

# La *bone morphogenetic protein-7* (BMP-7): è ipotizzabile una sua futura rilevanza clinica?

S. Mazzaferro

Dipartimento di Scienze Cliniche - Nefrologia, Policlinico Umberto I, Roma

## Is there any role predictable for bone morphogenetic protein-7 in nephrology?

*The existence of proteins with bone morphogenetic properties has been suggested for many years to explain the calcifying effect observed, with bone extracts, in ectopic tissues in vivo. Subsequently, at least thirty different proteins (identified as Bone Morphogenetic Proteins, BMPs) with this capacity have been discovered. The osteogenic activity of these substances is evident from the early phases of embryogenesis. However, besides bone, these proteins have been shown to affect other tissues too, where they affect cellular functions like proliferation, differentiation and apoptosis. They act through a specific receptor system partly shared with TGF- $\beta$ ; in fact, they have been shown to inhibit TGF- $\beta$  actions. BMP-7 in particular is of vital importance in embryogenesis through its actions on bone, kidney and eyes, while in adulthood it is mainly expressed in the kidney, where specific receptors have been localized. BMP-7 has been successfully employed, for therapeutic purposes, in several animal models of nephropathies, where the most striking result is the constant reduction of fibrosis. Moreover, BMP-7 has been used successfully in experimental models of renal osteodystrophy and of vascular calcification. To date the only available human data are those obtained in orthopedy where BMP-7 has been successfully employed to induce the healing of pathologic fractures. Clinical data in nephropathic patients are therefore warranted to rule out the true value of this, very interesting, new molecule (G Ital Nefrol 2006; 23: 129-37)*

**KEY WORDS:** Bone morphogenetic protein-7, Smad, Therapy, Fibrosis, Vascular calcifications, Renal osteodystrophy

**PAROLE CHIAVE:** Bone morphogenetic protein-7, Smad, Terapia, Fibrosi, Calcificazioni vascolari, Osteodistrofia renale

## La famiglia delle BMPs

In una serie di studi certamente pionieristici, Urist et al avevano osservato che estratti di osso demineralizzato erano in grado di indurre nuova formazione di osso quando impiantati in sede ectopica nel ratto; ne era nata la proposta dell'esistenza di una proteina osteo-induttrice, chiamata perciò "*bone morphogenetic protein*" (1-3). Questa osservazione sperimentale è stata rivalutata circa venti anni dopo, con la clonazione di una proteina, chiamata osteogenina, capace di indurre *in vivo* una simile attività osteoformativa (4-9). È poi emersa la complessità di questo processo osteoformativo, caratterizzato da almeno tre tappe diverse: colonizzazione del tessuto ectopico da parte di cellule mesenchimali destinate a trasformarsi in condrociti, formazione di tessuto vascolare e comparsa di cellule osteoblastiche ed osteoclastiche responsabili della definitiva sintesi

ossea (10). Anche per la osteogenina è emersa una attività complessa (11), non limitata ad una semplice azione catalitica della deposizione di calcio, ma caratterizzata dalla capacità di influenzare numerose funzioni cellulari quali la proliferazione e la differenziazione, l'apoptosi, la morfogenesi e lo sviluppo, non solo nell'osso ma in vari tessuti (12). È anche emerso che lo stesso tipo di multifunzionalità non è esclusivo dell'osteogenina, ma è comune ad un intero gruppo di proteine, non invariabilmente osteoinduttrici, contraddistinte dalla presenza di una determinata sequenza aminoacidica (13). Per questo gruppo eterogeneo di proteine sono stati conati, negli anni, nomi diversi quali: *bone morphogenetic proteins* (BMPs), Osteogenina, *Osteogenic proteins*, *Cartilage-derived morphogenetic proteins*, *Growth and differentiation factors*. Attualmente il nome più usato è BMPs (e così le chiameremo d'ora in avanti), ma se si considerano le caratteristiche funzionali sarebbe più giu-

sto chiamarle *Growth and Differentiation Factors*.

Le BMPs costituiscono una grande famiglia, multigenica, i cui membri sono accomunati dalla presenza di sette residui di cisteina nella porzione C-terminale e dalla capacità di esercitare una ampia serie di funzioni biologiche (14). Le BMPs, al momento costituite da circa trenta proteine diverse, appartengono alla più grande famiglia del *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) e, più in generale, possono essere definite citochine.

### Principali caratteristiche delle BMPs

La induzione di fenomeni fisiologici diversi e così importanti, da parte di proteine appartenenti alla stessa famiglia, si può spiegare con la presenza di un meccanismo di attivazione recettoriale simile, assai interessante, comune a tutta la superfamiglia del TGF- $\beta$ .

Prima di agire le BMPs devono essere attivate: prodotte come precursori, vanno incontro a dimerizzazione e clivaggio per poi dar luogo a dimeri carbossiterminali attivi (4, 15). L'azione di una BMP inizia con il suo legame ad uno speciale recettore transmembrana (Fig. 1, parte sinistra), dotato di attività *serin-treonin* chinasi intrinseca, detto Recettore Tipo II (esistono almeno tre diversi Recettori Tipo II). Segue il reclutamento di un altro recettore, sempre transmembrana e sempre dotato di attività *serin-treonin* chinasi, ma detto Recettore Tipo I (esistono almeno quattro differenti Recettori Tipo I), a formare un eterodimero. Questa eterodimerizzazione recettoriale determina la trasfosforilazione del Recettore Tipo I che, divenuto attivo, dà il via alla traduzione del segnale a livello nucleare, attraverso la via delle cosiddette Smad (11, 15). Questo acronimo (Smad = *Small Mother Against Decapentaplegic*) ha storia complessa, ma è sufficiente sapere che le proteine Smad sono considerate, in generale, i trasduttori del segnale per i recettori con attività *serin-treonin* chinasi intrinseca (16), come appunto i Recettori Tipo I e II. Nei mammiferi esistono almeno otto proteine Smad distinguibili funzionalmente in tre gruppi diversi: Smad regolate dal Recettore (R-Smad -1-2-3-5-8), Smad Inibitorie (I-Smad -6 e -7) e Smad mediatore comune (Co-Smad -4). Le R-Smad, prototipo di queste proteine, sono il vero substrato dei recettori *serin-treonin* chinasi Tipo I e II e sono attivate sia dai recettori delle BMPs (specificamente le R-Smad -1-5 e -8) che da quelli del TGF- $\beta$  e della Activina (specificamente le R-Smad -2 e -3). Tutte le R-Smad attivate tendono a formare un complesso con la Co-Smad -4 (che è dunque condivisa dalle vie di attivazione di BMPs e TGF- $\beta$ /Activina), che quindi trasloca nel nucleo dove interagisce con l'elemento di risposta del DNA. Le I-Smad, dette anche anti-Smad, prevengono l'effetto di attivazione della Co-Smad-4 da parte delle R-Smad attivate e costituiscono quindi una sorta di *feed-back* negativo essendo anch'esse indotte da ligandi appartenenti alla superfamiglia del TGF- $\beta$  (17). A differenza delle BMPs, il TGF- $\beta$  si lega prima al Recettore Tipo I e

poi forma l'eterodimero con il Tipo II (Fig. 1, parte destra). La diversa attività biologica di queste proteine può essere spiegata dal fatto che ogni membro della superfamiglia TGF- $\beta$  si lega ad una caratteristica combinazione di recettori Tipo I e II, che sono entrambe necessari per il segnale. La Figura 1, che mostra schematicamente a confronto le tappe della attivazione recettoriale e l'azione nucleare della BMP-7 e del TGF- $\beta$ , consente di notare la possibile azione inibitoria della BMP sull'effetto del TGF- $\beta$  (18).

### Test di verifica

#### 1) Quale delle seguenti definizioni è più adatta per una *bone morphogenetic protein*?

- È un enzima
- È una lipoproteina
- È una proteina presente nell'uomo solo nella fase embrionale
- È una proteina sempre dotata della specifica capacità di indurre formazione ectopica di osso
- È una citochina appartenente alla superfamiglia della TGF-beta.

#### 2) Quali delle seguenti funzioni cellulari sono influenzate dalle BMPs?

- Proliferazione
- Differenziazione
- Apoptosi
- a+c
- a+b+c.

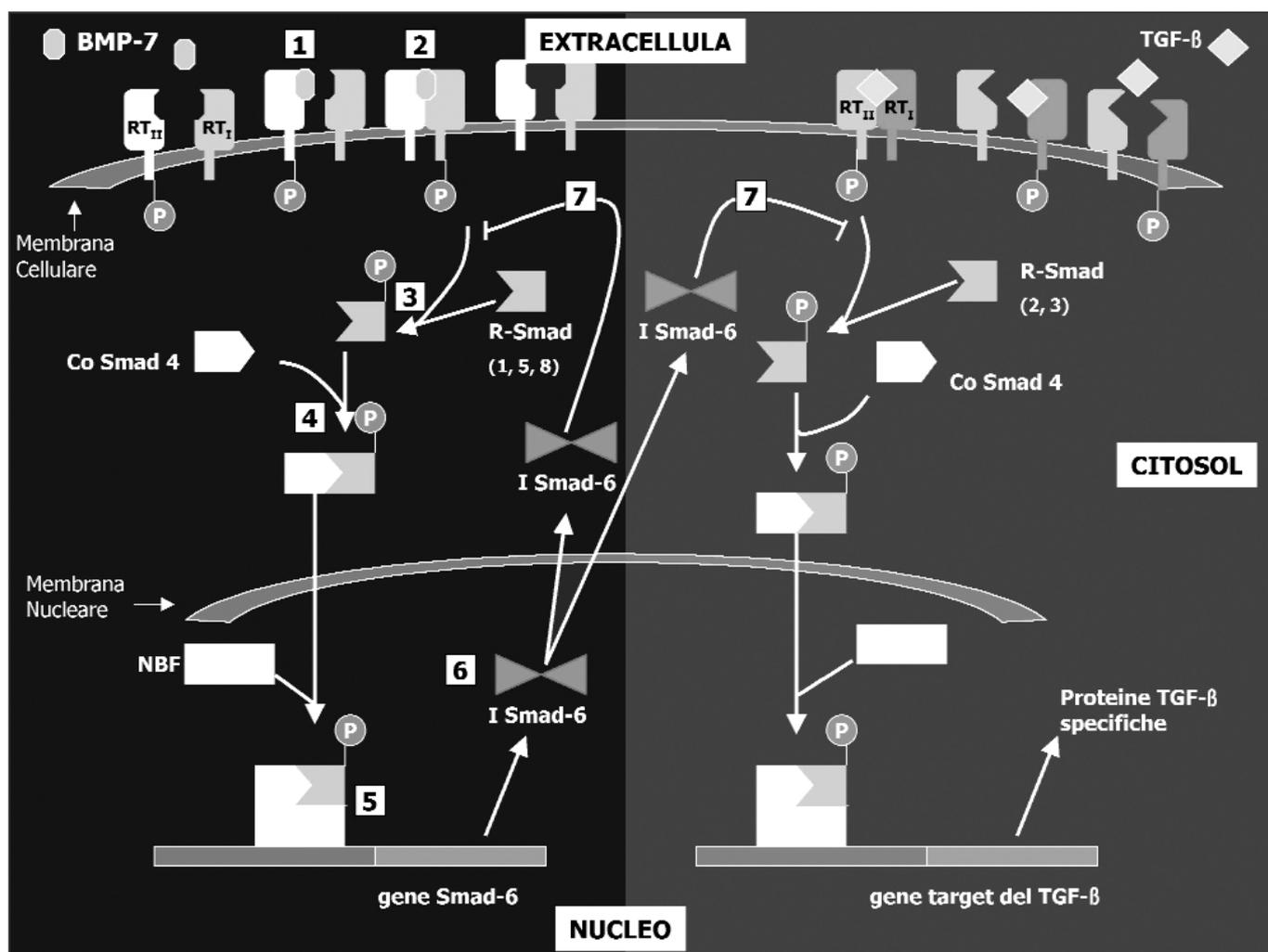
#### 3) Quale dei seguenti è il recettore delle BMPs?

- Protein* chinasi
- Serin* chinasi
- Treonin* chinasi
- Serin-Treonin* chinasi Tipo I
- Serin-Treonin* chinasi Tipo II.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet [www.sin-italy.org/gin](http://www.sin-italy.org/gin) e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

### La BMP-7

La BMP-7 è dunque una delle trenta BMPs, caratterizzata, insieme alle BMP-2,-4, -5, -6 e -9 da una spiccata capacità osteogenetica (14). È una proteina di 431 aminoacidi, la cui struttura tridimensionale è stata descritta di recente (19). È così emerso che il dominio conservato *C-term* ed i sette residui di Cisteina costituiscono una sorta di anello centrale attorno al quale sono diversamente agganciate le altre porzioni proteiche che danno luogo alle varie proteine della famiglia TGF- $\beta$ .



**Fig. 1** - Meccanismo di azione intracellulare della BMP-7 a confronto con quello del TGF- $\beta$ . Per la BMP-7, parte sinistra della figura, si possono schematicamente riassumere le seguenti tappe: 1) Legame della BMP-7 al Recettore Tipo II (RT<sub>II</sub>); 2) Formazione dell'eterodimero con il Recettore Tipo I (RT<sub>I</sub>) e sua transfosforilazione (P); 3) Attivazione mediante fosforilazione di una R-Smad (-1, -5 o -8); 4) Legame della R-Smad con la Co-Smad-4; 5) Interazione del complesso con proteine nucleari ed elemento responsivo del DNA; 6) Sintesi della proteina specifica (in questo caso una I-Smad-6); 7) Azione inibitoria della I-Smad sul legame R-Smad/Co-Smad-4. Notare che la sintesi, BMP-7 indotta, della I-Smad-6 rappresenta un feed-back negativo per il sistema. Per il TGF- $\beta$ , parte destra della figura, le tappe sono in pratica le stesse. Occorre segnalare che il legame iniziale è con il Recettore Tipo I, ma che è comunque necessaria la dimerizzazione con quello Tipo II per attivare la R-Smad (in questo caso -2 o -3) che è poi in grado di attivare la Co-Smad-4. L'effetto a livello nucleare è di indurre la sintesi di proteine specifiche, diverse dalle I-Smad. Notare come la sintesi di I-Smad, BMP-7 indotta, svolge una azione anti TGF- $\beta$ . NBF=Nuclear binding factor.

La BMP-7 è assai importante nella embriogenesi: espressa fin dai primi giorni di vita (dalla gastrula), è localizzabile nell'ectoderma, nella notocorda e nel neuroepitelio (20, 21). In seguito compare negli abbozzi embrionali dell'intestino, delle camere atriali e ventricolari, dell'occhio, dello scheletro (arti, dita, zone condrogenetiche) e del rene (22, 23). In quest'ultimo in particolare si ritrova nell'abbozzo ureterico, negli aggregati pre-tubulari e nei podociti. I ratti *knock-out* per la BMP-7 mostrano assenza sia dell'addensamento del mesenchima renale attorno all'abbozzo ureterale sia del fenomeno

della differenziazione da cellula mesenchimale ad epiteliale (fenomeno MET, *Mesenchymal-to-Epithelial cell Transformation*) (22, 23). L'importanza vitale della BMP-7 è evidenziata dal fenotipo di questi animali, caratterizzati da anomalie scheletriche (arti corti, polidattilia), del rene (reni piccoli, cistici, con pochi glomeruli) e dell'occhio (assenza del cristallino), con elevata mortalità perinatale in uremia (24).

Nell'animale adulto la BMP-7 si trova principalmente nel rene, a livello del tubulo collettore, ma è anche presente nel glomerulo e nello strato avventiziale delle arte-

rie renali (25). La BMP-7 marcata esogena si lega a questi stessi tessuti, indicando la presenza di recettori specifici e suggerendo quindi un possibile ruolo autocrino o paracrino nel mantenimento della differenziazione dell'epitelio tubulare e del glomerulo nell'adulto (26). La BMP-7 è stata trovata in minime quantità nel sangue circolante e potrebbe dunque avere azione, oltre che sul rene, su vari organi bersaglio, quali l'osso ed i vasi sanguigni.

Nell'insieme la BMP-7 può essere definita come una citochina con particolari funzioni sia fisiologiche che patologiche, complesse e non ancora prevedibili completamente. La presenza di recettori a livello della corticale e della midollare renale ha consentito di ipotizzare che una carenza di questa citochina possa essere importante nella patogenesi della insufficienza renale acuta e cronica ed ha determinato il fiorire di studi sperimentali volti a dimostrare questa possibile azione.

## Test di verifica

### 4) Cosa sono e quante sono le SMAD?

- Sono tre diverse proteine con funzione di trasduzione dei segnali per tutti i recettori di membrana
- Sono otto diverse proteine con funzione di trasduzione del segnale per tutti i recettori di membrana
- Sono otto diverse proteine con funzione di trasduzione del segnale per solo per il recettore *serin-treonin* chinasi di Tipo II
- Sono otto proteine diverse, distinguibili in tre gruppi funzionali, deputate alla trasduzione a livello nucleare del segnale proveniente dalla attivazione dei recettori *serin-treonin* chinasi Tipo I e II
- Sono proteine intracellulari deputate alla traduzione del segnale prodotto dalla attivazione recettoriale nelle cellule animali ma non in quelle umane.

### 5) In quali organi è fondamentale la BMP-7 durante lo sviluppo embrionale?

- Osso
- Occhio
- Fegato
- Rene
- a+b+d.

### 6) In quale organo la BMP-7 è maggiormente espressa nell'età adulta?

- Osso
- Occhio
- Fegato
- Rene
- Cuore.

## BMP-7 e ischemia renale

Vuckicevic et al (27) hanno prodotto nel ratto il primo studio sull'impiego terapeutico della BMP-7. Il modello animale prevede la induzione di ischemia renale bilaterale, transitoria, per un'ora, tramite clampaggio delle due arterie. Il gruppo di animali trattati ha ricevuto boli e.v. di BMP-7 a vari intervalli: 10 minuti prima, ovvero 1 ora, 16 ore e poi ogni 24 ore, per tre giorni dopo l'ischemia. Rispetto al gruppo di controllo gli animali trattati hanno mostrato una migliore funzione renale (livelli di creatinina e azotemia) e una maggiore sopravvivenza. L'esame istologico dei reni ha evidenziato una riduzione dell'area di infarto e della necrosi cellulare; una soppressione della flogosi per riduzione della espressione di molecole di adesione (ICAM-1) e ridotto accumulo di neutrofili. Vi erano anche il mantenimento del fenotipo delle cellule muscolari lisce vascolari nei capillari ed una riduzione della morte programmata delle cellule.

Un sostegno fisiopatologico a questo esperimento viene da un altro lavoro, su un modello di animale sperimentale analogo (ischemia di un solo rene per clampaggio monolaterale), che ha evidenziato una ridotta espressione della BMP-7 principalmente a livello della midollare renale, per effetto della ischemia (25).

Nell'insieme si può ipotizzare che la ischemia determini una precoce riduzione della espressione di BMP-7, la cui correzione ha effetti favorevoli sulla lesione.

## BMP-7 e fibrosi interstiziale renale

Altro modello sperimentale nel quale è stato verificato l'effetto terapeutico della BMP-7 è quello della ostruzione ureterale unilaterale, nel quale la legatura chirurgica di un uretere viene mantenuta per cinque giorni. In tal modo il rene ostruito sviluppa un quadro di fibrosi interstiziale con danno glomerulare modesto; ne deriva l'assenza di ipertensione arteriosa, di proteinuria e di sindrome uremica, anche per la presenza del rene controlaterale sano. La patogenesi della lesione è almeno in parte riferita alla aumentata produzione di angiotensina II, che a sua volta attiva il TGF- $\beta$  in una cascata di eventi che culminano nella infiammazione interstiziale e nella fibrosi (28). In questo modello sperimentale la somministrazione di BMP-7 al momento della ostruzione e nei successivi 5 giorni è risultata in grado di preservare la funzione renale (in termini di ripresa del flusso, urinario e delle *clearances* del rene ostruito). Gli aspetti istologici salienti erano una minore atrofia tubulare con minor flogosi tubulointerstiziale e fibrosi. In particolare la ridotta apoptosi delle cellule epiteliali e l'aumentata integrità dell'epitelio tubulare, indicano un effetto protettivo della BMP-7 come per una azione di mantenimento del fenotipo cellulare. Da notare anche che nel rene ostruito vi era una ridotta espressione di BMP-7 e che l'effetto protettivo era superiore a quello ottenuto con la somministrazio-

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet [www.sin-italy.org/gin](http://www.sin-italy.org/gin) e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

ne di ACE-inibitore (ACE-i) (29).

Gli stessi Autori hanno successivamente prodotto uno studio analogo, nel quale la BMP-7 è stata somministrata dopo la risoluzione della ostruzione prodotta per tre giorni (30). Lo scopo era quello di riconoscere una possibile azione terapeutica e distinguerla da quella preventiva, già dimostrata. I ratti trattati mostravano in effetti una maggiore e più rapida ripresa funzionale renale anche in questa condizione sperimentale.

La BMP-7 ha dunque effetto sia preventivo che curativo della fibrosi interstiziale, con possibile meccanismo di azione riferibile alla inibizione degli effetti del TGF- $\beta$ , la cui produzione è aumentata in questa condizione patologica.

### *BMP-7 e nefropatia diabetica*

Un possibile ruolo terapeutico della BMP-7 è stato ricercato anche nella nefropatia diabetica (31). La somministrazione di streptozotocina nel ratto, determina la immediata comparsa di diabete e l'instaurarsi, dopo 16 settimane, di ipertrofia glomerulare e proteinuria. L'effetto terapeutico di dosi crescenti di BMP-7 è stato valutato trattando questi ratti dalla 16<sup>a</sup> alla 32<sup>a</sup> settimana con somministrazioni i.v. bisettimanali, avendo come controllo sia un gruppo placebo, che un gruppo trattato con enalapril. I ratti diabetici trattati con le dosi maggiori di BMP-7 (100 ug/kg), hanno mostrato una maggiore conservazione del filtrato glomerulare, sia rispetto ai controlli che ai trattati con ACE-i. Entrambe i gruppi trattati hanno avuto una riduzione del peso dei reni e della proteinuria che, nel caso della BMP-7, è stata dose dipendente. L'esame istologico dei reni ha evidenziato una riduzione dell'area glomerulare e del volume interstiziale, con significativa prevenzione della sclerosi. Da notare che l'enalapril, a differenza della BMP-7, ha determinato una riduzione dei valori di pressione arteriosa. In questo stesso studio, con la tecnica della ibridazione *in situ*, è stata anche evidenziata la perdita di espressione della BMP-7 a livello tissutale renale nel gruppo di controllo diabetico, ed il suo ripristino per effetto del trattamento non solo con la BMP-7, ma anche con l'ACE-i. Quest'ultimo dato suggerisce che l'azione antifibrotica dell'ACE-i si attui tramite ripristino della BMP-7. Anche questo studio indica un possibile ruolo terapeutico della BMP-7, nella nefropatia diabetica, con meccanismo d'azione non ancora ben chiarito, ma assimilabile e quantitativamente superiore a quello, ben affermato, degli ACE-i.

### *BMP-7 e nefrite da siero*

Nella nefrite da siero si realizza un quadro di iniziale glomerulonefrite con successiva reazione tubulointerstiziale ed evoluzione in fibrosi in un periodo di 6 settimane. La terapia con BMP-7 intraperitoneale, nel periodo compreso tra la prima e la quarta settimana dopo somministrazione del siero, è risultata associata a riduzione della atrofia tubu-

lare e della fibrosi. Anche il trattamento più tardivo, a partire dalla terza settimana dall'induzione della nefrite, si associa ad una quasi completa risoluzione del quadro istologico (32). Gli Autori, valutando la espressione di proteine specifiche dell'epitelio tubulare, suggeriscono che l'esordio della nefrite determini l'insacco di un fenomeno di transdifferenziazione delle cellule epiteliali tubulari renali verso il fenotipo delle cellule mesenchimali (fenomeno EMT, Epithelial-to-Mesenchymal cell Transformation), processo determinante per il successivo sviluppo della reazione fibrosa. In questo studio vengono fornite evidenze sperimentali a favore della ipotesi di una azione della BMP-7 di impedimento del fenomeno di transdifferenziazione cellulare verso il fenotipo mesenchimale, attraverso l'interferenza sui meccanismi di trasmissione intracellulare Smad-dipendenti.

### *BMP-7 nella nefrite lupica e nella sindrome di Alport*

L'effetto della BMP-7 è stato valutato anche in altri due modelli sperimentali di nefropatia: il ratto MRL/Mpj<sup>lpr/lpr</sup> prototipo della nefrite lupica ed il ratto *knock-out* per la catena alfa3 del collagene tipo IV, prototipo della Sindrome di Alport. In entrambe i modelli il quadro istologico renale è caratterizzato dalla presenza di significativa fibrosi. Anche in questi casi la terapia con BMP-7 ha ridotto la fibrosi, migliorato la funzione renale e la proteinuria e ridotto la mortalità nei trattati (33).

### *BMP-7 ed osteopatia metabolica uremica*

Lo stretto legame tra BMPs e osso è già stato ricordato, mentre per la BMP-7 in particolare si possono ricordare le anomalie scheletriche nel ratto *knock-out* ed il ruolo suggerito sulla differenziazione degli osteoblasti (34). Non sorprende dunque il tentativo di studiare i rapporti tra una complicanza temibile della insufficienza renale, l'osteodistrofia renale e la BMP-7.

Nel modello animale di insufficienza renale cronica indotta mediante elettrocauterizzazione di un rene e nefrectomia dell'altro, si sviluppa un quadro di iperparatiroidismo secondario con gli aspetti ossei di *turnover* elevato e fibrosi peritrabecolare. I possibili effetti terapeutici della BMP-7 sulla lesione ossea iperparatiroidica, sono stati valutati in questi ratti uremici, effettuando somministrazioni intraperitoneali di 10 ug/kg per 3-6 settimane e valutando le differenze con un gruppo placebo. Al termine dello studio i livelli di PTH non erano diversi tra i gruppi, ma gli animali trattati non avevano fibrosi peritrabecolare mentre mostravano un aumento del numero di osteoblasti, della superficie osteoblastica, della superficie mineralizzata e di quella marcata con tetraciclina, ed una riduzione della superficie di riassorbimento (35).

Un modello sperimentale simile al precedente prevede

sempre la induzione di insufficienza renale cronica (elettrocaterizzazione + nefrectomia), ma con la variante di una terapia dietetica ipofosforica associata a somministrazione di calcitriolo con lo scopo di indurre una condizione di basso *turnover* osseo. Gli animali così trattati mostrano in effetti una netta riduzione degli osteoblasti, della velocità di formazione ossea e di quella di apposizione minerale, rispetto al gruppo di controllo a dieta normale. Realizzando anche un gruppo di animali che oltre alla dieta ed al calcitriolo riceve BMP-7, si ottiene la normalizzazione dei parametri istomorfometrici ossei (36).

Secondo gli autori la BMP-7 è capace di esercitare un'azione positiva sulla funzione osteoblastica, con miglioramento della calcificazione e prevenzione della fibrosi nel primo modello e ripristino del normale *turnover* nel secondo.

### *BMP-7 e calcificazioni vascolari*

Un aspetto particolare già segnalato in alcuni degli studi riportati, è l'effetto della BMP-7 sulle cellule muscolari lisce della parete vasale (VSMC), per le quali è da qualche tempo invocato un ruolo patogenetico nelle calcificazioni vascolari. In particolare si ritiene che le noxae procalcificanti (quali l'iperfosforemia nell'uremico) siano responsabili di una transdifferenziazione delle VSMC in cellule simil-osteoblastiche che sono poi coinvolte attivamente nel processo di calcificazione (37). Con queste premesse Davies et al (38) hanno realizzato un modello sperimentale atto a valutare se la BMP-7, che è capace di mantenere il fenotipo delle VSMC (39), è in grado di influenzare le calcificazioni vascolari. Un ceppo di ratti nullo per il recettore delle LDL e trattato con dieta ricca di grassi (modello animale di aterosclerosi), è stato reso uremico, in due tempi, mediante elettrocaterizzazione e nefrectomia, per indurre una accelerazione delle calcificazioni vascolari. L'evoluzione della patologia è stata confrontata con un gruppo di questi animali trattato con BMP-7 per un periodo di 15 settimane. Gli animali uremici hanno mostrato effettivamente un aumento delle calcificazioni vascolari all'esame istologico e chimico, mentre gli animali trattati avevano entità delle calcificazioni simile ai ratti non uremici. Gli Autori hanno anche evidenziato che negli animali non trattati vi era, a livello dei vasi calcificati, una aumentata espressione di osteocalcina (*marker* di attività di tipo osteoblastico), fenomeno non riscontrato negli animali che ricevevano BMP-7. Questi dati sperimentali sono compatibili con la ipotesi che una carenza di BMP-7, come descritta nella insufficienza renale, sia un fattore favorente la calcificazione e che la sua somministrazione possa avere un ruolo terapeutico preventivo.

Sempre gli stessi Autori hanno studiato l'effetto della BMP-7 nello stesso modello animale, i ratti *knock-out* per il recettore delle LDL, ma studiando anche le lesioni istologiche ossee per definire i possibili rapporti tra calcificazioni e *turnover osseo* (40). In questo studio gli animali, sempre ali-

mentati con dieta ricca di grassi e colesterolo hanno sviluppato, nell'ambito di un quadro assimilato alla sindrome metabolica, calcificazioni vascolari, *basso turnover* osseo e iperfosforemia. La sovrapposizione di insufficienza renale cronica (tramite elettrocaterizzazione e nefrectomia) ha determinato l'aggravamento delle calcificazioni, la comparsa di un quadro osseo di vera e propria adinamia con persistenza della iperfosforemia. In questa situazione, la somministrazione di BMP-7 è risultata in grado di prevenire le calcificazioni e di normalizzare il *turnover* osseo e la fosforemia. Gli Autori concludono che l'effetto anabolico osseo della BMP-7, già documentato nello studio precedente (36), ha consentito il mantenimento del normale *turnover* osseo (ridotto a causa della precoce carenza di BMP-7 descritta nei modelli animali di insufficienza renale) e quindi la normalizzazione della fosforemia (effetto tampone dell'osso) e la prevenzione delle calcificazioni.

### **Test di verifica**

**7) In quale delle seguenti nefropatie prodotte nell'animale sperimentale, la somministrazione di BMP-7 è risultata terapeutica?**

- Nefropatia interstiziale
- Nefropatia diabetica
- Nefrite da siero
- Nessuna delle precedenti
- Tutte le precedenti.

**8) L'impiego terapeutico della BMP-7 nei modelli di animali uremici è risultato efficace per prevenire/curare le seguenti complicanze della sindrome uremica:**

- L'osteopatia a basso *turnover*
- L'osteite fibrosa
- Le calcificazioni vascolari
- Tutte le precedenti
- Nessuna delle precedenti.

**9) Quali delle seguenti azioni riferibili alla BMP-7, possono spiegarne gli effetti terapeutici?**

- Azione anti TGF-beta-1
- Riduzione della reazione flogistica
- Effetto anabolico sugli osteoblasti
- Induzione della differenziazione in senso epiteliale delle cellule mesenchimali
- Tutte le precedenti.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet [www.sin-italy.org/gin](http://www.sin-italy.org/gin) e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

### *BMP-7 e lesioni ossee nel soggetto non uremico*

Come già ricordato, la gran parte delle BMPs sono capaci di indurre la differenziazione di cellule della linea osteo-

blastica, aumentandone il *pool* e la maturazione (41). Contemporaneo a tale effetto è l'aumento della osteoclastogenesi, dato lo stretto legame tra i due fenomeni (42). Pertanto le BMPs possono essere importanti non solo per lo sviluppo ed il mantenimento della integrità dell'osso, ma anche per indurre la guarigione delle fratture (43). Per la BMP-7 in particolare è stato dimostrato un effetto favorente la sintesi di un difetto della diafisi ulnare prodotto in laboratorio nel cane, con saldatura ottenuta nel 97% dei casi, contro il 20% dei trattati con allotrapianto ed il 66% dei trattati con autotrapianto osseo (44). La competenza meccanica dell'osso così riformato era perfettamente normale. Sempre la BMP-7, è stata impiegata con successo nell'uomo per favorire la guarigione delle lesioni ossee a livello del perone (45) e nella chirurgia ricostruttiva del ginocchio (46). Questi studi in campo ortopedico sono tra i pochi effettuati sull'uomo, ma evidenziano l'assenza di effetti tossici sistemici. Tuttavia poiché l'efficacia terapeutica è risultata minore rispetto a quanto osservato negli animali, è stato posto il problema di sviluppare metodi di somministrazione più efficaci, che consentano una maggiore concentrazione ed attività di BMPs nella sede della lesione (47).

### *Possibili impieghi terapeutici della BMP-7*

I modelli sperimentali descritti hanno contribuito a far conoscere la BMP-7 ed a definirne meglio il ruolo terapeutico che va riferito a due principali azioni: il mantenimento della integrità dell'epitelio tubulare (principalmente tramite l'effetto anti TGF- $\beta$ ) e la riduzione della reazione flogistica per riduzione dell'infiltrato cellulare infiammatorio (inibizione di proteine della flogosi). L'azione anti TGF- $\beta$ , meglio precisata negli studi più recenti (32, 48), prevede come detto, la attivazione delle R-Smad e la sintesi delle I-Smad, con successiva inibizione delle Smad -2/-3 TGF- $\beta$  indotte, il cui fondamentale ruolo nella genesi della fibrosi è suggerito dalle osservazioni nel ratto Smad-3 *knock-out*, che risulta protetto dalla fibrosi quando sottoposto ad ostruzione ureterale unilaterale (49). Questa azione della BMP-7 è spiegata sia tramite induzione delle Smad inibitorie -6/-7, che tramite inibizione di altre proteine coinvolte nella fibrosi (ad es. PAI)(48). Per la azione antinfiammatoria della BMP-7 è anche ipotizzato un meccanismo TGF- $\beta$  indipendente, legato alla inibizione della sintesi di proteine ad azione proinfiammatoria (IL-1-6-8, MCP-1) e vasocostrittrice (endotelina) (48, 50, 51).

Gli studi sull'azione anti TGF- $\beta$  della BMP-7, hanno meglio evidenziato il ruolo del TGF- $\beta$  nel favorire la transdifferenziazione delle cellule epiteliali tubulari in cellule mesenchimali (fenomeno EMT) che sono poi responsabili dell'aumento della matrice e della evoluzione in fibrosi. Abbiamo già ricordato che la BMP-7 nel periodo embrionale svolge un ruolo di induttore delle cellule indifferenziate di tipo mesenchimale in cellule epiteliali

tubulari (fenomeno MET). Sembra dunque verosimile che nell'adulto, in condizioni di sofferenza, la BMP-7 torni a svolgere una funzione che le è congeniale, di mantenimento e induzione della differenziazione delle cellule in senso epiteliale.

I meccanismi di azione descritti rendono plausibili in vario modo i risultati terapeutici ottenuti nei modelli animali qui presentati. La BMP-7 potrebbe dunque essere impiegata con successo nella insufficienza renale acuta e cronica per limitare i danni, accelerare la ripresa e rallentare o fermare la evoluzione verso la sclerosi. Molto interessante è anche il potenziale impiego in due gravi complicanze dell'uremia: la osteodistrofia renale e le calcificazioni vascolari. Tuttavia al momento attuale l'evidenza disponibile è limitata agli animali e gli unici dati nell'uomo sono relativi ad alcune patologie ortopediche. I risultati sono positivi per gli effetti sull'osso e per l'assenza di segnalazione di effetti tossici sistemici, ma sembra emergere un problema di biodisponibilità della proteina.

## **Conclusioni**

La BMP-7 rappresenta una molecola nuova, estremamente interessante sia dal punto di vista fisiopatologico che da quello terapeutico. Essendo una proteina naturale, non sorprende che per ora non vengano riportati effetti tossici sistemici nell'animale e nell'uomo, ma è anche intuibile la non prevedibilità di tutti i suoi possibili effetti farmacologici, data la incompleta conoscenza dei suoi meccanismi di azione. Pertanto, per il nefrologo i possibili campi di impiego sono per ora soltanto teorici.

## **Riassunto**

L'esistenza di proteine ad azione morfogenetica ossea è stata proposta per spiegare la capacità di estratti di tessuto osseo di indurre, previa inoculazione, calcificazioni ectopiche nell'animale. Si è poi visto che questa capacità è posseduta da circa trenta proteine appartenenti alla grande famiglia del TGF- $\beta$ . L'effetto osteoformativo compare fin dai primi giorni di vita embrionale. Tuttavia queste proteine hanno effetti anche su altri tessuti, dove sono in grado di influenzare funzioni cellulari quali la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi. Agiscono tramite un sistema recettoriale particolare e possono inibire gli effetti del TGF- $\beta$ . La BMP-7 in particolare ha un ruolo di vitale importanza nella embriogenesi su ossa, rene e occhi. Nell'età adulta è maggiormente espressa a livello renale dove è stata evidenziata la presenza di recettori specifici. La BMP-7 è stata impiegata con successo su modelli di animali sperimentali, con vari tipi di nefropatia, nei quali è risultata sempre efficace nel ridurre o prevenire l'evoluzione verso la fibrosi. Sempre in animali uremici, la BMP-7 ha

mostrato effetti terapeutici positivi su due complicanze maggiori della insufficienza renale cronica: la osteodistrofia renale e le calcificazioni vascolari. Tuttavia, al momento attuale la BMP-7 è stata impiegata nell'uomo solo in alcune patologie ortopediche, con interessanti risultati preliminari. Per il nefrologo le possibilità di impiego clinico sono pertanto solo teoriche.

Indirizzo degli Autori:  
Dr. Sandro Mazzaferro  
Dipartimento di Scienze Cliniche  
Nefrologia, Policlinico Umberto I  
Viale del Policlinico, 155  
00161 Roma  
e-mail: sandro.mazzaferro@uniroma1.it

## Ringraziamenti

Si ringrazia la Dr.ssa Emanuela Proietti per la preziosa collaborazione.

---

## Bibliografia

1. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893-9.
2. Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL, et al. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70: 3511-5.
3. Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 1828-32.
4. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 1988; 242: 1528-34.
5. Sampath TK, Muthukumaran N, Reddi AH. Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7109-13.
6. Wang EA, Rosen V, Cordes P, et al. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 9484-8.
7. Luxenberg DP, McQuaid D, Moustatos IK, Nove J, Wozney JM: Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2220-4.
8. Wang EA, Wozney JM: Identification of transforming growth factor  $\beta$  family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9843-7.
9. Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation *in vitro*. *J Biol Chem* 1992; 267: 20352-62.
10. Reddi AH. Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4: 727-44.
11. Hogan BLM. Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996; 10: 1580-94.
12. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family: Multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci* 1998; 106: 160-6.
13. Wolfman NM, Hattesley G, Cox K, et al. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J Clin Invest*, 1997; 100: 321-30.
14. Rosen V, Wozney JM. Bone Morphogenetic proteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, Editors. *Principles of bone biology*. San Diego. Academic Press; 1996; pag. 919-28.
15. Kingsley DM: The TGF- $\beta$  superfamily: New members, new receptors, and genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994; 8: 133-46.
16. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390: 465-72.
17. Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins. *Bone* 1999; 25: 91-3.
18. Lund RJ, Davies MR, Hruska KA. Bone morphogenetic protein-7: an anti-fibrotic morphogenetic protein with therapeutic importance in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hyperten* 2002; 11: 31-6.
19. Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC, Carlson WD. Three dimensional structure of recombinant human osteogenic protein-1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 878-83.
20. Lyons KM, Hogan BL, Robertson EJ. Colocalization of BMP-7 and BMP-2 RNA suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development. *Mech Dev* 1995; 50: 71-83.
21. Dudley AT, Robertson EJ. Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP-7 deficient embryos. *Dev Dyn* 1997; 208: 349-62.
22. Dudley A, Lyons K, Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 1995; 9: 2795-807.
23. Luo G, Hofmann C, Bronckers ALJ, Sohocki M, Bradley A, Karsenty G. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev*, 1995; 9: 2808-20.
24. Jena N, Martin-Seisdedos C, McCue P, Croce CM. BMP-7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney and eye. *Exp Cell Res* 1997; 230: 28-37.
25. Simon M, Maresh JG, Harris SE, et al Expression of BMP-7 RNA in normal and ischemic adult rat kidney. *Am J Physiol* 1999; 276: F382-9.
26. Bosukonda DSMS, Sampath KT, Vukicevic S. Characterization of receptors for osteogenic protein-1/bone morphogenetic protein-7 (OP-1/BMP-7) in rat kidneys. *Kidney Int* 2000; 5: 1902-11.
27. Vuckicevic S, Basic V, Rogic D, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischemic acute renal failure in rat. *J Clin Invest* 1998; 102: 202-14.
28. Klahr S, Ishidoya S, Morrissey J. Role of angiotensin II in the tubu-

- Interstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1995; 26: 141-6.
29. Hruska K, Guo G, Wozniak M, et al. Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction. *Am J Physiol* 2000; 279: F130-43.
  30. Morrissey J, Hruska K, Guo G, Wang S, Chen Q, Klahr S. Bone morphogenetic Protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return of renal function. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: S14-21.
  31. Wang S, Chen Q, Simon TC, et al. Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), a novel therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2003; 63: 2037-49.
  32. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, et al. BMP-7 counteracts TGF-beta-1 induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med*; 2003; 9: 964-8.
  33. Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, et al. Bone morphogenetic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *Am J Physiol (Renal)* 2003; 285: F1060-7.
  34. Hanai J, Chen LF, Kanno T et al. Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. *J Biol Chem* 1999; 274: 31577-82.
  35. Gonzales EA, Lund RJ, Martin KJ, et al. Treatment of a murine model of high-turnover renal osteodystrophy by exogenous BMP-7. *Kidney Int* 2002; 61: 1322-31.
  36. Lund KJ, Davies MR, Brown AJ, Hruska KA. Successful treatment of an adynamic bone disorder with bone morphogenetic protein-7 in a renal ablation model. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 359-69.
  37. Giachelli C. Vascular Calcification Mechanisms *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2959-64.
  38. Davies MR, Lund RJ, Hruska KA. BMP-7 is an efficacious treatment of vascular calcification in a murine model of atherosclerosis and chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1559-67.
  39. Dorai H, Vukicevic S, Sampath TK. Bone morphogenetic protein-7 (Osteogenic protein-1) inhibits smooth muscle cell proliferation and stimulates the expression of markers that are characteristic of SMC phenotype in vitro. *J Cell Physiol* 2000; 184: 37-45.
  40. Davies MR, Lund RJ, Mathew S, Hruska KA. Low turnover osteodystrophy and vascular calcification are amenable to skeletal anabolism in an animal model of chronic kidney disease and the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 917-28.
  41. Huges FJ, Collyer J, Stanfield M, Goodman SA. The effects of bone morphogenetic protein-2, -4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells *in vitro*. *Endocrinology* 1995; 136: 2671-7.
  42. Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, et al. Essential requirement of BMPs 2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 663-73.
  43. Boussein ML, Turek TJ, Blake CA, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83: 1219-30.
  44. Salkeld SL, Patron LP, Barrack RL, Cook SD. The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83A: 1219-30.
  45. Geesink RG, Hoefnagels NH, Bulstra SK. Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein-7 in a human fibular defect. *J Bone Joint Surg Br* 1999; 81: 710-8.
  46. Cook SD, Barrack RL, Patron LP, Salkeld SL. Osteogenic protein-1 in knee arthritis and arthroplasty. *Clin Orthop Rel Res* 2004; 428: 140-5.
  47. Issack PS, Di Cesare PE. Recent advances toward the clinical application of bone morphogenetic proteins in bone and cartilage repair. *Am J Orthop* 2003; 32 (9): 429-36.
  48. Wang S, Hirshberg R. BMP7-antagonizes TGF-beta-dependent fibrogenesis in mesangial cells. *Am J Physiol (Renal)* 2003; 284: F1006-13.
  49. Sato M, Muragaki Y, Saika S, et al. Targeted disruption of TGF-beta1/Smad 3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest* 2003; 112: 1486-94.
  50. Gould SE, Day M, Jones S, Dorai H. BMP-7 regulates chemokine, cytokine and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells. *Kidney Int* 2002; 61: 51-60.
  51. Lee MJ, Yang CW, Jin DC, et al. Bone morphogenetic protein-7 inhibits constitutive and interleukin-1 beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human mesangial cells: role for JNK/AP-1 pathway. *J Immunol* 2003; 170: 2557-63.