Gen TrkB: el eslabón en la lucha contra el neuroblastoma

Díaz Rosales Juan de Dios ,[1] Romo Jesús Eduardo,[2] Loera Omar F[3]

RESUMEN

Objetivo: *Es importante tener conocimiento de la genética molecular relacionada con la neurooncología, puesto que se han estado adquiriendo resultados tan trascendentales que permiten, por ejemplo, evidenciar genes implicados en el desarrollo tumoral, como es el caso del neuroblastoma (gen TrkB), y de aquí, partir hacia novedosos métodos encaminados a ensayos de diagnóstico y tratamiento.* ***Desarrollo:*** *Se ha desarrollado una línea celular que expresa al gen TrkB para investigar el sistema de señalización, por medio del cual la expresión del gen produce quimioresistencia, y si el BDNF endógeno podría activar el receptor TrkB e iniciar la transducción en células de neuroblastoma TrkB-transfectado, así como la habilidad neutralizadora de anticuerpos contra el BDNF e inhibidor Trk-selectivo para interferir con la activación autocrina.* ***Conclusiones:*** *El TrkB es capaz de proteger a las células del neuroblastoma contra una variedad de drogas citotóxicas, mientras que el BDNF es capaz de mediar el rescate celular, sugiriéndose que la habilidad del BDNF de activar el TRKB puede ser capaz de bloquear la apoptosis inducida.*

Palabras clave: *apoptosis, citotóxico, neuroblastoma, neurotrofina, quimioresistencia, protooncogén, neurooncología, genética molecular.*

Rev Mex Neuroci 2006; 7(4): 350-353

TrkB gene: The link in the fight against the neuroblastoma

ABSTRACT

Objective: *It is important to have a knowledge about the molecular genetics related to the neuro-oncology, since have been acquiring so transcendental results that permit, for example, to show genes implied in the tumorous development, as is the case of the neuroblastoma (gene TrkB), and from here, to leave toward novel methods directed to trials of diagnosis and processing.* ***Development:*** *A cell line has developed that express to the gene TrkB to investigate the system signs, through which the expression of the gene produces quimioresistence, and if the BDNF endogenous would be able to activate the receiver TrkB and to initiate the transduction in cells of neuroblastoma Trkb-transfected, as well as the neutralizator of antibodies ability against the BDNF and inhibiting Trk-Selective for interfere with the autocrine activation.* ***Conclusions:*** *The TrkB is capable of protecting to the cells of the neuroblastoma against a variety of cytotoxic drugs, while the BDNF is capable of mediating the cell rescue, being suggested that the ability of the BDNF to activating the TRKB can be capable of blocking the apoptosis induced.*

Key words: *apoptosis, cytotoxic, neuroblastoma, neurotrofine, quimioresistence, proto-oncogene, neuro-oncology, molecular genetics.*

Rev Mex Neuroci 2006; 7(4): 350-353

1. *Medicina, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, México. Médico de Pregrado, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Becario UACJ-Investigación 2003: Bionformática, Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.*
2. *Medicina, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, México. Médico de Pregrado, Centro Médico de Especialidades de Ciudad Juárez.*
3. *Medicina, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, México.*

Correspondencia:
Juan de Dios Díaz y Jesús Eduardo Romo
410 Nino Aguilera
El Paso, Texas 79901
(915) 533-76-93
juandedios@salud.gob.mx, jesusromo@salud.gob.mx

INTRODUCCIÓN

El neuroblastoma

El neuroblastoma (NB) es un tumor sólido extracraneal muy común en niños,[1] deriva de la cresta neural y usualmente se presenta en la médula adrenal o a lo largo de la cadena simpática.[2] Un poco más del 60% de los casos se presentan en menores de 5 años, afectando aproximadamente a 1 de cada 100,000 niños predominando en varones.[3]

El pronóstico varía según la entidad, en algunos casos puede resolverse de manera espontánea y sin tratamiento (apoptosis), o pudiese extirparse quirúrgicamente.[4] En otros casos, el tumor se disemina con rapidez y el pronóstico es desfavorable.

```
MSSWIRWHGP   AMARLWGFCW   LVVGFWRAAF   ACPTSCKCSA   SRIWCSDPSP   GIVAFPRLEP   60
NSVDPENITE   IFIANQKRLE   IINEDDVEAY   VGLRNLTIVD   SGLKFVAHKA   FLKNSNLQHI   120
NFTRNKLTSL   SRKHFRHLDL   SELILVGNPF   TCSCDIMWIK   TLQEAKSSPD   TQDLYCLNES   180
SKNIPLANLQ   IPNCGLPSAN   LAAPNLTVEE   GKSITLSCSV   AGDPVPNMYW   DVGNLVSKHM   240
NETSHTQGSL   RITNISSDDS   GKQISCVAEN   LVGEDQDSVN   LTVHFAPTIT   FLESPTSDHH   300
WCIPFTVKGN   PKPALQWFYN   GAILNESKYI   CTKIHVTNHT   EYHGCLQLDN   PTHMNNGDYT   360
LIAKNEYGKD   EKQISAHFMG   WPGIDDGANP   NYPDVIYEDY   GTAANDIGDT   TNRSNEIPST   420
DVTDKTGREH   LSVYAVVVIA   SVVGFCLLVM   LFLLKLARHS   KFGMKGPASV   ISNDDDSASP   480
LHHISNGSNT   PSSSEGGPDA   VIIGMTKIPV   IENPQYFGIT   NSQLKPDTFV   QHIKRHNIVL   540
KRELGEGAFG   KVFLAECYNL   CPEQDKILVA   VKTLKDASDN   ARKDFHREAE   LLTNLQHEHI   600
VKFYGVCVEG   DPLIMVFEYM   KHGDLNKFLR   AHGPDAVLMA   EGNPPTELTQ   SQMLHIAQQI   660
AAGMVYLASQ   HFVHRDLATR   NCLVGENLLV   KIGDFGMSRD   VYSTDYYRVG   GHTMLPIRWM   720
PPESIMYRKF   TTESDVWSLG   VVLWEIFTYG   KQPWYQLSNN   EVIECUTQGR   VLQRPRTCPQ   780
EVYELMLGCW   QREPHMRKNI   KGIHTLLQNL   AKASPVYLDI   LG                       822
```

Figura 1. Información de la secuencia TrkB: longitud de 822 aminoácidos con peso molecular de 91998 Da.

Clínicamente se presenta sintomatología variable,[5] acompañado de distensión abdominal secundaria a tumoración, hipertensión arterial y taquicardia en niños dentro del grupo de edad ya mencionado. Lógicamente están indicados estudios de imagen de alta sensibilidad (TC, IRM, gamagrafía)[6] y biopsia para su estudio histopatológico.[7]

Biológicamente, los neuroblastomas se dividen en dos grupos de tumores: uno con características favorables (histología favorable, hiperdiploidia, expresión de TrkA),[8] propensos a sufrir diferenciación o apoptosis, y otro con características desfavorables (histología desfavorable, amplificación N-Myc, supresión 1p, pérdida de heterozigocidad de 14q y expresión de TrkB),[8,9] frecuentemente metastáticos y con una supervivencia menor a 40%.[10]

El Gen, su expresión y la proteína

La genética molecular ha ido adquiriendo una importancia trascendental en el campo de la oncología infantil en los últimos años. Los avances han permitido evidenciar genes implicados en el desarrollo tumoral.[11]

En 1995, Nakagawara y cols. localizaron el gen NTrk2 en el locus 9q22.1,[10] y en 1997, Valent y cols., mediante hibridación fluorescente *in situ*, confirmaron la asignación del gen NTrk2 al locus 9q22.[12] Este gen es parte de la familia de los protooncogenes Trk, que codifican para receptores tirosine-kinasa, receptores de alta afinidad de las neurotrofinas.

El gen NTrk2 o TrkB codifica para la proteína tirosin-kinasa tipo II, clase IV (Figuras 1 y 2). La proteína TrkB es receptor de las siguientes neurotrofinas: BDNF, N-3 y la N-4/5, las cuales están involucradas en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso.[13]

En el SNC, la expresión es observada en la corteza cerebral, el hipocampo, tálamo, los plexos coroideos, la capa granular del cerebelo, el tallo y la médula espinal. En el SNP, el TrkB es expresado en muchos ganglios craneales, el nervio oftálmico, el sistema vestibular, múltiples estructuras faciales, las glándulas submaxilares y ganglios dorsales.

DESARROLLO

El TrkB es la clave en la quimioresistencia

Las neurotrofinas (NGF, BDNF, N-3 y N-4/5) son importantes para el crecimiento, supervivencia y diferenciación normal de neuronas del sistema sim-

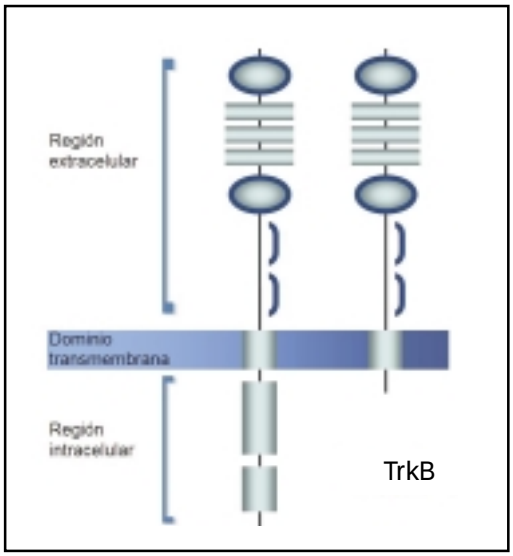

Figura 2. Estructura celular del receptor TrkB. Modificado de: Cancer Letters 2001; 160: 107-14.

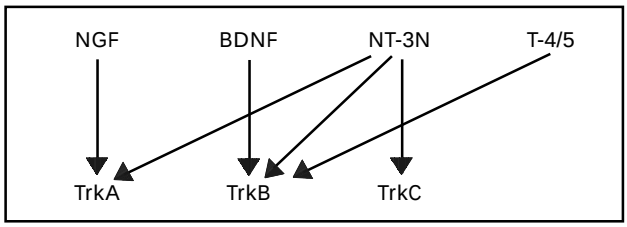

Figura 3. Neurotrofinas y sus preferencias por los receptores Trk. Modificado de: Cancer Letters 2001; 160: 107-14.

pático.[1] Los receptores de NGF, BDNF y Neurotrofina-3 son para TrkA, TrkB y el TRC, respectivamente. La N-3 puede unirse con todos los receptores Trk y la N-4 se une, preferentemente, con TrkB (Figura 3).

Se ha propuesto la hipótesis de que la expresión del BDNF y el TrkB (de naturaleza neuroectodérmica) podría contribuir directamente a su resistencia a la quimioterapia. Estudios indican que el BDNF aumenta la supervivencia de las células NB,[14] extensión neurítica,[14] invasión celular[15] y, finalmente, protege al NB de la citotoxicidad de la quimioterapia.[16]

Se ha desarrollado una línea celular que expresa TrkB: SY5Y, para investigar si la expresión del gen TrkB produce quimioresistencia. Esta línea celular es tan específica que no se detectan niveles de expresión de TrkA, TrkB o TrkC4, y con ello poder estudiar el impacto de un TrkB exógeno y su posterior exposición a quimioterapia *in vitro*.

Las células de la línea SY5Y, a las que se les introdujo TrkB mediante un vector plásmido, se dividieron en G12 y G7, los cuales tenían una expresión de la proteína TrkB en un nivel intermedio y alto, respectivamente (Figura 4).

Se investigó si el BDNF endógeno podría activar el receptor TrkB e iniciar la transducción en células de neuroblastoma TrkB-transfectado.

También se ha examinado la habilidad neutralizadora de los anticuerpos contra el BDNF (anti-BDNF) o del inhibidor Trk-selectivo (CEP-2563), para interferir con la activación autocrina.

La autofosforilación del p-145TrkB en G7 fue examinada por inmunoprecipitación con anticuerpos anti-Trk, seguido de anticuerpos antifosfotirosina por Western blot. En ausencia de tratamiento, la autofosforilación de p-145TrkB es detectada sugiriendo que la *autocrine loop* es activa, aunque los anticuerpos anti-BDNF y el inhibidor TrkB selectivo CPE-2563 bloquean la autofosforilación del p-145TrkB casi completamente (Figura 5).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las neurotrofinas tienen la capacidad de proteger al tejido neuronal normal de los daños físicos y químicos.[17,18] Se ha visto que el BDNF puede promover la supervivencia y quimiorresistencia en el neuroblastoma; aunque el mecanismo parecía desconocido, se ha demostrado que el BDNF/TrkB, mediante la activación de PI-3K, es capaz de bloquear la apoptosis de las células en el neuroblastoma que son tratadas con Etop, Doxo y Cis.[19]

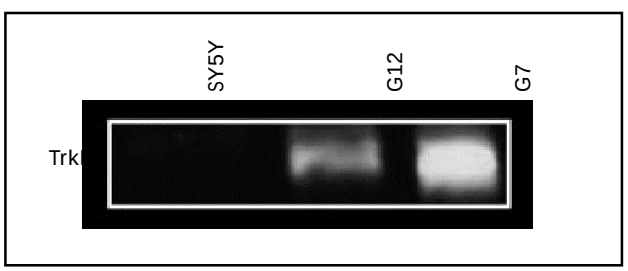

Figura 4. Expresión de la proteína TrkB en SY5Y, G2 y G7. Detectada por immunoblotting: CSIC y HUVN, Granada.

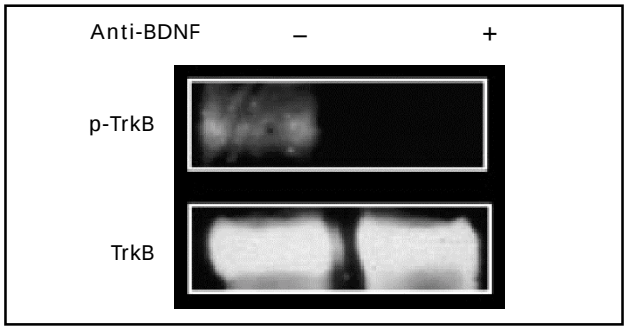

Figura 5. Las células fueron cultivadas en suero bovino fetal FBS a 2%, y posteriormente tratadas con BDNF 20 µg/ml y CEP 2563 100 nM por 48 hrs y 24 hrs, respectivamente. CSIC y HUVN, Granada.

Jaboin y cols.[19] definen que el mecanismo mediante el cual el BDNF bloquea la apoptosis inducida por la quimioterapia, es TrkB-dependiente, basándose en tres hallazgos según su estudio:

1. La incapacidad del NGF de proteger a las células del neuroblastoma de la quimioterapia.
2. Los hallazgos que sugieren que la acción del K252a es capaz de bloquear la habilidad de protección del BDNF.
3. Indicando que la activación de Trk tirosin-kinasa es necesaria para mediar los efectos del BDNF.

En adición, se determinó que esta quimioresistencia inducida puede inhibirse mediante un pretratamiento, con un inhibidor Trk kinasa o un inhibidor PI3-K. Con esto podemos suponer que la quimioterapia, en combinación con un inhibidor de PI-3-kinasa, podría impedir la quimioresistencia inducida por el BDNF. Como lo demuestran estudios previos, las neurotrofinas

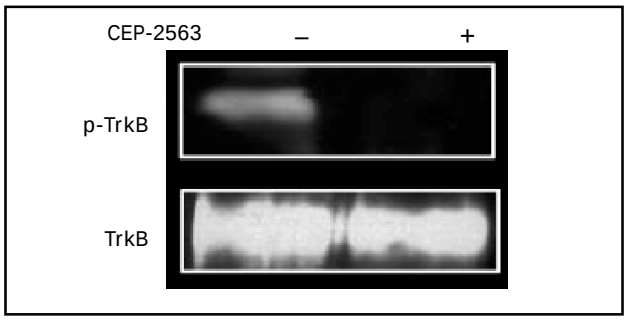

Figura 6. Las células lisadas fueron inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-Trak y marcadas con un anticuerpo antifosfotirosina. CSIC y HUVN, Granada.

(específicamente el BDNF) promueven la supervivencia y quimioprotección en el neuroblastoma.[1,18,19]

Estos resultados nos indican que el TrkB, además de ser un marcador de mal pronóstico, juega también un papel clave en la biología del neuroblastoma.[19]

El TrkB es capaz de proteger las células del NB de una variedad de drogas citotóxicas, de las cuales los mecanismos de acción van desde cambios en la polimerización de los microtúbulos, inhibición de la actividad de la topoisomerasa hasta la alkilación del DNA15; aún así, la inhibición de la vía PI3-K es suficiente para detener o prevenir los efectos protectores del BDNF.

A pesar de los diferentes mecanismos de acción de los agentes de quimioterapia, el BDNF es capaz de mediar el rescate celular; esto sugiere que la habilidad del BDNF de activar el TrkB para rescatar al NB de los efectos de la quimioterapia, podría ser el resultado de la modulación de una señalización molecular de supervivencia clave, capaz de bloquear la apoptosis inducida por cada una de las drogas usadas.

La abrogación de la actividad Trk tirosin-kinasa podría ser una herramienta importante para mejorar la eficacia de la quimioterapéutica.[19]

Aunque el K252a no ha sido usado clínicamente, una posible opción podría ser el CEP-751, un inhibidor Trk tirosin-kinasa derivado de K252a, capaz de inhibir el crecimiento de injertos de NB que expresan TrkB en modelos de ratones.[20, 21, 22]

REFERENCIAS

1. *Ho R, Eggert A, Hishiki T, Minturn JE, Ikegaki N, Foster P, et al. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. Cancer Res 2002; 62: 6462-6.*
2. *Israel MA, Hay RJ, Park JG, Gazdar A. Atlas of human tumor cell lines. San Diego: Academic Press; 1994,p. 42-78.*
3. *Prat R, Galeano I, Conde FJ, Febles P, Cortes S. Cerebral neuroblastomas: diagnosis and treatment. Rev Neurol 2002; 7: 688-90.*
4. *Javier G, Prats J, Sánchez de Toledo J. Treatment of neuroblastoma. Med Clin (Barc) 1991; 12: 467-70.*
5. *Goldsby RE, Matthay KK. Neuroblastoma: evolving therapies for a disease with many faces. Paediatr Drugs 2004; 2:107-22.*
6. *Kushner BH. Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies. J Nucl Med 2004; 45:1172-88.*
7. *Pello-Fonseca JM, Gómez-Díaz ME, Suárez-González JA, Corrales-Canel B, Castaño-González D, Muruamendiaraz-Fernández V. Retroperitoneal ganglioneuroma. Actas Urol Esp 1998; 22: 242-6.*
8. *Nakagawara A, Arima M, Azar CG, Scarvarda NJ, Brodeur GM. Inverse relationship between Trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. Cancer Res 1992; 52: 1364-8.*
9. *Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. J Clin Oncol 1999; 7: 2264-79*
10. *Nakagawara A, Liu XG, Ikegaki N, White PS, Yamashiro DJ, Nycum, L M, Biegel JA, Brodeur G M. Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTrk2). Genomics 1995: 25: 538-46.*
11. *López-Almaráz R, Montesdeoca-Melian A, Rodríguez-Luis J. The role of molecular genetics in childhood cancer. An Pediatr (Barc) 2003; 59: 334-44.*
12. *Valent A, Danglot G, Bernheim A. Mapping of the tyrosine kinase receptors TrkA (NTrk1), TrkB (NTrk2) and TrkC (NTrk3) to human chromosomes 1q22, 9q22 and 15q25 by fluorescence* in situ *hybridization. Europ J Hum Genet 1997; 5: 102-4.*
13. *Nakagawara A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. Cancer Letters 2001; 169: 107-14.*
14. *Nakawara A, Arima-Nakawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM. Association between high levels of expression of the Trk gene and favorable outcome in human neuroblastoma. N Engl J Med 1993; 328: 847-54.*
15. *Matsumoto K, Wada RK, Yamashiro JM, Kaplan DR, Thiele CJ. Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation and invasiveness of human neuroblastoma cells. Cancer Res 1995; 55: 1798-806.*
16. *Middlemas DS, Kihl BK, Zhou J, Zhu X. Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and chemoprotection of human neuroblastoma cells. J Biol Chem 1999; 27: 16451-60.*
17. *Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmer E, Kokaia M. Neurotrophins and brain insults. Trends Neurosci 1994; 17: 490-6.*
18. *Middlemas DS, Kihl BK, Moody NM. Brain derived neurotrophic factor protects human neuroblastoma cells from DNA damaging agents. J Neurooncol 1999; 45: 27-36.*
19. *Jaboin J, Kim CJ, Kaplan DR, Thiele CJ. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinasa pathway. Cancer Res 2002; 62: 6756-63.*
20. *Evans AE, Kisselbach KD, Liu X, Aggert A, Ikegaki N, Camoratto AM, Dionne C, et al. Effect of CEP-751 (KT-6587) on neuroblastoma xenografts expressing TrkB. Pediatr Oncol 2001; 36: 181-4.*
21. *Jennings RW, LaQuaglia MP, Leong K, et al. Fetal neuroblastoma: prenatal diagnosis and natural history. J Pediatr Surg 1993; 28: 1168-74.*
22. *Azizkhan RG, Haase GM. Current biologic and therapeutic implications in the surgery of neuroblastoma. Semin Surg Oncol 1993; 6: 493-501.*