SIMPOSIO

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-1β, TNF-α o IFN-γ, y suprimiendo la expresión de receptores para IL-1β 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-β1 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-β1mueren 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-β1 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-β2 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-β3 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 colágena. 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, esclerodermia, 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-β1 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 postraduccional 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 $KRFK_{415}$ en la TPS-1 y $LSKL_{57}$ 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 αvβ6 es otra proteína capaz de activar al TGF-β1, 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-β2-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 transduccion 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, presumibiemente 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 Na^+:K^+: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 descritos 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 quimérica TβRII-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 TβRII-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 TβRII-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 quimérica es capaz de revertir la respuesta antiproliferativa inducida por TGF-β1 en células Bnul-7 en cultivo, y de disminuir la producción de fibronectina EIIIA-positiva inducida por TGF-β1 en cultivos de células renales de ratas normales.[43] Empleando un esquema de terapia génica experimental, el cDNA del TβRII-Fc se inyectó en el músculo esquelético de ratas nefríticas. Este tratamiento produce suficiente proteína quimérica 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). Böttinger y colaboradores usaron ratones transgénicos que sobreexpresan TGF-β1 en hígado para demostrar la capacidad anti-TGF-β del LAP-β1 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-β1 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 demostrado[45] 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-β1 , 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-β1 y colágena tipo I en ratas con obstrucción uretral unilateral.[49] Recientemente se ha observado que la terapia con oligonucleótidos de TGF-β1 antisentido en ratones diabéticos disminuyó la producción de TGF-β1 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 endoglina.[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 citoplásmica 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 TGFβ.[56] El dominio extracelular contiene sitios potenciales de N-glicosilación y dos residuos serina (Ser^{533} y Ser^{544} 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 antagónicos de las inhibinas sobre los efectos de las activinas[62] 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 TGFβ.[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

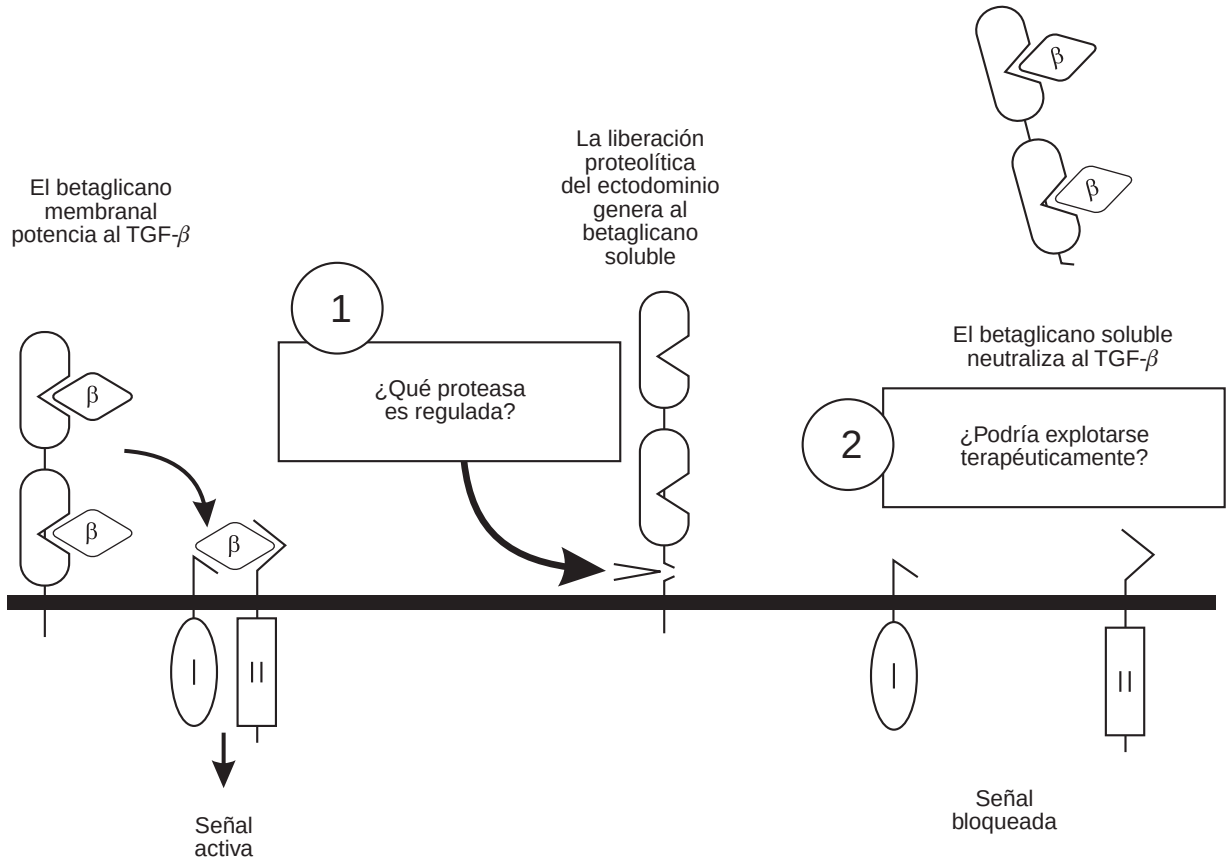

Figura 1. El betaglicano o receptor tipo III del TGF-β, como un regulador bifuncional del TGF-β.

propósito, el cDNA silvestre del betaglicano de rata se modificó para producir una proteína secretoria 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-β1, hasta de aproximadamente 0.5 nM para el TGF-β2. 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-β1 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-β2 que contra el TGF-β1. Además, comparada con la potencia que tiene un anticuerpo comercial neutralizador del TGF-β, el BGSR tiene una potencia similar contra el TGF-β1 y mayor contra el TGF-β2.[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 antitimocito.[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 reacciones 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 famiiy. 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.** TGFβ 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. lmmunol. 1998;16:137-161.
9. **Shuil MM, Ormsby I, Kier AB, et al.** Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-βl gene results in multifocal inflammatory response. Nature 1992;359:693-699.
10. **Kuíkarni 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.** TGFβ2 knockout mice have multiple developmental defects that are non overiapping with other TGFβ 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-β3 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 lnvest 1992;90:1-7.
14. **Wahi SM.** Transforming growth factor beta (TGF-β) in inflammation: a cause and a cure. J Clin lmmunol 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-Ulirich JE, Poczatek M.** Activation of latent TGF-β by thrombospondin-l: mechanisms and physiology. Cytokine Growth Factor Rev 2000;11:59-69.
17. **Crawford SE, Stelimach V, Murphy-Ulirich JE, et al.** Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-β1 *in vivo.* Cell 1998; 93:1159-1170.
18. **Ribeiro SMF, Poczatek M, Schultz-Cherry S, Villain M, Murphy-Ulirich 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 TGFβ1: 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 TGFβ signaling. Cell 1997; 89:1165-1173.
27. **Nakao A, Afrakhte M, Moren A, et al.** Identification of Smad7. a TGFβ-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, Kiingel 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 antiserum against transforming growth factor βl. 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 messangial 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-βl 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 Yl, Lodish HF.** The soluble exoplasmic 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 activaron by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potencial 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. **Böttinger EP, Factor VM, Tsang MLS, et al.** The recombinant proregion of transforming growth factor βl (Latency-associated peptide) inhibits active transforming growth factor β1 in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:5877-5882.
45. **Huang SS, Liu Q, Johnson FE, Konish 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 messangial 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 downregulate TGFbeta-production by Kupffer cells from CCI4-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 fnt 2000;58:1885-92.
50. **Han DC, Hoffman BB, Hong SW, Guo J, Ziyadeh FN.** Therapy with antisense TGF-betal oligodeoxynucleotides reduces kidney weight and matrix mRNAs in diabetic mice. Am J Physiol Renal Physiol 2000;278:F628-34.
51. **Nakao A, Fujii M, Matsumara 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.** Inhibftion of TGF-beta 1-induced extracellular matrix wfth 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. L**ópez-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-o and inhibin. A J Biol Chem 2001;276:14588-4596.
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 (inhBPlp/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-Hemández 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, Aguilar-Leon D, Hemández-Pando R.** Anti-thymocyte serum-induced glomerulonephritis is prevented by recombinant soluble betaglycan, an inhibitor of Transforming Growth Factor-b. 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.