



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

Fibrosis hepática y BMPs

Autor: Rosa Delgado Jiménez

Tutor: Blanca Herrera González

Convocatoria: Junio 2018

1. RESUMEN

La fibrogénesis hepática se define como un complejo y dinámico proceso fisiopatológico caracterizado por el depósito de tejido fibroso en el hígado como consecuencia de un desequilibrio entre la producción y la degradación de los componentes de la MEC en respuesta a varias agresiones repetitivas o crónicas de intensidades suficientes para conducir a este proceso de cicatrización.

En la actualidad las estrategias terapéuticas se basan en la eliminación del agente causal y en última instancia, trasplante hepático, con el impacto sanitario que ello conlleva.

Recientemente el conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo de la fibrosis hepática ha abierto las puertas a nuevas estrategias terapéuticas necesarias.

En este contexto de búsqueda de dianas terapéuticas se encuadra la familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMP) debido a su reciente relación con diversos procesos fisiológicos hepáticos, siendo especialmente prometedor el efecto protector frente a la fibrosis de BMP-7 descrito por numerosos estudios.

Las BMPs son factores de crecimiento multifuncionales que pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TFG β). Es debido a esta similitud estructural que se ha postulado el mecanismo antifibrótico de BMP-7, que actuaría como antagonista de la señalización de TFG β , un conocido inductor de fibrosis en tejidos, evitando la activación de distintos tipos celulares a miofibroblastos, principales responsables del mantenimiento y evolución fibrótica. Distintos experimentos in vivo e in vitro empleando BMP-7 recombinante han demostrado una cierta reversión del grado de fibrosis. Sin embargo, su posible efecto antifibrótico no está libre de controversia. Es necesario llevar a cabo más estudios que despejen las dudas sobre su potencial efecto protector en la fibrosis así como el papel que ejerce a lo largo del proceso, para poder realizar ensayos clínicos en un futuro que permitan utilizar BMP7 como agente antifibrótico.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Histología del hígado:

El hígado es la glándula más grande del organismo. Se localiza en el cuadrante superior izquierdo de la cavidad abdominal, protegido por la parrilla costal.

El hígado desempeña un papel importante en la captación, almacenamiento y distribución de sustancias nutritivas y vitaminas que circulan el torrente sanguíneo. También mantiene la concentración sanguínea de glucosa y regula las concentraciones circulantes de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Además, el hígado está implicado en el metabolismo y degrada o conjuga muchos fármacos y sustancias tóxicas, pero puede ser abrumado por estas sustancias y sufrir lesiones. También es un órgano exocrino, produce la bilis que contiene sales biliares, fosfolípidos y colesterol. Por último, el hígado desempeña funciones de tipo endocrino importantes, como la síntesis de proteínas.

Se encuentra anatómicamente dividido por surcos profundos en dos grandes lobulillos (derecho e izquierdo) y dos pequeños (cuadrado y caudado).

La forma tradicional y más gráfica de describir la estructura del hígado es la del lobulillo hepático clásico. Tiene forma hexagonal y está constituido por cordones de hepatocitos dispuestos de manera radial alrededor de la vena centrolobulillar. Entre los cordones se localizan los sinusoides hepáticos que desembocan en la vena centrolobulillar. El parénquima hepático lo conforman los hepatocitos que representan aproximadamente el 80% del hígado. Tienen una vida media de 5 meses y además poseen una capacidad de regeneración considerable cuando la sustancia hepática se pierde por procesos tóxicos, enfermedades o cirugía.

Los sinusoides hepáticos forman canalículos vasculares que discurren entre los cordones de hepatocitos. Están revestidos por un delgado epitelio discontinuo y poroso y el espacio que separa el endotelio de los hepatocitos se denomina espacio de Disse. En este espacio penetran las microvellosidades de los hepatocitos permitiendo un intercambio directo de sustancias con la sangre. En los sinusoides hepáticos podemos encontrar diferentes tipos celulares:

- Células de Kupffer, son macrófagos procedentes de los monocitos sanguíneos. Se sitúan en numerosos lugares a lo largo de los sinusoides emitiendo en muchas ocasiones pseudópodos que penetran en el espacio de Disse. Están especializados en la fagocitosis de eritrocitos envejecidos y reciclaje del hierro e intervienen en la modulación de la respuesta inmune y la respuesta inflamatoria mediante la producción de mediadores químicos.
- Células de estrelladas hepáticas, comúnmente denominadas células de Ito, se localizan en el espacio de Disse y se caracterizan por ser el principal depósito de vitamina A en forma de inclusiones lipídicas en su citoplasma. En algunas patologías hepáticas, las

células estrelladas hepáticas pierden su capacidad de almacenar vitamina A y lípidos y se diferencian en células con las características de miofibroblastos. Estas células parecen desempeñar un papel importante en la fibrogénesis hepática; sintetizan y depositan colágeno tipo I y tipo III dentro del espacio perisinusoidal. Además contienen en su citoplasma elementos contráctiles como filamentos de actina a que durante la contracción celular reducen el lumen de los sinusoides lo cual conduce a la hipertensión portal.

- Células natural killer son linfocitos granulados que destruyen células alteradas, como células tumorales o células infectadas por virus.

La fibrosis hepática es un proceso complejo y regulado de reparación tisular del hígado ante un daño hepatocelular mantenido, y en el que intervienen de manera activa diversos tipos celulares y citocinas profibrogénicas. Durante el proceso se produce un depósito de proteínas de la MEC (matriz extracelular), en su mayoría colágeno no fibrilar, así como una respuesta inflamatoria. Tras un daño hepático agudo, las células parenquimatosas del hígado, los hepatocitos, se regeneran y sustituyen el tejido necrótico restableciendo la arquitectura hepática normal. Sin embargo, si el daño hepático es mantenido la producción de MEC aumenta y se deposita de manera desorganizada en el intersticio y espacio de Disse.

Generalmente, la fibrosis hepática se produce como una respuesta a la lesión hepatocelular crónica provocada por el abuso de bebidas alcohólicas, infecciones crónicas, enfermedades biliares, entre otras, y puede llegar a conducir a largo plazo al desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular (1).

La fuente principal de ese tejido fibroso son las células mesenquimales estrelladas del hígado (CEH o HSC, hepatic stellate cells) (2). Estas células son activadas en respuesta a mediadores químicos, perdiendo su capacidad de almacenar vitamina A en el citoplasma, y transdiferenciándose en un fenotipo celular contráctil con capacidad para proliferar y secretar proteínas de la matriz. Este nuevo tipo celular denominado miofibroblasto es el principal responsable de la progresión y mantenimiento de la fibrosis así como del desarrollo de la hipertensión portal (1,2). Sin embargo, hay una evidencia creciente de que las HSCs no son los únicos precursores de miofibroblastos. Se postula que pueden originarse a partir de otras células como fibroblastos portales, células derivadas de medula ósea así como por transición de las células del epitelio a mesenquimales (3,4)

Este trabajo se centra en dos mecanismos importantes en el desarrollo y mantenimiento de la fibrosis en el hígado: la activación de las HSCs, dado que es la fuente principal y más estudiada de miofibroblastos en fibrosis hepática y la transición de células epiteliales a mesenquimales por su relación con BMP-7, desarrollado con más detalle a continuación.

TGF β es uno de los más importantes y potentes mediadores profibrogénicos. Pertenece a una familia de péptidos multifuncionales llamada superfamilia del TGF β , que integra más de 30 citocinas, entre las que se encuentran además las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs). La familia de TGF β ejerce un papel esencial en la regulación de diferentes procesos celulares, incluyendo proliferación, diferenciación, migración y muerte celular, y por tanto su acción es fundamental en la homeostasis de tejidos y órganos. Ejercen sus acciones a través de una familia de receptores membranosos tipos I y II tipo serina/treonina quinasa. En el proceso fibrótico se conoce que TGF β produce la activación de las HSC a miofibroblastos e induce la apoptosis de hepatocitos, mayoritariamente mediante rutas de señalización dependientes de Smad. (6)

La fibrosis es un proceso potencialmente reversible (7,4). La eliminación del agente causal en diversos modelos experimentales de hepatopatía crónica se asocia a la regresión de la fibrogénesis. No obstante, ello depende principalmente de la causa subyacente y la severidad de la enfermedad. (4) Actualmente, el repertorio terapéutico en el tratamiento de fibrosis hepática es muy limitado: eliminar el estímulo que provoca el daño hepatocelular (erradicación de la infección vírica) y trasplante hepático en última instancia, lo que supone un impacto económico a nivel sanitario muy importante. Una de las claves en la búsqueda de estrategias terapéuticas es un mayor conocimiento de los tipos celulares implicados y los mecanismos envueltos en la progresión de la fibrosis. Debido a su importancia en el desarrollo y mantenimiento de la fibrosis, la inhibición de TGF β es una prometedora diana terapéutica.

Las BMPs son citoquinas multifuncionales de la superfamilia de TGF β . Fueron descubiertas inicialmente por su capacidad de regular la formación ósea y de cartílagos, pero actualmente se conoce que desempeñan numerosas funciones de regulación de procesos en el organismo (8,9). Recientemente, algunos experimentos han demostrado que las BMPs actúan en el hígado desempeñando diversas funciones y están implicadas en el proceso fibrótico. Este trabajo se centra en la relación de las BMPs con el desarrollo de la fibrosis hepática. En concreto en el prometedor efecto profibrótico de BMP-7 que

se ha observado en múltiples estudios con modelos de fibrosis en distintos tejidos. Se ha postulado que ejerce su efecto protector antagonizando la señalización de TGF β vía rutas dependientes de Smad (10). En esta revisión se pretende relacionar los mecanismos principales implicados en la fibrosis hepática con la acción antifibrótica de BMP-7, con objeto de analizar su posible uso como agente antifibrótico.

3. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre los mecanismos implicados en la fibrosis hepática y como el papel de las BMP, en especial el de BMP-7, supone una interesante estrategia terapéutica en su relación con la progresión de la patología fibrótica.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de artículos científicos, revisiones y libros de fisiología con objeto de recabar la información centrada en fibrosis hepática y BMP

Al comienzo se realizó una búsqueda en Google Chrome introduciendo las palabras clave "fibrosis hepática", "BMPs" e "histología hepática", con objeto de formar una idea general sobre el tema propuesto en nuestro estudio y centrar los objetivos principales.

Seguidamente, se profundizó en el tema de fibrosis hepática y nuevos mecanismos consultando en la base de datos Pubmed, en la que se introdujo "Mecanismos en fibrosis hepática", "Fibrosis hepática y BMPs", "Señalización de BMPs" de los que se seleccionó aquellos más recientes, y se descartaron aquellos que tras su lectura, no guardaban relación o no aportaban información adicional.

Finalmente, tras revisar numerosos artículos seleccionados que avalaban la relación entre BMPs y fibrosis hepática, explicando el mecanismo implicado y su relación con la fibrosis, se procedió a establecer los puntos de interés sobre los que se ha desarrollado este trabajo de revisión bibliográfica.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 BMPs:

Las proteínas morfogenéticas óseas o Bone morphogenetic proteins (BMPs) son citoquinas multifuncionales que pertenecen a la superfamilia de factores de crecimiento transformantes (TGF- β), y constituyen la subfamilia más numerosa. La subfamilia de las

BMPs está clasificada en 4 subgrupos basados en la homología de sus secuencias peptídicas: BMP2 y 4 , BMP5/6/7/ 8a/ 8b, BMP9/ 10, and BMP12/ 13/ 14. BMP1 es una metaloproteasa y no se considera miembro de la familia (9).

Las BMPs deben su nombre a que fueron descubiertas por su capacidad de dirigir la formación de hueso y cartílago, así como por su función reguladora del crecimiento y diferenciación de condroblastos y osteoblastos in vitro (11).

Desde entonces, se ha demostrado que afectan a un elevado número de tipos celulares y procesos que van más allá de la osteogénesis. Se ha probado su implicación en la embriogénesis y primeras etapas del desarrollo embrionario donde actúan como morfogenes dirigiendo el crecimiento diferenciación y apoptosis celular (12,13).

Recientemente se ha descubierto un nuevo papel de las BMPs en la regulación de la homeostasis en tejidos adultos (14). Dada su importancia como molécula de señalización en la regulación del organismo, la deficiencia en la producción de BMPS conduce a severas patologías y malformaciones (9).

5.1.1. Síntesis de BMPs

Las BMPs se sintetizan como precursores con un péptido señal N-terminal, un pro-dominio y un péptido maduro C-terminal (9). Son procesados por proteasas de serina que hidrolizan el prodominio proteico de la cadena dando lugar a las proteínas maduras. Se ha postulado que el pro-dominio queda unido de forma no covalente al péptido maduro ya secretado (9). Pese a ser secretado como péptido soluble, éste pro-dominio establece interacciones con las microfibrillas de la matriz extracelular haciendo que la proteína quede retenida. Sin embargo, no queda claro el tipo de unión con el pro-dominio así como su retención en la matriz extracelular.

Todos los miembros de la subfamilia comparten secuencias similares incluyendo 7 residuos de cisteína localizados en la región madura de las proteínas (9). Gran parte de las BMP maduras se encuentran formando homodímeros por puente disulfuro sin embargo se ha probado la existencia de heterodímeros de BMPs como en el caso de BMP-4 y BMP-7, un potente inductor del mesodermo (15).

5.1.2. Rutas de señalización de BMPs

Las BMPS actúan mediante rutas de señalización celular dependientes de Smad (convencional) y rutas independientes de Smad (no convencionales) que afectan a la

transcripción génica. Los receptores de BMPs son receptores de tipo serina/treonina quinasa, que son de dos tipos: tipo I y tipo II (9). Ambos están constituidos por un dominio extracelular, corto, un único dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad de serina/treonina quinasa. Sin embargo, el receptor tipo I presenta una región rica en residuos de glicina y serina (dominio GS). Tras unirse el ligando al receptor, este se dimeriza, formando un complejo heterotetramérico que comprende dos dímeros del receptor tipo I y dos receptores tipo II. El mecanismo de la formación del heterotetramero puede variar, según la afinidad del ligando al tipo de receptor, como ejemplo BMP2 o BMP-4 se unen preferentemente al tipo I, mientras que BMP-6 y BMP-7 se unen al tipo II (9).

Se conocen un total de cinco receptores tipo I para BMPs: receptor de activina tipo quinasa, ALK1, ALK2, ALK3, ALK4, ALK6, (17,9) y tres receptores tipo II que interaccionan con BMPs: BMPR-2, ActR-2A y ActR-2B. Solo el receptor BMPR-2 es específico para BMPs, el resto de receptores también interaccionan con otras moléculas de señalización de la superfamilia TGF- β (9).

En la ruta convencional, tras formarse el complejo heterotetramérico el receptor tipo II que es activo constitutivamente transfosforila el dominio GS del receptor (8,9). Esto activa al receptor tipo I que es capaz de fosforilar a su sustrato inmediato, las proteínas citosólicas R-Smad (Smad reguladas por receptor). Las R-Smad implicadas en la ruta de señalización de BMPs son Smad1, Smad5 y Smad8 (8,9). Sin embargo, algunas BMPs también pueden activar Smad2 y Smad3 debido a su capacidad de unirse a receptores de TGF β (9). Una vez fosforiladas, las R-Smad se asocian con el co-mediador (co-Smad) Smad4, formando un complejo que se transloca al núcleo donde actúa como un factor de transcripción que regula la expresión de determinados genes diana, al unirse a secuencias de unión de Smad o secuencias ricas en GC en la región promotora. (9)

Para hacer efectiva su unión a la región promotora necesita de la interacción con cofactores presentes en el núcleo, que pueden ser activadores o represores y regulan la expresión génica. Estos cofactores nucleares se unen a Smad y modifican la regulación de estos genes según el contexto celular (9). Por tanto, para ejercer como factor de transcripción las proteínas Smad necesitan interaccionar con cofactores y otras moléculas coactivadoras, que facilitan el inicio de la transcripción como p300, CBP, y p300/factor asociado a CBP (P/CAF) (18,19).

La ruta de señalización dependiente de Smad afecta a varias etapas celulares incluyendo el crecimiento, diferenciación y apoptosis celular.

Las BMPs además activan rutas no convencionales independientes de Smad, que están asociadas a una estrecha regulación de una respuesta celular en un tipo celular muy específico. (20) Algunas de estas rutas han sido identificadas como por ejemplo, la activación por BMP-4 de TAK-1, una serina/treonina quinasa de la familia de MAPK (Mitogen-Activated protein Kinases) como p38, ERK y JNK, así como PI3/Akt (ruta de señalización implicada en el ciclo celular) y otras, que conforman una compleja red de señalización molecular que regula multitud de procesos del organismo.(21) Sin embargo, cabe destacar que los mecanismos específicos implicados en la activación de las rutas no convencionales vía BMPs son diversos y muy poco conocidos.

➤ **Regulación de la señalización**

La señalización celular de BMPs se encuentra ampliamente regulada por moduladores intracelulares, de membrana y extracelulares (22). Se conocen unos 15 antagonistas para BMPs clasificados en tres subfamilias según en el tamaño del nudo de cisteína (9). Además las proteínas presentes en la matriz extracelular o membrana celular, como la fibrinila o el colágeno tipo IV, pueden interaccionar con las BMPs y modular su actividad. (23). La señalización de BMPs está también regulada por co-receptores y receptores "señuelo" que se encuentran en la superficie celular. Los co-receptores se unen a BMP y a su receptor primario, potenciando o inhibiendo su señalización (9). Entre los co-receptores que actúan potenciando la señalización de BMP se encuentra la familia de proteínas DRAGON, receptores tirosina quinasa como c-Kit y MusK y los co-receptores endoglina y betaglicano (9). Los receptores señuelo como proteína transmembrana BAMBI regulan negativamente la señalización de BMPs, compitiendo con los receptores por su unión con el ligando, impidiendo que se inicie la señalización. (9). Otra forma de regular la función de las BMPs, es mediante ubiquitin-ligasas, enzimas que marcan a los receptores de BMPs y las proteínas Smad para ser degradadas (8).

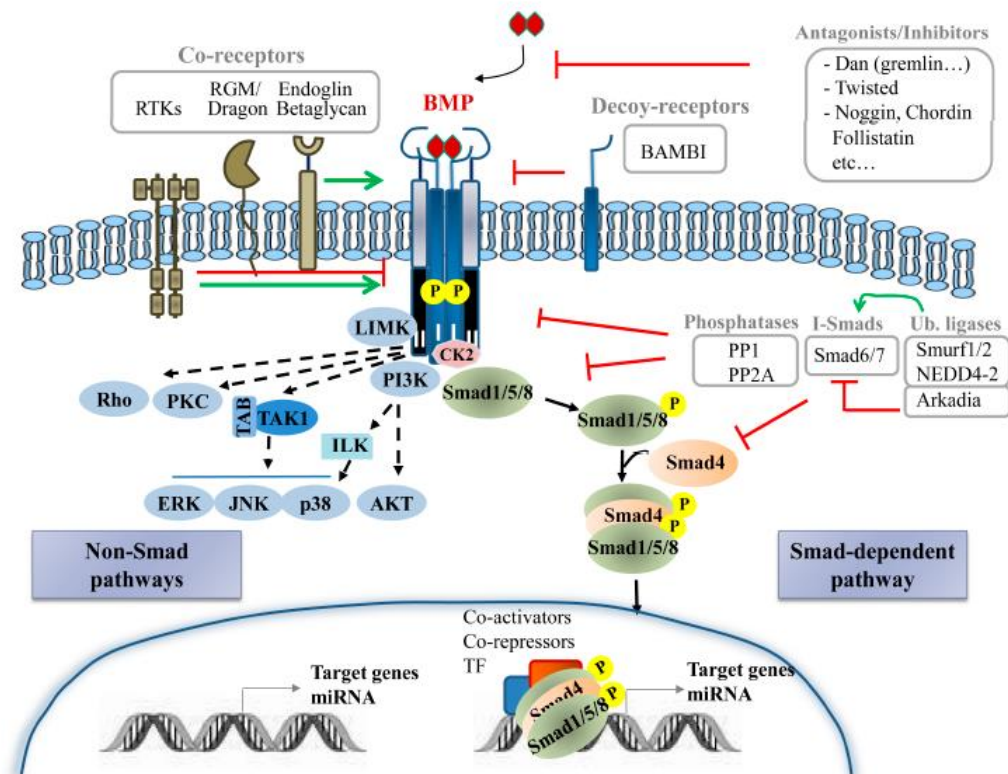


Figura 1. Rutas de señalización de BMPs y principales reguladores (8).

Como conclusión, la señalización de las BMPs es un proceso finamente regulado por diversas moléculas presentes tanto en el medio intra como extracelular, y se encuentra supeditado al contexto y tipo celular.

5.2 Fibrosis hepática: mecanismos implicados.

Como se ha explicado anteriormente, la fibrosis hepática es un proceso complejo y regulado de reparación tisular del hígado ante un daño hepatocelular mantenido, y en el que intervienen de manera activa diversos tipos celulares y citocinas profibrogénicas. Durante el proceso se produce un depósito de proteínas de la MEC (matriz extracelular), en su mayoría colágeno no fibrilar, así como una respuesta inflamatoria. Tras un daño hepático agudo, las células parenquimatosas del hígado, los hepatocitos, se regeneran y sustituyen el tejido necrótico restableciendo la arquitectura hepática normal. Sin embargo, si el daño hepático es mantenido la producción de MEC aumenta, mayoritariamente colágeno fibrilar, fibronectina y diversos glucosaminoglicanos, y se deposita de manera desorganizada en el intersticio y espacio de Disse sustituyendo a la población de hepatocitos (10). Generalmente, la fibrosis hepática se produce como una respuesta a la lesión hepatocelular crónica provocada por el abuso de bebidas alcohólicas, infecciones

crónicas, enfermedades biliares, entre otras, y puede llegar a conducir a largo plazo al desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular (1).

En el contexto de fibrosis hepática el principal tipo celular involucrado en el desarrollo y mantenimiento de la fibrosis son los miofibroblastos (4). Tras el daño hepático se desencadena una serie de reacciones cuyo objetivo en última instancia es la reparación tisular. Los hepatocitos dañados liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros mediadores fibrogénicos que inducen el reclutamiento de células inflamatorias (3). Se produce la infiltración de linfocitos, células polimorfonucleares, mayoritariamente células de Kupffer y macrófagos periféricos, y plaquetas en el parénquima hepático. Estos macrófagos activados sintetizan y liberan numerosos mediadores profibrogénicos y proinflamatorios como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TGF β 1, factor de necrosis tumoral (TNF α), IL-1 entre otras (4) Además los hepatocitos dañados contribuyen al estado de inflamación y fibrosis con la producción de ROS y mediadores reactivos relacionados con el estrés celular (3,4). También contribuyen las plaquetas y células natural killer como fuente de factores de crecimiento y demás citoquinas proinflamatorias, agentes vasoactivos como NO y endotelina-1 (3,4). Como resultado de la síntesis y liberación de gran cantidad de mediadores al medio hepático, se produce la activación de distintos tipos celulares y su transdiferenciación a miofibroblastos (4). Los miofibroblastos son los principales responsables celulares del mantenimiento y progresión de la fibrosis: proliferan y secretan proteínas de la MEC, produciendo un aumento excesivo de su depósito en el parénquima hepático y la remodelación de la matriz, además modulan la respuesta inmune mediante la liberación de citoquinas (4).

5.2.1 Activación de HSCs en la fibrosis hepática

La fuente principal de miofibroblastos son las células mesenquimales estrelladas del hígado (CEH o HSC, *hepatic stellate cells*) (1,3,4). Estas células son activadas en respuesta a los mediadores químicos, perdiendo su capacidad de almacenar vitamina A en el citoplasma, y transdiferenciándose en un fenotipo tipo miofibroblasto contráctil con capacidad para proliferar y secretar proteínas de la matriz. Sin embargo, hay una evidencia creciente de que las HSC no son los únicos precursores de miofibroblastos (3,4). Se postula que pueden originarse a partir de otras células como fibroblastos portales, células derivadas de medula ósea así como por transición de las células del epitelio a mesenquimales (3,4,24).

En este trabajo nos centramos en la activación de HSC a miofibroblastos por ser el mecanismo más relevante en la fibrosis hepática y en la transición de células epiteliales a mesenquimales (EMT) debido a su relación con BMP-7.

La activación de HSC se produce por diversos factores de crecimiento (TGF- β , PDGF) sustancias vasoactivas (trombina, angiotensina II y endotelina-1), citocinas (MCP-1, RANTES) y adipocinas (leptina) (2). En cambio, diversas citocinas (IFN- α , IGF, adiponectina) y sustancias vasodilatadoras (óxido nítrico, relaxina) son potentes inhibidores de la activación de las HSC (2).

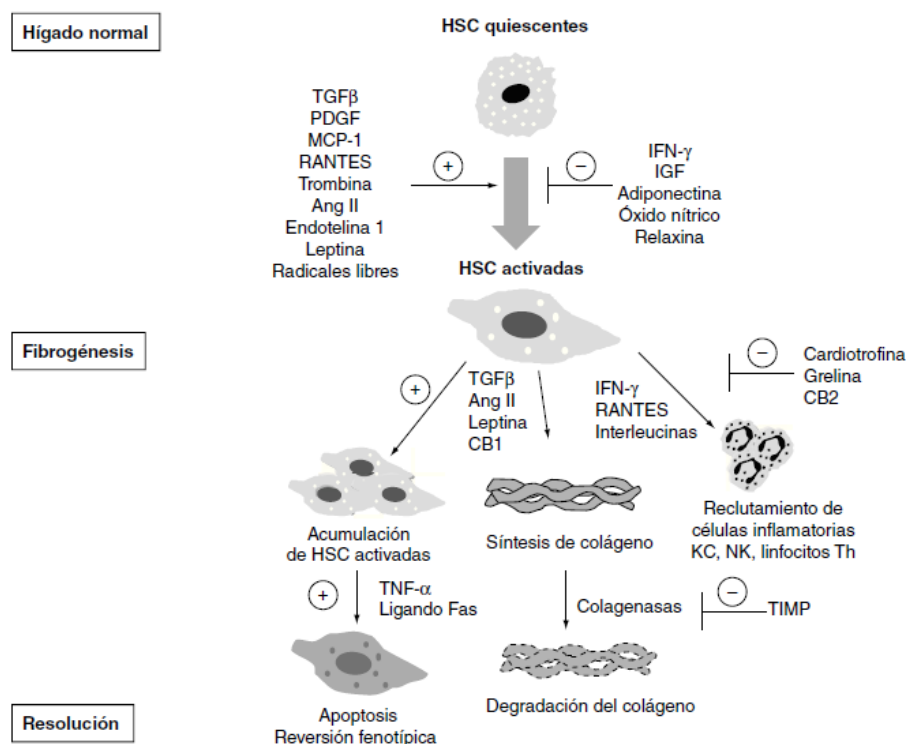


Figura 2. Mecanismos implicados en la activación de HSCs (2).

Estas HSC activadas proliferan y secretan distintos componentes de la MEC, fundamentalmente colágeno, así como citoquinas proinflamatorias que reclutan células de la inflamación (2). Conjuntamente liberan al medio grandes cantidades de inhibidores tisulares de las colagenasas (TIMP) (4). Estas enzimas regulan la actividad de las colagenasas, las cuales están implicadas en el proceso de degradación de las fibras de colágeno y son esenciales en la homeostasis de la matriz. (25). Durante el proceso de fibrogénesis hepática hay un marcado incremento en la expresión de las TIMP y, por tanto, una inhibición de la actividad de las colagenasas (4). Esto desplaza el equilibrio entre secreción y degradación de la MEC hacia un excesivo depósito de ésta.

5.2.2 EMT en la fibrosis hepática

Otro mecanismo implicado en la fibrogénesis hepática que actualmente está cobrando más relevancia es la transición de células epiteliales a mesenquimales (EMT). Pese a que EMT fue descrita en el desarrollo embriológico, numerosos estudios han sugerido que la inducción de EMT puede contribuir a la población de fibroblastos en condiciones de daño crónico y activación descontrolada (24,26,27,28,29). Durante el proceso las células epiteliales pierden su polaridad y ciertas proteínas importantes en la adhesión a la membrana de otras células como E-Cadherina o proteínas surfactantes, adquiriendo propiedades típicas de células mesenquimales como la habilidad de migrar y secretar componentes de la matriz extracelular y adquieren marcadores mesenquimales como SMA α (24). EMT puede ser inducida por diversas citoquinas y factores de crecimiento como TGF β , factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2), IL-1 entre otros, según el contexto fisiológico (30). En este trabajo nos hemos centrado en la activación mediada por TGF β cuya implicación en la inducción de EMT ha sido ampliamente demostrada y por su relación con el papel de BMPs en la fibrosis hepática. Pese a que no se conoce en detalle el mecanismo molecular implicado en la inducción de EMT por TGF β en el proceso fibrótico, se sabe que las rutas de señalización dependientes de Smad juegan un papel esencial en el proceso, aunque hay evidencias de que rutas independientes de Smad también están implicadas en ciertas circunstancias (30). En relación con la fibrosis hepática, *Zeisberg et al (2007)* demostraron por primera vez que los hepatocitos contribuían a la población de fibroblastos en un porcentaje sustancial (alrededor del 45%) debido a su capacidad de experimentar EMT inducida por TGF β . Llevaron a cabo un experimento con hepatocitos de ratón adultos que fueron incubados con TGF β 1 humana observando a las 96 horas cambios en la morfología de las células, aumento de la expresión de FSP-1 (proteína específica de fibroblasto) y SMA α y la pérdida de E-cadherina. Paralelamente evaluaron la capacidad de migración celular, demostrando que la estimulación con TGF β 1 incrementaba significativamente la migración de los hepatocitos hacia el otro compartimento separado por una membrana de colágeno, característica propia de fibroblastos (24). Sin embargo, la contribución de este tipo celular a la población de miofibroblastos en la fibrosis es aún debatible y en parte se debe de la falta de marcadores específicos para EMT (31,32).

❖ Señalización de TGFβ

El factor de crecimiento transformador beta (TGFβ) es el mediador más importante en la fibrogénesis humana. Pertenece a la superfamilia del TGFβ, que incluye un gran número de factores estructural y funcionalmente relacionados, entre los que se encuentran las BMPs. Se conoce que TGF juega un papel esencial en la producción, degradación y acumulación de ECM, así como en los cambios fibroproliferativos que ocurren tras el daño tisular en el hígado (33). La señalización de TGFβ es mayoritariamente mediante rutas dependientes de Smad. TGFβ se une a receptores tipo serina/treonina tipo I y II, formando un complejo heterotetramérico. El receptor tipo I activado fosforila residuos de serina en Smad 2 o Smad3. Esta fosforilación induce su asociación con Smad4 y translocación al núcleo donde interactúan con otros factores de transcripción que regulan la actividad de Smad, y promueve la transcripción de genes como: CTFG, actina de músculo liso (SMAα), colágeno tipo 1 y PAI (inhibidor de activador del plasminógeno) (19,33) Pese a que la implicación de las proteínas Smad en el desarrollo y mantenimiento de la fibrosis es indiscutible, no se conocen las rutas de señalización implicadas en profundidad. En modelos in vivo experimentales de EMT y fibrosis con ratones en los que se había suprimido la expresión de Smad3 demostraron que mejoraba la progresión de la fibrosis asociada a EMT (34). Varios estudios han demostrado que el incremento de la expresión de Smad2 o Smad3 potencia la inducción de EMT por TGF1 (35). La migración y proliferación de HSCs activadas es inducida por TGF a través de varios mecanismos entre los que se encuentra la señalización de Rho/GTPasa (5). En resumen, dada la implicación de TGFβ en los diversos mecanismos fibróticos, la inhibición de su señalización es una diana muy interesante para frenar la progresión fibrótica.

5.3 BMPs Y EL HÍGADO

A la luz de los últimos estudios sobre nuevos papeles de las BMPs, el hígado se ha descrito como uno de sus tejidos diana. La función más conocida es la del control de la homeostasia del hierro en el hígado por parte de la BMP-6 (8). Activa la expresión de hepcidina vía ruta de señalización Smad. La hepcidina es una hormona peptídica que regula la absorción del hierro intestinal, así como la liberación de este de los depósitos del organismo. Se conocen múltiples funciones de las BMPs en el hígado, como reguladores de los niveles de glucosa en sangre, en la formación de tejido adiposo marrón entre otras (36). Sin embargo, en este trabajo nos hemos centrado en el papel de las BMPs en la fibrosis hepática.

❖ **BMP-7 en la fibrosis hepática**

La posible implicación de las BMPs en la fibrosis hepática ha sido recientemente sugerida. La mayoría de la información existente sobre el papel de BMPs durante el proceso fibrótico procede de estudios de fibrosis renal, que han demostrado el efecto antifibrótico de BMP7 (37). Son numerosos los estudios que relacionan la acción antifibrogénica de BMP-7 en diversos tejidos con un antagonismo de la señalización de TGF β en la inducción de EMT (38-40). Como se ha explicado anteriormente, TGF β es el mediador fibrótico más importante: produce la activación de HSC, regula la síntesis de MEC, induce la apoptosis de hepatocitos y la transición de células epiteliales a mesenquimales.

Uno de los primeros estudios con modelos de fibrosis hepática relacionó el efecto protector de BMP-7 con su capacidad de inhibir la producción de fibroblastos vía EMT en el hígado. En este estudio realizaron un experimento *in vitro* con hepatocitos adultos de ratón que fueron inducidos a miofibroblasto derivados de EMT tras incubarlos con TGF β 1. En aquellos a los que se adicionó al medio BMP-7 la inducción a fibroblastos fue bloqueada: no se produjo ningún cambio fenotípico en las células, medido por el nivel de expresión de FSP-1 y la pérdida de albúmina. En el mismo estudio llevaron a cabo paralelamente un experimento *in vivo* con ratones a los que indujeron fibrosis hepática con CCL4. En dos grupos se administró BMP-7 vía intraperitoneal antes y durante el proceso fibrótico. Tras ser sacrificados, se tomaron muestras del tejido hepático que examinaron mediante la tinción de Masson, y de albumina sérica que determinaron con un ELISA. Observaron que en los grupos tratados con BMP-7 las lesiones hepáticas eran sustancialmente menores junto con una mejor función del hígado que se determinó midiendo los niveles séricos de albúmina y un menor número de células expresaron marcadores de fibroblastos: FSP-1 y SMA α (24). En la misma línea, otro estudio empleó un modelo de ratón con fibrosis inducida por tetracloruro de carbono (CCL4) al que se le inyectó intraperitonealmente BMP-7 humana recombinante y se observó una disminución en la expresión de TGF β -1 y SMA α , así como atenuamiento del daño fibrótico (41).

❖ Señalización de BMP-7 en fibrosis hepática

Se conoce que BMP7, al igual que TGF β se une al receptor expresado en hepatocitos ALK3, sin embargo, el mecanismo exacto implicado en la señalización de BMP7 es aún desconocido. En fibrosis renal se ha postulado que BMP-7 antagoniza EMT inducido por TGF β reduciendo la translocación al núcleo de Smad3 y bloqueando la transcripción mediante una ruta dependiente de Smad5 no canónica (ERK1/2, p38, JNK) (42).

En un experimento llevado a cabo por *Chen et al (2013)* en ratones con fibrosis inducida por *Schistosoma japonicum*, el tratamiento con BMP-7 recombinante humana redujo el depósito de colágeno significativamente, que se constató mediante la tinción histológica de Masson. Conjuntamente se redujo la expresión de TGF- β 1, pSmad2/3 y α -SMA, lo que parece indicar que BMP-7 ejerce su efecto inhibitorio mediante la regulación de la expresión de TGF- β 1 y pSmad2/3 y con ello, de la activación de HSC (43). Otro estudio con un modelo de fibrosis hepática inducida por tioacetamida (TAA) en células HSCs de ratón y humanas, que infectaron con un adenovirus que expresaba BMP-7, observó una reducción de la expresión de colágeno tipo 1 y de SMA α vía fosforilación Smad1/5/8 (44).

Sugimoto et al (2007) llevaron a cabo un interesante estudio en el que investigaron los efectos terapéuticos de BMP7 recombinante en la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial en ratones. Los autores observaron que la administración de BMP7 mejoraba significativamente la regeneración hepática, promoviendo la proliferación de los hepatocitos (45).

Sin embargo, el efecto antifibrótico de BMP7 no está libre de controversia. En un estudio de *Tacke et al (2007)* con pacientes con cirrosis y hepatitis B, así como niños con atresia biliar se observó un aumento de la expresión de BMP7 en hepatocitos y/o en suero, y en algunos casos se asoció con una mayor gravedad de la patología. En el mismo estudio los autores, empleando HSC inmortalizadas que infectaron con adenovirus que codificaba para BMP7, demostraron que la infección potenciaba la proliferación de HSCs (46). Una posible hipótesis podría ser que el aumento de la expresión de BMP7 en daño hepático sea como respuesta a éste y para contrarrestar los efectos de TGF β . (8) En esta misma línea, un interesante trabajo de *Bi et al. (2014)* demostró que para observar la acción antagonista de BMP7 sobre EMT mediado por TGF β era necesaria una concentración de al menos 1/10 (47). Es importante seguir investigando sobre los mecanismos implicados

en la señalización de BMP7 en el hígado y su papel en la fibrosis hepática que permitan aclarar su efecto profibrótico de cara a su empleo en un futuro como agente terapéutico.

6. CONCLUSIONES

La fibrosis hepática es clave en la progresión de hepatopatías crónicas, y puede acabar derivando en cirrosis, fallo hepático y en ocasiones, hepatocarcinoma. En la actualidad el tratamiento se aborda desde la eliminación del agente causal, si es posible, medidas paliativas y en última instancia trasplante hepático, con el impacto sanitario que ello conlleva. La falta de agentes terapéuticos eficaces ha motivado el estudio de nuevas dianas y agentes terapéuticos que frenen la progresión de la enfermedad y permitan la reversión del daño. A la luz de los recientes descubrimientos acerca del papel antifibrótico de BMP7 por su capacidad de contrarrestar los efectos de TGF β , se ha alzado como un prometedor agente terapéutico. Sin embargo, aún quedan puntos claves por esclarecer sobre su mecanismo de acción que permitan entender el papel de BMP7 en la fibrosis hepática para poder trasladarlos a ensayos clínicos y ser utilizado en un futuro como agente antifibrótico.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Sarem, M; R. Znaidak. Las células estrelladas del hígado: su importancia en condiciones normales y patológicas. *Gastroenterol Hepatol.* 2006; 29(2):93-101
2. Odena, G. Bataller, R. Fibrogénesis hepática: fisiopatología. *Gastroenterol Hepatol.* 2012; 35(2):3-9
3. Henderson, N. Iredale, J. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clinical Science* (2007) 112, 265–280
4. Novo, E. Cannito, S. Patemostro, C. Bocca, C. Miglietta, A. Parola, M. Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 548 (2014) 20–37
5. Fabregat, I. Cáceres-Moreno, J. TGF-b signalling and liver disease. *FEBS J.* 2016 Jun;283(12):2219-32
6. Karkampouna S, Ten Dijke P, Dooley S & Julio MK TGF-beta signaling in liver regeneration. *Curr Pharm Des* (2012) 18, 4103–4113.
7. Michalopoulos, G. Liver regeneration. *J Cell Physiol.* 2007 Nov; 213(2): 286–300.
8. Herrera, B. Addante, A. Sánchez, A. BMP Signalling at the Crossroad of Liver Fibrosis and Regeneration. *Int.J.Mol.Sci.* 2018, 19, 39.

9. Bragdon, B.; Moseychuk, O.; Saldanha, S.; King, D.; Julian, J.; Nohe, A. Bone morphogenetic proteins: A critical review. *Cell. Signal.* 2011, 23, 609–620.
10. McVicker, B.L. Bennet, R.G. Novel Anti-fibrotic Therapies. *Front. Pharmacol.* 2017, 8:318.
11. Urist, M.R. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965, 150, 893–899.
12. Hogan, B.L. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1996, 6, 432–438.
13. H. Zou, L. Niswander Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation *Science*, 1996 May 3;272(5262):738-41.
- 14.K. Bobacz, R. Gruber, A. Soleiman, L. Erlacher, J.S. Smolen, W.B. Graninger Expression of bone morphogenetic protein 6 in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulation of matrix synthesis in vitro. *Arthritis Rheum*, 2003 Sep;48(9):2501-8.
15. Nishimatsu S. & G.H. Thomsen: Ventral mesoderm induction and patterning by bone morphogenetic protein heterodimers in *Xenopus* embryos. *Mech Dev* 1998, 74, 75-88
16. Zhang, Y.E. Non-Smad pathways in TGF β signalling. *Cell Res.* 2009, 19, 128–139.
17. De Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(1):1-11.
18. Hogan, B.L. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1996, 6, 432–438.
19. Ross, S.; Hill, C.S. How the Smads regulate transcription. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008, 40, 383–408.
20. Herpin, A.; Cunningham, C. Cross-talk between the bone morphogenetic protein pathway and other major signaling pathways results in tightly regulated cell-specific outcomes. *FEBS J.* 2007, 274, 2977–2985.
21. Zhang, Y.E. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2017, 9.
22. Corradini E, Babitt JL, Lin HY. The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(5-6):389-398.
23. Heinke, J.; Wehofsits, L.; Zhou, Q.; Zoeller, C.; Baar, K.M.; Helbing, T.; Laib, A.; Augustin, H.; Bode, C.; Patterson, C.; et al. BMPER is an endothelial cell regulator and controls bone morphogenetic protein-4-dependent angiogenesis. *Circ. Res.* 2008, 103, 804–812.
24. M. Zeisberg, C. Yang, M. Martino, M.B. Duncan, F. Rieder, H. Tanjore, R. Kalluri, Fibroblasts Derive from Hepatocytes in Liver Fibrosis via Epithelial to Mesenchymal Transition. *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 23337–23347.
25. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology.* 2002;36:850-60

26. Zeisberg M, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13: 952–961, 2007.
27. Goumans MJ, van Zonneveld AJ, ten Dijke P. Transforming Growth Factor β -Induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition: A Switch to Cardiac Fibrosis? *Trends Cardiovasc Med* 18: 293–298, 2008.
28. Hashimoto N, Phan SH, Imaizumi K, Matsuo M, Nakashima H, Kawabe T, Shimokata K, Hasegawa Y. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43: 161–172, 2010.
29. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 19:2282–2287, 2008.
30. Zavadil J, Bottinger EP. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24: 5764-2005.
31. Taura K, Iwaisako K, Hatano E, Uemoto S. Controversies over the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Liver Fibrosis. *J Clin Med* 5: 9,2016.
32. Taura K, Miura K, Iwaisako K, Osterreicher CH, Kodama Y, Penz-Osterreicher M, Brenner DA. Hepatocytes do not undergo epithelial mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology* 51: 1027–1036, 2010.
33. Dooley, S; Delvoux, B; Streckert, M; Bonzel, L; Stopa, M; Dijke, P.T; Gressner, A.M. Transforming growth factor L signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. *FEBS Letters* 502 (2001) 4-10.
34. Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB and Ooshima A. Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction (2003). *J. Clin. Invest.*, 112, 1486–1494
35. Xian, J; Lamouille, S; Derynck, R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 2009, 19(2): 156–172.
36. Grgurevic, L.; Christensen, G.L.; Schulz, T.J.; Vukicevic, S. Bone morphogenetic proteins in inflammation, glucose homeostasis and adipose tissue energy metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016, 27, 105–118.

37. Weiskirchen, R.; Meurer, S.K.; Gressner, O.A.; Herrmann, J.; Borkham Kamphorst, E.; Gressner, A.M. BMP-7 as antagonist of organ fibrosis. *Front. Biosci.* 2009, 14, 4992–5012.
38. Li, R.X.; Yiu, W.H.; Tang, S.C. Role of bone morphogenetic protein-7 in renal fibrosis. *Front. Physiol.* 2015, 6, 114.
39. Meng, X.M.; Chung, A.C.; Lan, H.Y. Role of the TGF β /BMP-7/Smad pathways in renal diseases. *Clin. Sci.(Lond.)* 2013, 124, 243–254.
40. Zeisberg, M.; Kalluri, R. Reversal of experimental renal fibrosis by BMP7 provides insights into novel therapeutic strategies for chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* 2008, 23, 1395–1398.
41. Hao, Z.M.; Cai, M.; Lv, Y.F.; Huang, Y.H.; Li, H.H. Oral administration of recombinant adeno-associated Virus-mediated bone morphogenetic protein-7 suppresses CCl₄-induced hepatic fibrosis in mice. *Mol. Ther.* 2012, 20, 2043–2051.
42. Wang, S.; Hirschberg, R. Bone morphogenetic protein-7 signals opposing transforming growth factor in mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 23200–23206.
43. Chen, B. L., Peng, J., Li, Q. F., Yang, M., Wang, Y., and Chen, W. (2013). Exogenous bone morphogenetic protein-7 reduces hepatic fibrosis in schistosoma japonicum-infected mice via transforming growth factor-beta/smad signaling. *World J. Gastroenterol.*
44. Kinoshita, K.; Iimuro, Y.; Otagawa, K.; Saika, S.; Inagaki, Y.; Nakajima, Y.; Kawada, N.; Fujimoto, J.; Friedman, S.L.; Ikeda, K. Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats. *Gut* 2007, 56, 706–714.
45. Sugimoto, H.; Yang, C.; LeBleu, V.S.; Soubasakos, M.A.; Giraldo, M.; Zeisberg, M.; Kalluri, R. BMP-7 functions as a novel hormone to facilitate liver regeneration. *FASEB J.* 2007, 21, 256–264.
46. Tacke, F.; Gabele, E.; Bataille, F.; Schwabe, R.F.; Hellerbrand, C.; Klebl, F.; Straub, R.H.; Luedde, T.; Manns, M.P.; Trautwein, C.; et al. Bone morphogenetic protein 7 is elevated in patients with chronic liver disease and exerts fibrogenic effects on human hepatic stellate cells. *Dig. Dis. Sci.* 2007, 52, 3404–3415.
47. Bi, W.R.; Xu, G.T.; Lv, L.X.; Yang, C.Q. The ratio of transforming growth factor-1/bone morphogenetic protein-7 in the progression of the epithelial-mesenchymal transition contributes to rat liver fibrosis. *Genet. Mol. Res.* 2014, 13, 1005–1014.