

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 cdk (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 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, 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 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 KRFLK₄₁₅ en la TSP-1 y LSKL₅₇ en la LAP.¹⁸ Cabe resaltar que el péptido KRFLK 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 KRFLK. La integrina α v β 6 es otra proteína capaz de activar al TGF- β 1, 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- β 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 -amiloides 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 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

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 endogлина, 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

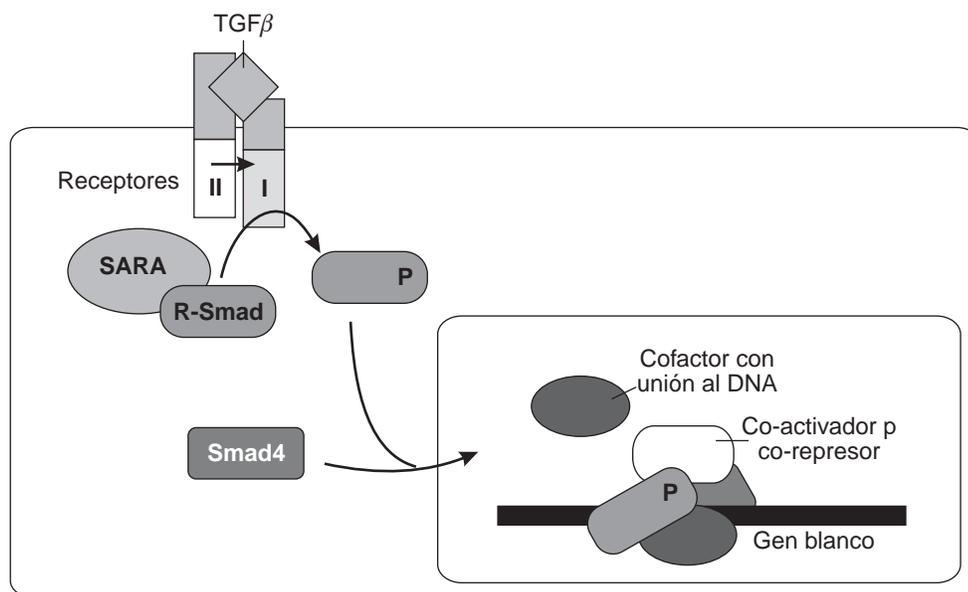


Figura 1. La vía de señalamiento del TGF-β.

*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 distinguirlos 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 (Mullerian Inhibi-

tory 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, ocluir 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 transductoras.

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* sp. suprime la neurogénesis y causa la ventralización del mesodermo, respuesta típica al BMP en los embriones de esta especie. En cambio, la línea embrionaria mioblástica C2C12, es incapaz de dicha respuesta a pesar de tener un juego funcional de los receptores y los R-Smads requeridos para otras respuestas 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 9-19, 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 cofactor 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 olfatorio 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 coactivador 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 los 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-