



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
TÍTULO: BMP-9 COMO DIANA
FARMACOLÓGICA**

Autor: Nuria Trujillo Pérez

Tutor: Blanca Herrera González

Convocatoria: Junio 2017

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.....	2
3. OBJETIVOS.....	4
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	5
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
5.1. Superfamilia del TGF- β	5
5.2. BMPs.....	6
5.3. BMP-9.....	8
5.3.1. Descripción molecular y síntesis.....	8
5.3.2. Receptores.....	8
5.3.3. Vías de señalización.....	9
5.4. BMP-9 e hígado: moléculas y vías de señalización implicadas.....	11
5.4.1. BMP-9 y Fibrosis hepática.....	11
5.4.2. BMP-9 y HCC.....	14
5.5. Estrategias terapéuticas.....	16
6. CONCLUSIONES.....	17
7. BIBLIOGRAFÍA.....	18

1. RESUMEN

La fibrosis hepática, caracterizada por la inflamación y acumulación de cicatrices fibrosas y duras en el hígado, junto con la neoplasia primaria de hígado más frecuente, el carcinoma hepatocelular (HCC), constituyen patologías graves que pueden desarrollarse a partir de diversas enfermedades crónicas de este órgano tales como hepatitis virales, hígado graso o enfermedades autoinmunes.

Aunque existen distintas formas de tratar estas enfermedades se requiere la aplicación de nuevas estrategias terapéuticas debido a su alta incidencia y mortalidad.

Un posible biomarcador y diana terapéutica descubierto recientemente y que sigue en investigación, es una proteína sintetizada en el hígado denominada proteína morfogenética ósea 9 (BMP-9), miembro de la familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) que pertenecen, a su vez, a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).

El mayor número de investigaciones acerca de los receptores, vías de señalización y genes diana de BMP-9 en relación con el hígado, han permitido la intervención en distintos puntos de la cascada de señalización de esta citoquina que, actualmente, constituye una prometedora estrategia para prevenir o evitar un aumento de la progresión de la fibrosis a cirrosis empleando compuestos anti-fibróticos, además de frenar o disminuir la actividad proliferativa y anti-apoptótica que ejerce este factor de crecimiento BMP-9 en las células tumorales del HCC mediante el empleo de antagonistas de los receptores o anticuerpos que actúan como potenciales agentes antitumorales.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es un conjunto de citoquinas implicadas en varias patologías humanas, incluyendo desórdenes autoinmunes y vasculares, así como enfermedades fibróticas y cáncer. Entre los distintos miembros que forman parte de esta superfamilia se encuentran las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), grupo al que pertenece la proteína de interés de este trabajo, la proteína morfogenética ósea 9 (BMP-9) también conocida como factor de crecimiento y diferenciación 2 (GDF2).

Las BMPs fueron descubiertas hace 50 años aproximadamente por su capacidad de regular la formación de huesos y cartílagos, el crecimiento y diferenciación de los condroblastos y células de osteoblastos in vitro, además de inducir la reparación de fracturas. Pero actualmente se sabe que tienen un abanico de funciones mucho más amplio del que se pensaba, desempeñando un papel en la homeostasis del tejido adulto y controlando muchos

procesos entre los que se incluyen la proliferación, diferenciación, migración, supervivencia y apoptosis celular [1].

Uno de los órganos objetivo de la función de las BMPs que ha adquirido gran importancia recientemente es el hígado, órgano vital que desempeña un papel fundamental en el cuerpo humano siendo sus tres funciones principales: desintoxicar, sintetizar y almacenar. Por ello, cualquier alteración del mismo puede tener consecuencias devastadoras, como es el caso de la fibrosis hepática y el carcinoma hepatocelular (HCC).

La fibrosis hepática es un proceso patológico que puede tener lugar como consecuencia de muchas enfermedades hepáticas crónicas tales como la hepatitis viral, enfermedad hepática alcohólica, hígado graso o enfermedades autoinmunes. La fibrosis aparece cuando se altera el equilibrio entre la síntesis (fibrogénesis) y la degradación (fibrólisis) del tejido matricial, es decir, cuando el tejido se acumula a un ritmo más rápido del que puede ser degradado y eliminado por el hígado. En respuesta a diversos factores que causan daño hepático, los hepatocitos sufren una degeneración, necrosis y apoptosis. Estos efectos patológicos conducen a la liberación de citoquinas inflamatorias y neurotransmisores que “activan” el funcionamiento de un tipo de células ubicadas en los sinusoides (vasos intrahepáticos donde circula la sangre) llamadas hepatocitos estrellados, unas células de apoyo situadas en el hígado, que junto con otros tipos celulares, comienzan a producir componentes de la matriz extracelular (tejido conjuntivo no funcional) como colágeno, glucoproteínas (tales como la fibronectina) y proteoglicanos. Las células estrelladas activadas también producen sustancias que inhiben la actividad de la proteasa, enzima encargada de escindir las proteínas de la matriz, lo que contribuye a la deposición de la misma en el hígado y alteran, así, el proceso de descomposición o degradación del colágeno [2].

Si la fibrosis progresa puede alterar las funciones del hígado y conducir a una cirrosis, condición en la que las cicatrices pasan a ser más graves. A su vez, la cirrosis y fibrosis hepática graves pueden ser el sustrato donde se desarrolle el HCC, que constituye el cáncer más común de hígado.

El HCC es el quinto cáncer más común y la tercera causa principal de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo [3], lo que representa un enorme costo socioeconómico y alrededor de 1 millón de muertes anuales. Entre las diversas causas que conducen a esta situación se encuentra el hecho de que los mecanismos moleculares que impulsan la hepatocarcinogenesis siguen siendo en gran parte desconocidos [4] y esto conlleva, a su vez, a la falta de terapias efectivas.

Hoy en día contamos con varias opciones de tratamientos para la etapa temprana e intermedia del HCC como el trasplante hepático, la cirugía de resección y la ablación por radiofrecuencia entre otros. Junto a ellos, se han desarrollado fármacos capaces de actuar sistémicamente en distintas etapas de la enfermedad; por ejemplo se consideran como tratamientos de primera línea para los pacientes con HCC avanzado el Sorafenib, una pequeña molécula dirigida a la proteína tirosina quinasa, y la familia de quinasas Raf, que ejercen un efecto antiangiogénico aumentando la supervivencia de los pacientes en una media de 3 meses [5, 6]. A pesar de contar con estas opciones, se plantea la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas debido al aumento de su incidencia y mortalidad en los últimos diez años.

Se ha demostrado en varias investigaciones que la señalización de las BMPs tiene un papel clave en el desarrollo temprano del hígado y, recientemente, ha comenzado a ser revelado su papel en la homeostasis del hígado adulto. De hecho, las BMPs están implicadas en varios aspectos de la fisiología y patología del mismo [1,2].

Este trabajo se centra concretamente en uno de los miembros de la familia de las BMPs, BMP-9, proteína que se describió por primera vez como un factor de crecimiento con un alto potencial hematopoyético, osteogénico y condrogénico [7]. También se ha identificado como un regulador del metabolismo de la glucosa, y como un factor de diferenciación para las neuronas colinérgicas en el sistema nervioso central. BMP-9 ha mostrado una fuerte afinidad a ALK1, un receptor Tipo 1 de la familia TGF- β que se expresa preferentemente por células endoteliales, lo que más adelante, junto con otros estudios demostró su papel en la regulación de la angiogénesis y el tono vascular [8].

Con esta revisión se pretende dilucidar el papel de BMP-9 sobre la fisiología y patología del hígado, haciendo hincapié en su función sobre la fibrosis hepática y en su actividad proliferativa y antiapoptótica sobre las células del HCC para, con ello, analizar su importancia como posible biomarcador y diana terapéutica.

3. OBJETIVO

El objetivo de esta revisión bibliográfica es dar una visión general acerca de los avances realizados en el estudio de la proteína BMP-9 y su importancia como diana terapéutica frente a patologías relevantes del hígado como son la fibrosis y el HCC.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Para recabar el máximo de información se llevó a cabo una revisión sistemática tanto de estudios científicos como de revisiones de artículos pertenecientes a bases de datos relacionadas con el sector de la salud.

Lo primero, se realizó una búsqueda general en Google Chrome introduciendo las palabras clave “TGF- β ”, “BMPs” y “BMP-9” con el fin de tener una idea general sobre el tema propuesto para nuestro estudio y detectar los antecedentes sobre los que sentar las bases del trabajo.

A continuación, ya con una visión general, se continuó la búsqueda en la base de datos Pubmed en la que se introdujo, al principio, la palabra “BMP-9” obteniendo un total de 191 estudios. Por ello, para recopilar aquellos que trataban el tema de forma más específica hubo que añadir conjuntamente en la búsqueda “BMP-9 e hígado” con lo que se redujo el número de estudios significativamente, de entre los que se descartaron algunos, tras su lectura, ya que no guardaban relación con el objeto de estudio.

Finalmente, con las revisiones y artículos seleccionados que avalaban la relación entre la proteína BMP-9 y el hígado se procedió a la recopilación de los puntos de interés para llevar a cabo la revisión bibliográfica.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Superfamilia del TGF- β

La superfamilia del TGF- β incluye un gran número de factores, estructural y funcionalmente relacionados, que actúan como reguladores multifuncionales de un amplio rango de procesos biológicos. Hasta el momento, se conocen más de 40 miembros de esta familia, entre los que se encuentran el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), los factores de diferenciación y crecimiento (GDFs), el factor inhibidor Mülleriano (MIF), activinas e inhibinas [9].

Ejercen sus efectos uniéndose a un complejo heterotetramérico de receptores transmembrana formado por un receptor **Tipo I** (quinasa similar al receptor de Activina, ALK) entre los que se diferencian, a su vez, 7 tipos, junto con un receptor **Tipo II** serina/treonina quinasa entre los que se distinguen 5 tipos (**figura 1**); así como la participación de muchos co-receptores y proteínas accesorias entre las que destacan la Endoglina y el Betaglicano [2].

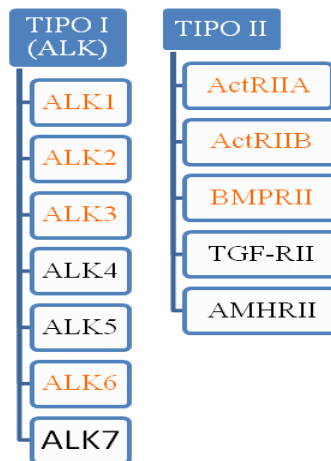


Figura 1: Clasificación de los receptores de la superfamilia del TGF- β . Las BMPs únicamente se unen a los receptores de color naranja. Autor: Nuria Trujillo Pérez (Jun 2016)

Las proteínas efectoras específicas denominadas **Smads** son los principales transductores en la superfamilia del TGF- β , con la función de mediar la señalización del receptor desde la superficie celular hasta los genes diana en el núcleo. Se pueden clasificar en 3 grupos:

- R-Smads o Smads que recluta el receptor: Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 y Smad8
- El mediador común de Smad o Co-Smad: Smad4
- Smads inhibitorios: Smad6 y Smad7

Por lo que, en la mayoría de los miembros de la familia, una vez unido el ligando la actividad serina/treonina del receptor II fosforila y activa el receptor de tipo I, que recluta y fosforila, a su vez, las R-Smads. Desde la nueva conformación aumenta la afinidad por el Co-Smad, Smad4 formándose un complejo (R-Smads-Smad4) que se acumula en el núcleo [10].

5.2. BMPs

Las BMPs son una gran subfamilia incluida en la superfamilia del TGF- β . Existen al menos 18 miembros de esta familia BMP/GDF que se pueden subdividir en 7 grupos diferentes [1]:

- a) BMP-2 y -4
- b) BMP-5, -6, -7 y -8
- c) GDF - 5, -6 y -7
- d) GDF - 8 y - 11
- e) BMP - 9 (GDF - 2) y -10
- f) GDF - 1, -2 y -3
- g) GDF - 10 y BMP - 3

Están involucrados en numerosos procesos biológicos durante el desarrollo embrionario y la vida adulta, incluyendo la pluripotencia de las células madre embrionarias, la diferenciación osteoblástica, la homeostasis ósea y, más recientemente, la angiogénesis [11].

BMPs se unen, como el resto de los miembros de la superfamilia TGF- β , a un complejo heterotetramérico localizado en la membrana celular que esta constituido por dos subtipos diferentes de receptores transmembrana, el receptor de tipo I, de los cuales solo cuatro de los previamente mencionados están implicados en la señalización de BMPs: ALK1 (ACVRL1), ALK2 (ACVRIA), ALK3 (BMPRIA) y ALK6 (BMPRIB), y los receptores de tipo II reduciéndose a tres los que participan en la señalización de estos miembros: BMPRII, ActRIIA y ActRIIB [1] (**Figura 1**).

Una vez unido el ligando (BMPs), la actividad serina/treonina del receptor II fosforila y activa el receptor de tipo I que, a su vez, recluta y fosforila específicamente Smad1, 3 y 8, lo que permite la formación de un complejo entre estas proteínas con Smad4 que se transloca al núcleo para modular, junto con otras proteínas de unión específica, la transcripción de genes [1, 12].

Se ha descrito que las BMPs también podrían desencadenar vías de señalización no-canónicas o no-Smads que, en ciertos contextos, son fundamentales para los efectos biológicos de las BMPs [1,13]. Se incluyen las vías MAPK (p38, ERK y JNK), PI3K/AKT, NF- κ B, Wnt y Rho-GTPasa [1].

La desregulación de la señalización BMP puede tener consecuencias patológicas como el cáncer. De hecho, su contribución es una cuestión de investigación intensa tanto en actividades anti- como pro-tumorigénicas para diferentes miembros de la familia [14,15]. Los ligandos de BMP se sobreexpresan en varios tipos de tumores incluyendo el tumor de próstata, melanoma, pulmón, ovario y el tumor gástrico [14]. Además, la expresión aberrante de los receptores de BMP se ha asociado con el proceso cancerígeno [15]. Esta actividad pro-tumorigénica de las BMPs no sólo incluye la promoción de la proliferación, migración /invasión, transición epitelial a mesenquimal (EMT) y supervivencia, sino que también ha sido descrito recientemente su papel en la latencia y recurrencia tumoral [16].

Además, como ya se ha mencionado, se descubrió que su señalización tiene un papel clave en el desarrollo temprano del hígado, y se ha puesto de manifiesto su papel en la homeostasis del hígado adulto. De hecho, las BMPs están implicadas en varios aspectos de la fisiología y patología del mismo, incluida la regeneración y fibrosis hepática [10].

Por otro lado, BMPs presentan una actividad pro-tumorigénica en las células cancerígenas del hígado, hecho apoyado por los datos obtenidos incubando con Noggin y Chordin

(antagonistas de BMPs) con los que se disminuyó la invasión celular y migración en HCC, confirmando así la implicación de la señalización BMP [17].

5.3. BMP-9

BMP-9 es un miembro de la familia de las BMPs cuyo estudio se ha empezado a abordar más recientemente que el de otros miembros de esta familia, pero no por ello es menos importante pues se ha corroborado que también presenta un papel fundamental al estar implicado en la regulación de muchas funciones biológicas, tales como la formación del cartílago, la angiogénesis, la diferenciación de las neuronas y el metabolismo de la glucosa y lípidos entre otras funciones [2].

5.3.1. Descripción molecular y síntesis

En ensayos realizados sobre 20 tejidos humanos diferentes, se analizó la expresión de RNAm de BMP-9 revelándose que se expresaba principalmente en el hígado y, concretamente, por hepatocitos y células epiteliales biliares de entre todos los diferentes tipos de células hepáticas. También, aunque a un nivel mucho más bajo, se detectó en el cerebro y los pulmones (más de 100 veces menos) [18].

BMP-9 se sintetiza como una proteína precursora de 429 aminoácidos (aa) denominada Pre-pro-BMP9, compuesta por un péptido señal de 22 aa, un prodominio de 297 aa (33 KDa) y una proteína madura de 110 aa (12,5 KDa). Pre-pro-BMP9 se homodimeriza y posteriormente se escinde por endoproteasas séricas para generar dos formas activas: por un lado, la forma dimérica, madura y corta (25 KDa) y, por otro lado, el prodominio (100 KDa) que puede permanecer asociada con la primera forma por uniones no covalentes [2].

5.3.2. Receptores

Entre los receptores de BMPs, solo 5 han mostrado estar implicados en la señalización BMP-9, entre ellos se encuentran: ALK1, ALK2, BMPRII, ActRIIA, ActRIIB y el co-receptor Endoglina [2].

Los experimentos de *BIAcore* demostraron que BMP-9 se une con mayor afinidad a los receptores ALK1 y ActRIIB y también, aunque con menor afinidad, a ALK2 y a los otros receptores de tipo II: BMPRII y ActRIIA [19].

Mientras que la mayoría de BMPs se unen a receptores de tipo I ALK2, ALK3 o ALK6, BMP-9 (y BMP-10) muestran mayor afinidad por ALK1 el cual ejerce su actividad serina/treonina quinasa específicamente sobre Smad1, 5 y 8 y su expresión está restringida

principalmente a células endoteliales, aunque también se ha detectado en sitios específicos de interacción epitelial-mesenquimal, monocitos y células de carcinoma pancreático. Sin embargo, las células responden a BMP-9 en ausencia de ALK1 a través del receptor ALK2 [20]. En tejido hepático, en células hepáticas primarias y líneas celulares de cáncer de hígado se observó la expresión de todos estos receptores de BMP-9, lo que indicó que esta proteína podría desempeñar un papel importante a nivel de este órgano [2].

➤ **Co-Receptores y reguladores extracelulares**

Entre los **co-receptores** que modulan la señalización BMP cabe destacar la Endoglina (CD105), proteína transmembrana con grandes dominios extracelulares y regiones citoplasmáticas ricas en serina/treonina y por la que presenta una gran afinidad BMP-9. La Endoglina no puede unirse al ligando por sí misma sino que se une a BMP-9 en presencia de receptores de señalización de tipo I o tipo II. Su fosforilación y activación ocurren en células endoteliales humanas y en fibroblastos de ratón, y es regulada por receptores de la superficie celular, incluyendo ALK5, ALK1 y receptores de tipo II. Se expresa en células endoteliales (ECs), epiteliales, fibroblastos y células estrelladas hepáticas (HSCs) [2].

Por otro lado, diferentes **reguladores extracelulares**, como las familias de los antagonistas Noggin y Chordin, intervienen en la actividad de BMP durante el desarrollo. Recientemente se ha demostrado que crossviennes2 (CV2), uno de los miembros de la familia Chordin, se une con gran afinidad a BMP-9 inhibiendo de este modo su unión a ALK1 y limitando así su actividad [21]. Por el contrario, Noggin es incapaz de unirse a BMP-9 e inhibir su actividad osteogénica en células mesenquimales [22].

5.3.3. Vías de señalización

La unión de BMP-9 a los receptores de membrana celular induce, al igual que los demás miembros de BMPs, la formación de un complejo heterólogo que conduce a su activación, pero a diferencia de otros miembros, BMP-9 se une primero al receptor de tipo I.

La transducción de señales que tiene lugar concretamente en las células de mayor interés para este trabajo, las células hepáticas, se lleva a cabo a través de los receptores de tipo I (ALK1, ALK2) y receptores tipo II (BMPRII, ActRII), y pueden ser moduladas por el co-receptor Endoglina. Una vez activado el complejo receptor se reclutan y fosforilan, como el resto de BMPs, las proteínas Smad1, 5 y 8, que constituye la vía de señalización principal de BMP-9. A continuación, se unen y forman un complejo con Smad4 que se transloca al núcleo donde

se une a un elemento sensible a Smad en el gen diana para, finalmente, modular la expresión génica [1,2] (**Figura 2**)

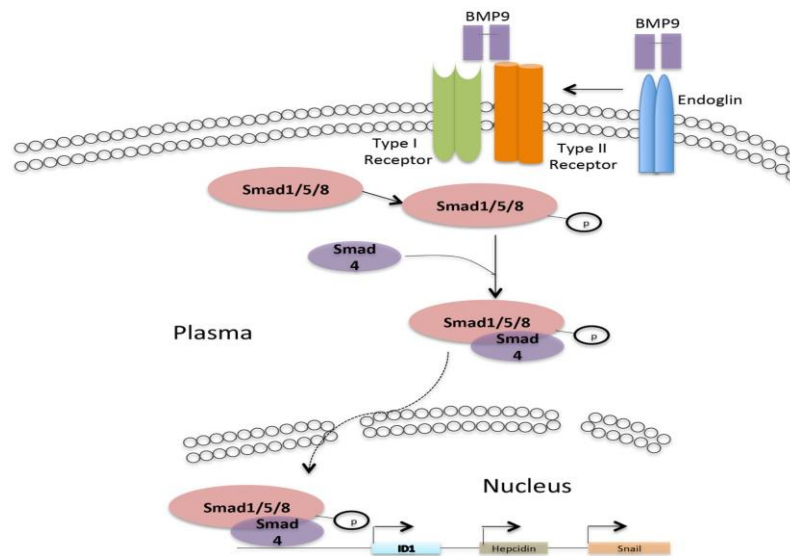


Figura 2: Vía de señalización Smad de BMP-9 en células hepáticas ²

Es importante destacar que, en ciertos tipos celulares, BMP-9 al igual que otros ligandos BMPs también activa otras vías de señalización conocidas como no canónicas o no Smad. Sin embargo, se sabe poco acerca de la inducción de vías no canónicas por BMP-9 y la mayoría de datos se han obtenido en células mesenquimales progenitoras (MPC), en las que la vía JNK mediada por BMP-9 está involucrada en la diferenciación osteogénica de MPCs [23]. Algunos autores también han encontrado que BMP-9 conduce a la activación de las vías p38 y ERK que, a su vez, parece que modulan la vía Smad de manera que p38 inducido por BMP-9 disminuye la fosforilación Smad1/5/8 mientras que la inhibición de ERK resulta en el efecto contrario [24].

➤ **Regulación de la expresión de genes diana mediada por BMP-9**

BMP-9 modula una serie de genes implicados en la interacción célula-célula (ej. Cadherina 6 y 11); en los componentes de la matriz extracelular (Col9a1, Col9a3 y Col11a1); en el control del ciclo celular (inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1C) y en la señalización BMP (Alk3, Noggin y Roaz).

En el hígado, **Hepcidina** es el gen diana regulado por BMP-9 mejor conocido pero no es el único, pues el gen **Id1** está fuertemente regulado por esta proteína en células HepG2 de HCC

así como en los hepatocitos primarios y, el regulador principal de la matriz extracelular **Snail** es inducido también por esta citoquina en células de cáncer de hígado [1].

5.4. BMP-9 e hígado: moléculas y vías de señalización implicadas

5.4.1. BMP-9 y fibrosis hepática

Los miofibroblastos son la fuente normal de las síntesis de proteínas de la matriz extracelular (ECM), componente clave en el desarrollo de la fibrosis hepática [25]. Ya había estudios que mostraban que citoquinas, tales como TGF- β 1 [26] y BMP-4 [27] con actividad pro-fibrótica, junto con BMP-7 [28], BMP-6 y BMP-2 [29] con propiedades antifibróticas, regulaban la síntesis de proteínas de la ECM y otros procesos involucrados en fibrosis tisular, tales como inflamación, proliferación y apoptosis.

Bi y Ge (2014) realizaron una revisión que recogía las primeras demostraciones del posible papel de BMP-9 en la fibrosis hepática, patología que conduce a la activación de células hepáticas no parenquimatosas y al desequilibrio de las funciones celulares.

En la revisión indicaban que las HSCs, células del conducto biliar y células de Kupffer expresan principalmente el receptor ALK1 que puede unirse a BMP-9 para, posteriormente activar la vía de señalización intracelular. También se acentuó la importancia de la Endoglina y los genes diana de BMP-9 denominados Id1, Hecpídina y Snail en la fibrosis hepática pudiendo servir como marcadores biológicos o dianas terapéuticas de esta patología.

❖ Relación con la Endoglina

La Endoglina, como ya se ha mencionado previamente, es un co-receptor que ejerce un efecto regulador notable sobre la señalización de BMP al mediar la fosforilación de Smad. Aunque los hepatocitos no expresan Endoglina, si lo hacen las células humanas de HCC. Además, algunos estudios han demostrado que durante la fibrosis hepática inducida por diferentes causas, el nivel circulante de Endoglina se incrementa significativamente.

❖ Relación con el gen diana Id1

Utilizando líneas celulares hepáticas HepG2 y células primarias cultivadas se demostró que BMP-9 inducía significativamente la expresión del gen Id1. Durante la fibrosis hepática, se observó que BMP-9 se unía al receptor ALK1 que activaba, a su vez, el gen diana Id1 a través de la vía Smad1, induciendo así la diferenciación de las HSCs en fibroblastos, que producían proteínas de la ECM implicadas en el desarrollo de fibrosis.

Además, en un estudio se indicó que la supresión de Id1 en HSCs perjudicaba la expresión de la proteína del citoesqueleto actina α del músculo liso (α SMA) implicada en la formación de la ECM, lo que sugiere que Id1 tiene una función vital durante la fibrosis.

Añadir que, *Matsuda et al.* realizaron un ensayo con 112 pacientes con el que demostraron que entre aquellos que padecían cirrosis hepática, un aumento de la expresión Id1 era un factor de riesgo para la aparición de HCC. Por lo que, Id1 podría ser utilizado como un marcador de alto riesgo para predecir si un paciente con cirrosis eventualmente podría desarrollar HCC.

❖ **Relación con el gen diana Hepsidina**

Hepsidina es otro gen diana importante de BMP-9 en las células hepáticas. Un efecto significativo de Hepsidina es la inhibición de la absorción y el reciclado del hierro. En la clínica, la deposición de hierro acompaña a la fibrosis y cirrosis hepática. De hecho, los pacientes con enfermedad hepática crónica tienden a tener trastornos relacionados con la expresión de este gen y la deposición hepática de hierro. Concretamente, en pacientes con hepatitis C crónica, se pudo ver que la deposición de este mineral en el hígado podía causar daño al estrés oxidativo e inducir apoptosis, contribuyendo así a la fibrosis hepática. Por todo ello, el gen Hepsidina podría servir como una diana terapéutica o un marcador biológico de la fibrosis hepática asociada a la deposición de hierro.

❖ **Relación con el gen diana Snail**

Snail es otro de los genes implicados en la señalización BMP-9 en las células de cáncer de hígado. Al inhibir su actividad, los genes pro-fibróticos, tales como el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), el colágeno I y el TGF-1, quedaron regulados a la baja. Estos efectos resultaron en la inhibición de la fibrosis indicando que Snail podría estar involucrado en la misma y podría ser utilizado para reducir la progresión de esta enfermedad.

Más recientemente, *Muñoz-Félix et al. (2016)* publicaron un artículo en el que se analizó de manera más minuciosa la implicación de BMP-9 en la fibrosis hepática. Se indicaba que esta citoquina conducía a la activación de la vía Smad1/5/8 ejerciendo una actividad pro- o anti-fibrótica dependiendo del contexto biológico y del tipo celular. Por un lado, se observó que esta vía jugaba un papel anti-fibrótico en diferentes modelos experimentales de fibrosis renal [28] o en experimentos in vitro. Sin embargo, en otros contextos biológicos, la activación de

Smad1 promovía la síntesis de proteínas de la ECM en células hepáticas, células mesangiales glomerulares o fibroblastos dérmicos.

Como muestra este estudio, BMP-9 estimuló la expresión de proteínas de la ECM: colágeno I, fibronectina y factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF/CCN2) en células embrionarias de fibroblastos en ratones (MEFs) y a través de los receptores ALK1 y ALK5 mediante la activación de las siguientes vías:

- **Smad1/5/8:** Se observó que podría activarse a través de receptores ALK1 (posiblemente formando un complejo con receptores BMPRII).
- **Smad2/3:** Principalmente asociada a la señalización TGF- β 1, por lo que se ha indicado que podría activarse a través de ALK5, pero aun así ALK1 es esencial para promover esta activación BMP9-inducida, lo que sugiere la formación de un complejo ALK1/ALK5.
- **MAPK/Erk1/2:** En estudios in vitro con fibroblastos, el tratamiento con BMP-9 condujo a un aumento de la fosforilación Erk1/2, vía de señalización relacionada con la expresión de proteínas de la ECM.

Por lo que, por una parte el receptor ALK5 está directamente implicado en la expresión de las proteínas de la ECM y, por otra parte, BMP-9 necesita el receptor ALK1 para inducir la activación de todas las vías mencionadas (**figura 3**). Estos datos identifican BMP-9 como un nuevo factor pro-fibrótico in vitro que abre nuevos caminos en el estudio de las enfermedades fibróticas [30].

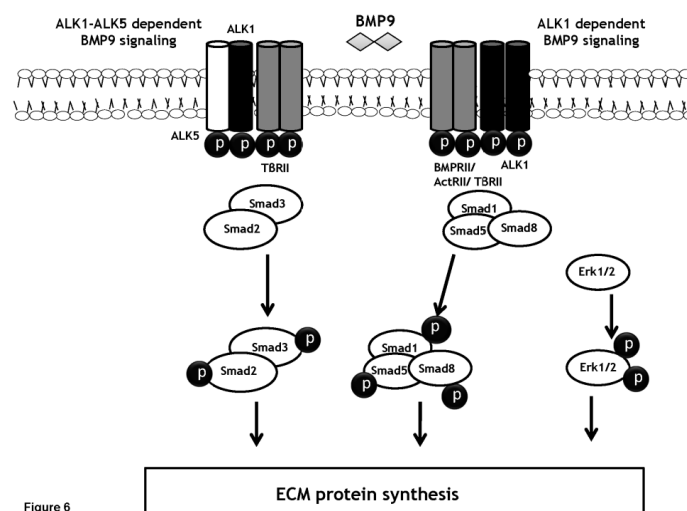


Figura 3: Mecanismos de síntesis de proteínas de la ECM inducidos por BMP-9 ³⁰

5.4.2. BMP-9 y HCC

La angiogénesis es un proceso de gran importancia durante el desarrollo embrionario pero está principalmente quiescente en la etapa adulta. Sin embargo, se reactiva durante procesos de reparación de heridas y bajo condiciones patológicas como el crecimiento y la metástasis tumoral [1]. En cuanto al papel de BMP-9 en la angiogénesis, se mostró en un ensayo cómo inhibía la neo-angiogénesis *in vivo* en ratones, además de impedir la circulación sanguínea en el ensayo CAM [31].

Se ha avanzado en la búsqueda de si BMP-9 actúa como un factor pro- o anti-angiogénico en las enfermedades hepáticas y como se vuelven los efectos anti-proliferativos y migratorios durante el proceso cancerígeno, pero aún así, queda mucho por conocer.

En el hígado, se encontró la expresión de los receptores ALK2 y ActRIIA en todo el tejido hepático y se demostró la expresión de BMPRII en hepatocitos primarios de ratón y líneas celulares de HCC. Estudios iniciales ya habían mostrado que BMP-9 se une específicamente a receptores en la línea celular HepG2 de HCC, y otros datos indicaron que estas células cancerígenas expresan los receptores ALK2, BMPRII, ActRIIA y ActRIIB [31], presentando todos los componentes requeridos para la señalización BMP-9. Asimismo, la línea celular humana de HCC HLE también expresa ALK1, que contribuye a la señalización de BMP-9 en estas células [32].

Además de los hepatocitos, las células no parenquimatosas parecen responder también a BMP-9 pues las HSCs expresan ALK1 y son sensibles a esta citoquina en términos únicamente de la fosforilación Smad1 [1].

Ya hay presentes cantidades relativamente altas de BMP-9 en el hígado sano donde ayuda a estabilizar los vasos existentes. Con el daño crónico los hepatocitos pueden sufrir transformación maligna produciendo altas cantidades de BMP-9 que regulan a la baja los contactos entre célula-célula en las células peri-tumorales e inducen la transición epitelial a mesenquimal (EMT) en células cancerígenas, hecho que demostraron *Li et al.* en un estudio que mostraba la implicación de la vía de señalización BMP-9/ALK1/Smad1 en la EMT y mediante marcadores como la inducción del gen Snail y la reducción de E-Cadherina [32].

De este modo, se promueve la formación de metástasis (**figura 4**). Como consecuencia de la inducción de EMT por BMP-9 se producen cambios en el fenotipo de las células del HCC HepG2 y HLE *in vitro*.

BMP-9 presenta también efectos proliferativos y anti-apoptóticos en células de HCC como muestran los datos obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro*, sugiriendo un incremento de la

producción de BMP-9 en estas células y mejorando el crecimiento celular gracias al bucle autocrino que tiene lugar en el hígado [1].

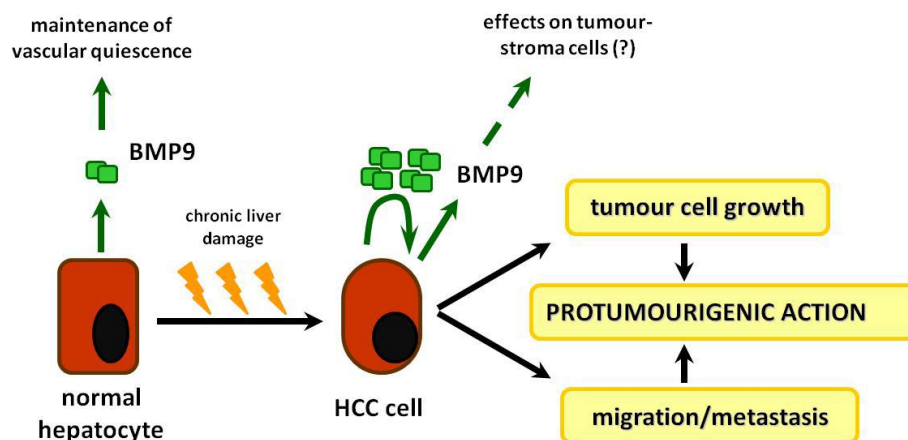


Figura 4: Comparación entre el efecto desencadenado por BMP-9 en hepatocitos normales y en células de HCC¹

Los datos obtenidos en un estudio realizado por *Herrera et al. (2013)* sobre la línea celular de HCC HepG2 revelaron un doble rol para BMP-9, tanto en la inducción de una respuesta proliferativa en las células de HCC, hecho que no se observó en hepatocitos normales, así como ejerciendo una notable función anti-apoptótica en las células HepG2, lo que resultaba en un fuerte efecto de BMP-9 sobre el crecimiento en células de cáncer de hígado. Junto a ello, se demostró que la expresión de BMP-9 se incrementaba en el 43% de los tejidos de HCC humano en comparación con hígado humano no neoplásico como lo reveló el análisis de inmunohistoquímica, lo que sugirió que la señalización BMP-9 puede ser relevante durante la hepatocarcinogénesis in vivo.

García-Álvaro et al. (2015) realizaron un experimento en el que se descubrió mediante Western Blotting usando anticuerpos frente a la formas fosforiladas (activas) de MAPK (ERK, p38 y JNK) que BMP-9 podía desencadenar otras vías de señalización no Smad implicadas en el proceso cancerígeno mostrándose que la activación de la vía p38MAPK inducida por BMP-9 era necesaria para el efecto de crecimiento en células HepG2. Además, la inhibición de esta vía abolió la regulación de BMP-9 sobre los niveles de RNAm de Bim, Puma y Bax, miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 (reguladores clave de la

apoptosis), lo que demostró que p38MAPK media la actividad de supervivencia dependiente de BMP-9 en la inactivación-activación de la apoptosis en suero en células HepG2.

5.5. Estrategias terapéuticas

Fibrosis hepática:

El tratamiento de HSCs con el compuesto herbario 861 (**Cpd 861**) dio como resultado la supresión de la expresión de ALK1, dando lugar a la disminución en componentes clave de la ECM, tales como colágeno tipo III y α SMA, así como a un aumento de la expresión de metaloproteinasa de matriz 1 (MMP1), miembro de un grupo de enzimas que pueden descomponer las proteínas, como el colágeno, y que participan en la angiogénesis y la metástasis de las células tumorales. Por lo que, Cpd 861 manifestó una actividad anti-fibrótica [2].

HCC:

Los mecanismos moleculares que subyacen en el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos en los tumores han sido un área de estudio intenso que han llevado al desarrollo de varias terapias como Bevacizumab (un anticuerpo antiVEGF), inhibidores de receptores tirosina quinasa tales como Sunitinib, Sorafenib e Imatinib o antagonistas de BMPs como Chordin, Noggin y Dorsomorphina.

El HCC es un tumor hipervascularizado y, como ya se ha mencionado, es elevada la expresión de ALK1 en los vasos sanguíneos del tumor hepático, hechos que hacen que la inhibición de este receptor de tipo I sea una buena estrategia terapéutica. Una forma de hacerlo es interfiriendo en la vía BMP-9/BMP-10/ALK1 mediante **Dalantercept** (ACE-041), fármaco que mostró una actividad antitumoral prometedora en pacientes con cáncer refractario avanzado de diversos orígenes incluyendo el de hígado. Se trata de un receptor soluble proteico de fusión constituido por el dominio extracelular de ALK1 humano unido a la porción Fc de IgG1 humana.

Dado que BMP-9, a diferencia de otros miembros de la superfamilia TGF- β , se une primero al receptor de tipo I en la cascada de señalización, se diseñó una forma soluble de ALK1 que solo neutralizaba a BMP-9 (y BMP-10) y no al resto de citoquinas, lo que implicaba que las propiedades neo-angiogénicas de BMP-9 tuvieran una relevancia fundamental en la formación de tumores in vivo [1].

Acceleron Pharma encontró otra proteína de fusión **ALK1-Fc** en el desarrollo clínico demostrando ser útil para perjudicar el crecimiento tumoral y la angiogénesis [35]. También

Pfizer desarrolló un anticuerpo humano monoclonal frente a ALK1 (**PF-3446962**) que mostró una gran eficacia para la terapia antiangiogénica del cáncer [36].

Por último, *Jung et al. (2016)* en un estudio publicado recientemente, probaron el efecto de crecimiento de una BMP-9 recombinante humana denominada **MB109** en quince tejidos de HCC, de tal forma que inhibió la proliferación de nueve de los tejidos *in vitro*. Además se observó que el tratamiento prolongado con esta molécula conducía a la supresión en la expresión de cinco genes marcadores en células madre de cáncer de hígado. Todo ello hace que MB109 sea una terapia biológica anti-tumoral prometedora.

6. CONCLUSIONES

En la actualidad, la frecuencia de patologías graves que afectan al hígado como son la fibrosis y el HCC constituyen una causa de trasplantes y cirugías entre otros tratamientos invasivos que pueden ser peligrosos y tener consecuencias sobre la salud de los pacientes. Además, el aumento de la incidencia y mortalidad del HCC en la última década, siendo en el ranking el tercer cáncer del mundo más devastador, hace que se convierta en una enfermedad muy preocupante y de alto interés para desarrollar nuevas investigaciones y estrategias de tratamiento.

Por ello, el descubrimiento de nuevos mecanismos de señalización implicados en estas alteraciones hepáticas, como el de la proteína BMP-9, están siendo prometedores como dianas terapéuticas al incidir en distintos puntos de la cascada de señalización.

Para concluir, cabe destacar que a pesar de haber progresado con el desarrollo de compuestos con actividad anti-fibrótica, fármacos antitumorales y anticuerpos neutralizantes anti-ALK1, aún son necesarias investigaciones más exhaustivas y un mayor número de estudios para recabar mayor información sobre la proteína BMP-9 como diana farmacológica y su aplicación frente a estas patologías del hígado, órgano imprescindible para el organismo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Herrera B, Dooley S, Breitkopf-Heinlein K. Potential roles of bone morphogenetic protein (BMP)-9 in human liver diseases. **Review** 2014 Mar; [Pubmed]
- [2] Bi J, y Shengfang Ge S. Potential Roles of BMP9 in Liver Fibrosis. **Review** 2014 Nov; [Pubmed]
- [3] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007; 132:2557-2576.
- [4] Feng GS (2012) Conflicting roles of molecules in hepatocarcinogenesis: paradigm or paradox. *Cancer Cell* 21: 150–154.
- [5] Bruix J, Gores GJ, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. *Gut*. 2014; 63:844-855.
- [6] Lau WY LE. Hepatocellular carcinoma: Current management and recent advances. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2008; 7:237-257.
- [7] Song JJ, Celeste AJ, Kong FM, Jirtle RL, Rosen V, Thies RS (1995) Bone morphogenetic protein-9 binds to liver cells and stimulates proliferation. *Endocrinology* 136:4293–4297
- [8] Cunha SI, y Pietras K. ALK1 as an emerging target for antiangiogenic therapy of cancer. **Review** 2011 Apr; [Pubmed]
- [9] Wharton K. & Derynck R. (2009) TGF beta family signaling: novel insights in development and disease. *Development* 136: 3691-3697.
- [10] Herrera B, Sánchez A, Fabregat I. BMPS and liver: more questions than answers. 2012 Mar; [Pubmed]
- [11] David L, Feige JJ, Bailly S (2009) Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Review* 20:203–212
- [12] Conidi A, Cazzola S, Beets K, Coddens K, Collart C, et al. (2011) Few Smad proteins and many Smad-interacting proteins yield multiple functions and action modes in TGFbeta/BMP signaling in vivo. *Cytokine Growth Factor Review* 22: 287–300.
- [13] Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P (2009) Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Review* 20: 343–355.
- [14] Thawani JP, Wang AC, Than KD, Lin CY, La Marca F, et al. (2010) Bone morphogenetic proteins and cancer: **Review** of the literature. *Neurosurgery* 66: 233–246; discussion 246.
- [15] Singh A, Morris RJ (2010) The Yin and Yang of bone morphogenetic proteins in cancer. *Cytokine Growth Factor Review* 21: 299–313.

- [16] Kobayashi A, Okuda H, Xing F, Pandey PR, Watabe M, et al. (2011) Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem like cells in bone. *J Exp Med* 208: 2641–2655.
- [17] Maegdefrau, U.; Bosserhoff, A.K. BMP activated Smad signaling strongly promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Exp. Mol. Pathol.* 2012, 92, 74–81.
- [18] Bidart M, Ricard N, Levet S, Samson M, Mallet C, David L, Subileau M, Tillet E, Feige JJ, Bailly S. BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. 2011 Jun; [Pubmed]
- [19] Department of Vascular Biology and Tumor Angiogenesis (CBTM), Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany
- [20] Department of Molecular Cell Biology and Centre for Cancer Genomics, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands.
- [21] Yao, Y.; Jumabay, M.; Ly, A.; Radparvar, M.; Wang, A.H.; Abdmaulen, R.; Bostrom, K.I. Crossveinless 2 regulates bone morphogenetic protein 9 in human and mouse vascular endothelium. *Blood* 2012, 119, 5037–5047.
- [22] Seemann, P.; Brehm, A.; Konig, J.; Reissner, C.; Stricker, S.; Kuss, P.; Haupt, J.; Renninger, S.; Nickel, J.; Sebald, W.; et al. Mutations in GDF5 reveal a key residue mediating BMP inhibition by NOGGIN. *PLoS Genet.* 2009, 5, e1000747.
- [23] Zhao, Y.F.; Xu, J.; Wang, W.J.; Wang, J.; He, J.W.; Li, L.; Dong, Q.; Xiao, Y.; Duan, X.L.; Yang, X.; et al. Activation of JNKs is essential for BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *BMB Rep.* 2013, 46, 422–427.
- [24] Zhao, Y.; Song, T.; Wang, W.; Wang, J.; He, J.; Wu, N.; Tang, M.; He, B.; Luo, J. P38 and ERK1/2 MAPKs act in opposition to regulate BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *PLoS One* 2012, 7, e43383.
- [25] M. Zeisberg, R. Kalluri, Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organspecific mechanisms associated with tissue fibrosis, *Am J Physiol Cell Physiol* 304(3) (2013) C216-25.
- [26] F.J. Lopez-Hernandez, J.M. Lopez-Novoa, Role of TGF-beta in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects, *Cell Tissue Res* 347(1) (2012) 141-54.
- [27] H. Abe, T. Tominaga, T. Matsubara, N. Abe, S. Kishi, K. Nagai, T. Murakami, T. Araoka, T. Doi, Scleraxis modulates bone morphogenetic protein 4 (BMP4)-Smad1 protein-smooth muscle alpha-actin (SMA) signal transduction in diabetic nephropathy, *J Biol Chem* 287(24) (2012) 20430-42.

- [28] M. Zeisberg, J. Hanai, H. Sugimoto, T. Mammoto, D. Charytan, F. Strutz, R. Kalluri, BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury, *Nat Med* 9(7) (2003) 964-8.
- [29] Y.L. Yang, H.Z. Ju, S.F. Liu, T.C. Lee, Y.W. Shih, L.Y. Chuang, J.Y. Guh, Y.Y. Yang, T.N. Liao, T.J. Hung, M.Y. Hung, BMP-2 suppresses renal interstitial fibrosis by regulating epithelial-mesenchymal transition, *J Cell Biochem* 112(9) (2011) 2558-65.
- [30] Muñoz-Félix JM, Cuesta C, Perretta-Tejedor N, Subileau M, López-Hernández FJ, López-Novoa JM, Martínez-Salgado C. Identification of bone morphogenetic protein 9 (BMP9) as a novel profibrotic factor in vitro. *Sep*, 2016.
- [31] David, L.; Mallet, C.; Keramidas, M.; Lamande, N.; Gasc, J.M.; Dupuis-Girod, S.; Plauchu, H.; Feige, J.J.; Bailly, S. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ. Res.* 2008, *102*, 914–922.
- [32] Li, Q.; Gu, X.; Weng, H.; Ghafoory, S.; Liu, Y.; Feng, T.; Dzieran, J.; Li, L.; Ilkavets, I.; Kruihof-de Julio, M.; *et al.* Bone morphogenetic protein-9 (BMP-9) induces epithelial to mesenchymal transition (EMT) in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci.* 2013, *104*, 398–408.
- [33] Herrera B, García-Álvaro M, Cruz S, Walsh P, Fernández M, Roncero C, Fabregat I, Sánchez A, e Inman GJ. BMP9 is a proliferative and survival factor for human hepatocellular carcinoma cells. 2013 Jul; [Pubmed]
- [34] García-Álvaro M, Addante A, Roncero C, Fernández M, Fabregat I, Sánchez A, y Herrera B. BMP9-Induced Survival Effect in Liver Tumor Cells Requires p38MAPK Activation. 2015 Aug; [Pubmed]
- [35] Cunha SI, Pardali E, Thorikay M. *et al.* Genetic an pharmacological targeting of activin receptor-like kinase I impairs tumor growth an angiogenesis *J Exp Med* 2010; 207: 85-100-
- [36] Hu-Lowe DD, Chen E, Zhan L, *et al.* Targeting activin receptor-like kinase I inhibits angiogenesis and tumorigenesis trough a mechanism of action complementary to anti-VEGF therapies *Cancer Res* 2011; 71:1362-73.
- [37] Jung JW, Yoon SM, Kim S, Jeon YH, Yoon BH, Yang SG, Kim MK, Choel S, Kuo MMC. Bone morphogenetic protein-9 is a potent growth inhibitor of hepatocellular carcinoma and reduces the liver cancer stem cells population. 2016 Sept; [Pubmed]