: un mar de colaboradores para los SMADS

Una de las primeras sorpresas del mecanismo de señalamiento del TGF- β fue descubrir que sólo dos receptores eran suficientes para mediar todas las respuestas celulares del factor. Estas respuestas, con su gran pleiotropía y variabilidad invitaban a la especulación sobre un elaborado y variado sistema de receptores y moléculas transducto-

ras. Sin embargo, el estudio sistemático de este problema, iniciado hace más de 12 años con la creación de líneas celulares con receptores mutantes incapaces de responder al TGF- β ^{16,17} y los más recientes estudios transcripcionales¹⁸ confirman que son suficientes dos receptores, 2 R-Smads y un Co-Smad para dar cuenta de las respuestas celulares del factor. De ahí que la interrogante actual sea explicar cómo el TGF- β genera tantas respuestas específicas con tan pocas piezas transduccionales. Esta cuestión se hace aún más crítica cuando se sabe que los dominios MH1 de los Smads se unen a elementos con secuencias CAGAC en forma poco selectiva y con baja afinidad, y que la unión con Smad4 poco contribuye a la especificidad de la respuesta.

Una primera respuesta vino del descubrimiento de que OAZ (Olf-Associated Zinc Finger), un factor transcripcional con motivos estructurales del tipo de los dedos de zinc es un mediador específico de linaje celular, de algunas respuestas de BMP. Las células P19, derivadas de un carcinoma embrionario, responden al BMP con la activación transcripcional del gen Vent2, un gen regulador del desarrollo que en *Xenopus* spp. suprime la neurogenización y causa la ventralización del mesodermo, respuesta típica al BMP en los embriones de esta especie. En cambio, la línea embrionaria mioblastica C2C12, es incapaz de dicha respuesta a pesar de tener un juego funcional de los receptores y los R-Smads requeridos para otras respuesta al BMP. Mediante un análisis detallado de los elementos de respuesta al BMP en el promotor de Vent2, Hata et al. identificaron que la secuencia TGGAGC, vecina a la secuencia CAGAC, es indispensable para la activación de Vent2 por BMP. Usando este par de elementos clonaron el factor transcripcional OAZ que se asocia con Smad1/Smad4 formando un complejo multiproteico que se une óptimamente a los elementos CAGAC y TGGAGC para mediar una completa estimulación de Vent2 por BMP en las células P19.¹⁹ Como era de esperarse, la expresión de OAZ en células C2C12 les restituía esta respuesta. Otro aspecto relevante del trabajo de Hata et al. fue la determinación que las porciones de OAZ responsables de las respuestas de BMP (los dedos de zinc 9-1 9, de un total de 30) estaban separadas de las regiones de OAZ previamente identificadas como mediadoras de la activación transcripcional de otros genes no relacionados con BMP. OAZ ya era conocido como un activador de genes del epitelio olfatorio y de linfocitos B durante el desarrollo embrionario, acciones mediadas por su asociación con el factor transcripcional Olf/EBF y su unión a elementos de respuesta a través de los dedos de zinc 2-8. Estos hallazgos demostraron que un mismo co-factor transcripcional puede ser multifuncional y que dependiendo de su unión con otros coactivadores se determina la especificidad de su respuesta. En el caso de OAZ, si se une con los Smads actúa sobre genes con

elementos de respuesta a BMP y si se une con Olf/EBF lo hace sobre genes propios del linaje linfoide u olfatorio.

Hoy en día es claro que los complejos R-Smad-Co-Smad funcionan casi siempre en colaboración con otros reguladores transcripcionales, reconociendo combinaciones específicas de elementos de respuesta en los promotores de sus genes blanco. En general, se puede hablar de varias categorías de colaboradores de los Smads. En una categoría se encuentran aquellos que carecen de actividad transcripcional propia y funcionan exclusivamente como adaptadores con capacidad de unión al DNA, como el OAZ y en otra los que además de unir secuencias específicas de DNA pueden activar o reprimir la transcripción de los genes blanco.⁷ Ejemplos de esta segunda categoría son JUNB, TFE3, CBFA/AML y LEF1/TCF, los cuales, además de cooperar en la vía de los Smads, también transducen señales extracelulares distintas a las del TGF- β , lo cual abre la posibilidad de integrar respuestas celulares complejas en función de los diversos estímulos que recibe la célula. La activación de la transcripción por estos complejos involucra a acetilasas de histonas como p300 y CPB que son atraídas al complejo a través de contactos con los Smads. De manera sobresaliente, los Smads también pueden asociarse con represores transcripcionales, por ejemplo las proteínas TGIF, SKI y SnoN, que tienen la capacidad de unirse a desacetilasas de histonas, enzimas cuyo efecto conduce a la condensación de la cromatina y de ahí a la represión transcripcional del DNA condensado. Un caso de especial relevancia es el de TGIF (TG3 interacting factor), pues mutaciones que afectan la dosis génica de TGIF causan la holoprosencefalia (HPE) en humanos. La HPE es un defecto genético que ocurre en 1 de cada 10,000 nacimientos y se caracteriza por la bifurcación incompleta de la parte anterior del tubo neural, dando lugar a malformaciones craneoencefálicas como la ciclopía y a ventrículos cerebrales fusionados.²⁰ TGIF es una proteína de vida media corta que se une a Smad2 compitiendo con el co-activador p300, de manera tal que la abundancia relativa de TGIF y p300 podría, en principio, determinar la naturaleza de algunas respuestas celulares al TGF- β . Es interesante hacer notar que EGF, a través de la vía de Ras, ocasiona la fosforilación de TGIF, lo cual resulta en la estabilización y un aumento en la vida media de la proteína, favoreciendo sus efectos represivos sobre la vía de las Smads.²¹ Estos hallazgos revelan al TGIF como un importante punto de contacto ("cross-talk") y regulación de dos vías de señalamiento antagónicas. Una conclusión de los ejemplos descritos anteriormente es que el llamado contexto celular, definido como la manera *sui generis* en que las células responden al ser estimuladas con TGF- β , consiste y tiene su sustento material en los distintos y prácticamente infinitos equi-

pos de colaboradores transcripcionales con que el núcleo de cada célula da la bienvenida al complejo R-Smad-Co-Smad. De ahí que hoy en día, al hablar de las acciones del TGF- β sea más pertinente preguntarse ¿qué hace la célula con la señal del TGF- β ? en vez de ¿qué le hace el TGF- β a la célula?

La respuesta anti-mitogénica del TGF- β .

Una de las cosas que las células de origen epitelial, endotelial, hematopoyético, neural y algunas mesenquimatosas, hacen al recibir la señal de TGF- β es dejar de proliferar. Sin duda uno de los aspectos más importantes de la biología del TGF- β es su capacidad para detener la división celular, pues la pérdida de dicha capacidad contribuye al fenotipo canceroso. De hecho, Smad4, la Co-Smad indispensable en la vía del TGF- β , fue identificada independientemente como el DPC4 (Deleted in Pancreatic Carcinoma locus 4), un gen causante de cáncer de páncreas, lo cual indica la relevancia que el TGF- β tiene en el control de la proliferación celular.²²

Las células de mamíferos llevan a cabo su división celular en una serie de etapas o fases que constituyen el llamado ciclo celular.²³ A nivel molecular, los engranajes que mueven al ciclo celular son los complejos entre un tipo de cinasas de proteínas, las cdks, (cyclin-dependent kinases) y sus subunidades reguladoras, las ciclinas.²⁴ Un evento clave para la proliferación celular es el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo, pues representa el compromiso de la célula para embarcarse en una nueva ronda de división. El avance a través de la transición G1/S requiere de la actividad de los complejos ciclina D-cdk4, ciclina D-cdk6, ciclina E-cdk2 y ciclina A-cdk2.²⁵ La actividad de estos complejos se necesita para fosforilar diversos mediadores de la progresión del ciclo celular, tales como la proteína Rb, el producto del gene del retinoblastoma. Varios mecanismos regulan la actividad cinasa de estos complejos ciclina-cdk: la presencia o ausencia de la ciclina, el nivel y tipo de fosforilación de la cdk y su asociación con proteínas inhibidoras de la cinasa, tales como p15, p21 y p27. El TGF- β detiene el ciclo celular en la fase G1 a través de dos mecanismos: regulando la expresión de genes responsables de la inhibición de las cdks y disminuyendo la expresión de c-myc, un factor transcripcional proto-oncogénico (Figura 2).

El TGF- β incrementa la expresión de los genes de p15 y p21 y reprime la expresión del gen cdc25A, el cual codifica una fosfatasa de tirosinas que remueve un fosfato inhibitorio de las cdks.³ Además, el incremento en los niveles de p15 mediado por el TGF- β tiene un interesante efecto colateral que refuerza la inhibición de los complejos ciclina-cdk, asegurando con ello la detención del ciclo celular. La proteína p27, a pesar de ser un inhibidor de las cdks, se acumula en los complejos ciclina D-cdk4/6, sin

que esto detenga el ciclo celular. De hecho se piensa que, debido a la manera en que se les une, p27 puede estabilizar los complejos ciclina D-cdk4/6 en las células en proliferación. Cuando TGF- β incrementa la expresión de p15 este inhibidor desplaza a p27 de los complejos ciclina D-cdk4/6 quedando en libertad para unirse al complejo ciclina E-cdk2, en donde tiene plena actividad inhibitoria de la cdk. De esta manera, al aumentar una sola clase de inhibidor de las cdks, el TGF- β inhibe a dos clases de ciclinas-cdk requieridas para la transición G1/S.

Una respuesta generalizada de todas las estirpes celulares que detienen su proliferación en presencia de TGF- β es la disminución en la expresión del protooncogén c-myc, un factor transcripcional mitogénico. Esta disminución es necesaria para estimular la expresión de p15 y p21 mediada por TGF- β . La expresión sostenida de c-myc en células epiteliales bloquea la activación transcripcional de p15 dependiente de TGF- β y las hace refractarias al efecto anti-mitogénico de TGF- β .²⁶ Si su concentración celular se mantiene por arriba de un umbral inhibitorio, c-myc se mantiene asociado a Miz-1 (Myc-interacting zinc-finger protein 1), un factor que tiene la capacidad de unirse el sitio iniciador del promotor del gen de p15. Este complejo Myc-Miz reprime en forma dominante la transcripción de p15, pues aunque existe un

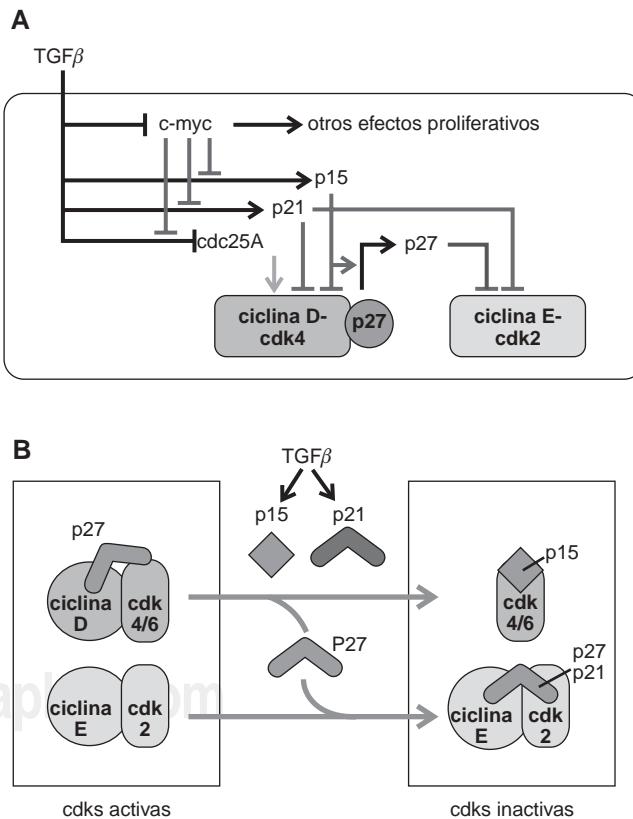


Figura 2. Los mecanismos antimitogénicos del TGF- β .

elemento clásico de respuesta a Smads (CAGAC) río arriba en el promotor de p15, éste es incapaz de abolir la represión de c-myc. Cuando los niveles de c-myc disminuyen por debajo del umbral, Miz-1 queda libre y en capacidad de unirse a un complejo transcripcional de Smads que se haya ensamblado en el elemento CAGAC, promoviendo la completa activación transcripcional de p15.¹⁸ Así pues, Miz-1 juega un papel dual en la expresión de p15 (y posiblemente también p21) funcionando como una base para el reclutamiento de factores activadores (Smads) o represores (c-myc) de la transcripción. Debido a que la represión mediada por c-myc es dominante sobre la activación de los Smads, para observar la respuesta anti-proliferativa completa del TGF-β, es indispensable primero reprimir la expresión de c-myc. Es importante hacer notar que la represión transcripcional de c-myc por TGF-β también está mediada por la vía de las Smads. En este caso el complejo R-Smad/Co-Smad se asocia con otras proteínas reguladoras para formar un complejo inhibitorio de la transcripción del gen de c-myc.²⁷ Es muy satisfactorio constatar que aun lo compleja que pueda ser la respuesta anti-proliferativa del TGF-β, su parte medular está mediada por la vía canónica de las Smads.

Epílogo

A pesar de la brevedad de esta revisión, esperamos haber compartido con el lector nuestra convicción de la indiscutible y meritoria prominencia del TGF-β en la biología y la medicina contemporáneas. Hemos dejado fuera de la discusión sus importantes funciones como regulador del desarrollo embrionario, de la reparación tisular y de la respuesta inmune, algunas de las cuales se discuten más ampliamente en otros artículos del presente simposio. No obstante, confiamos en que los aspectos que hemos cubierto de sus mecanismos de transducción darán al lector herramientas y estimularán su curiosidad para profundizar en este apasionante y trascendental tema.

Referencias

1. **Massagué J.** The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:597-641.
2. **Kingsley DM.** The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetics tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994;8:133-146.
3. **Massagué J, Blain SW, Lo RS.** TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000;103:295-309.
4. **Biobe GC, Schiemann WP, Lodish HF.** Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342:1350-1358.
5. **Massagué J.** TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753-791.
6. **Massagué J, Chen Y-G.** Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev* 2000;14:627-644.
7. **Massagué J.** How cells read TGF- β signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:169-178.
8. **Wrana JL.** Regulation of Smad activity. *Cell* 2000; 100:189-192.
9. **Massagué J, Attisano L, Wrana JL.** The TGF- β family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 1994;4:172-178.
10. **Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J.** Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 1994;370:341-347.
11. **Huse M, Muir TW, Xu L, Chen Y-G, Kuriyan J, Massagué J.** The TGF β receptor activation process: an inhibitor- to substrate binding switch. *Mol Cells* 2001;8:671-682.
12. **Macías-Silva M, Abdollah S, Hoodless PA, Pirone R, Attisano L, Wrana JL.** MADR2 is a substrate of the TGF β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 1996; 87:1215-1224.
13. **Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL.** SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 1998; 95:779-91.
14. **Xu L, Chen YG, Massague J.** The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2000;2:559-62.
15. **Nako A, Afrakhte M, Moren A, et al.** Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signaling. *Nature* 1997;389:631-635.
16. **Laiho M, Weis FMB, Massagué J.** Concomitant loss of transforming growth factor- β receptor types I and II in cell mutants resistant to TGF- β . *J. Biol Chem* 1990; 265:18518-18524.
17. **Laiho M, Weis FMB, Boyd FT, Ignotz RA, Massagué J.** Responsiveness to transforming growth factor- β restored by complementation between cells defective in TGF- β receptors I and II. *J Biol Chem* 1991;266:9108-9112.
18. **Seoane J, Pouponnot C, Stalier P, Schader M, Eilers M, Massague J.** TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol* 2001;3:400-8.
19. **Hata A, Seoane J, Lagna G, Montalvo E, Hemmati-Brivanlou A, Massague J.** OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell* 2000;100:229-40.
20. **Gripp KW, Wotton D, Edwards MC, et al.** Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signaling to human neural axis determination. *Nat Genet* 2000;25:205-8.
21. **Lo RS, Wotton D, Massague J.** Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional co-repressor TGIF. *EMBO J* 2001;20:128-36.
22. **Hahn SA, Schutte M, Hoque ATMS, et al.** DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996;271:350-353.
23. **Nurse P.** A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 2000;100:71-78.
24. **Murray A, Hunt T.** The Cell Cycle, an introduction. New York: Oxford University Press, Inc., 1993.
25. **Sherr CJ, Roberts JM.** CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁ phase progression. *Genes Dev* 1999;13:1501-1512.
26. **Warner BJ, Blain SW, Seoane J, Massague J.** Myc down regulation by transforming growth factor beta required for activation of the p15(INK4b) G(I) arrest pathway. *Mol Cell Biol* 1999;19:5913-22.
27. **Chen C-R, Kang Y, Siegel PM, Massague J.** E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGF β receptor to c-myc repression. *Cell* 2002;110:19-32.