

# Revista Mexicana de Patología Clínica

Volumen 52  
Volume

Número 1  
Number

Enero-Marzo 2005  
January-March

*Artículo:*

## TrkB: posible blanco en la terapia del neuroblastoma

Derechos reservados, Copyright © 2005:  
Federación Mexicana de Patología Clínica, AC

### Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

### *Others sections in this web site:*

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



**Medigraphic.com**

# TrkB: posible blanco en la terapia del neuroblastoma

**Palabras clave:** TrkB, neuroblastoma, factor neurotrófico derivado de cerebro.

**Key words:** TrkB, neuroblastoma, brain derived neurotrophic factor.

Recibido: 06/10/2004  
Aceptado: 25/11/2004

Juan de Dios Díaz-Rosales,<sup>\*,\*\*\*</sup> Omar F Loera,<sup>\*,\*\*\*</sup> Jesús E Romo,<sup>\*,\*\*\*</sup>  
Lilia Ortiz-Morales<sup>\*</sup>

- \* Escuela de Medicina, Instituto de Ciencias Biomédicas/Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Ciudad Juárez, Chih. Méx.  
\*\* Departamento de Patología, Hospital General de Ciudad Juárez. Ciudad Juárez, Chih. Méx.  
\*\*\* Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". México, D.F.

Correspondencia:  
Juan de Dios Díaz-Rosales  
Río Nazas 201, Col. Altavista, 74240 Atlixco, Puebla, México  
E-mail: juandedios@salud.gob.mx

## Resumen

Los neuroblastomas que expresan altos niveles de la proteína transmembrana TrkB y del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) están asociados con un mal pronóstico. Diversos estudios indican que BDNF/TrkB son capaces de disminuir la quimiosensibilidad del tumor a los agentes usados en la quimioterapia. Es evidente que la dupla BDNF/TrkB contribuye de manera directa a la quimiorresistencia de estos tumores y que la inhibición de fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI-3K) podría mejorar la acción de la quimioterapia.

## Summary

Neuroblastomas tumors expressing high levels of TrkB and brain derived neurotrophic factor (BDNF) are associated with poor prognosis. Diverse studies indicated that BDNF/TrkB are capable to decrease the chemosensitivity of neuroblastoma to agents of chemotherapy. It is evident that BDNF/TrkB contribute to the chemoresistance of neuroblastomas and that inhibition of PI-3K path could improve action of agents of chemotherapy.

13

## Introducción

### El gen, su expresión y la proteína

La expresión del gen NTRK2 se relaciona con un mal pronóstico en el neuroblastoma. En 1995, Nakagawara y colaboradores localizaron el gen NTRK2 en el locus 9q22.1<sup>1</sup> y, en 1997, Valent y su grupo, mediante hibridación fluorescente *in situ*, confirmaron la asignación del gen NTRK2 al locus 9q22.<sup>2</sup> Este gen es parte de la familia de los proto-

oncogenes Trk que codifican para receptores tirosina-cinasa, que son receptores de alta afinidad de las neurotrofinas de la familia del factor de crecimiento nervioso (NGF).<sup>3</sup>

El gen NTRK2, también llamado simplemente TrkB, codifica para la proteína tirosina-cinasa tipo II, clase IV (TrkB) (*figuras 1 y 2*). La proteína TrkB es receptor de las siguientes neurotrofinas: el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (N-3) y la neurotrofina-4/5 (N 4/5). Las funciones de las neurotrofinas<sup>4</sup> y sus recep-

|             |            |             |            |             |              |     |
|-------------|------------|-------------|------------|-------------|--------------|-----|
| MSSWIRWHGP  | AMARLWGFCW | LVVGFWRRAAF | ACPTSCKCSA | SRIWCSDPSP  | GIVAFPRLEP   | 60  |
| NSVDPENITE  | IFIANQKRLE | IINEDDVEAY  | VGLRNLTIVD | SGLKFVAHK   | FLKNSNLQHI   | 120 |
| NFTRNKLTS   | SRKHFRHLDL | SELILVGNP   | TCSCDIMWIK | TLQEAKSSPD  | TQDLYCLNES   | 180 |
| SKNIPLANLQ  | IPNCGLPSAN | LAAPNLTVEE  | GKSITLSCSV | AGDPVPNMYW  | DVGNLVSKHM   | 240 |
| NETSHTQGSL  | RITNISSDDS | GKQISCVAEN  | LVGEDQDSVN | LTvhFAPTT   | FLESPTSDHH   | 300 |
| WCIPFTVKGN  | PKPALQWFYN | GAILNESKYI  | CTKIHVTNHT | EYHGCLQLDN  | PTHMNNGDT    | 360 |
| LIAKNEYGKD  | EKQISAHFMG | WPGIDDGANP  | NYPDVIYEDY | GTAANDIGDT  | TNRSNEIPST   | 420 |
| DVTDKTGREH  | LSVYAVVVIA | SVVGFCLLV   | M          | LFLLKALARHS | KFGMKGPA     | 480 |
| LHHISNGSNT  | PSSSEGGPDA | VIIGMTKIPV  | IENPQYFGIT | NSQLKPD     | TVQHIKRHNIVL | 540 |
| KRELGEAGFG  | KVFLAECYNL | CPEQDKILVA  | VKTLKDASDN | ARKDFHREAE  | LLTNLQHEHI   | 600 |
| VKFYGVVCVEG | DPLIMFPEYM | KHGDLNKF    | AHGPD      | EGNPTELTQ   | SQMLHIAQQI   | 660 |
| AAGMVYLASQ  | HFVHRDLATR | NCLVGENLLV  | KIGDFGMSRD | VYSTDYYRVG  | GHTMLPRIWM   | 720 |
| PPESIMYRKF  | TTESDVWSLG | VVLWEIFTY   | G          | KQPWYQLSNN  | EVIECITQGR   | 780 |
| EVYELMLGCW  | QREPHMRKNI | KGIHTLLQNL  | AKASPVYLDI | LG          |              | 822 |

Figura 1. Información de la secuencia del TrkB: longitud de 822 aminoácidos, peso molecular de 91,998 Da.

tores<sup>3</sup> están involucradas en el desarrollo, mantenimiento, diferenciación y supervivencia del sistema nervioso central y periférico.

La isoforma TrkB es ampliamente expresada, principalmente en el tejido nervioso. En el sistema nervioso central (SNC), la expresión es observada

en corteza cerebral, hipocampo, tálamo, plexos coroideos, capa granular del cerebelo, tallo y médula espinal. En el sistema nervioso periférico (SNP), el TrkB es expresado en ganglios craneales, nervio oftálmico, sistema vestibular, glándulas submaxilares y ganglios dorsales.

## El neuroblastoma

El neuroblastoma es el tumor sólido extracranial más común en niños,<sup>5</sup> deriva de la cresta neural<sup>6</sup> y usualmente se presenta en la médula adrenal o a lo largo de la cadena simpática.<sup>7</sup> La mayoría de los neuroblastomas se presentan en la primera infancia; un poco más del 60% de los casos se registran en menores de cinco años. Si el tumor es prenatal, se puede diagnosticar mediante ecografía fetal.<sup>8</sup> Los niños con neuroblastoma presentan, en raras ocasiones, síntomas neurológicos paraneoplásicos, incluida la ataxia cerebelosa, opsoclonos y mioclonos.<sup>9</sup>

Clínica y biológicamente, los neuroblastomas pueden dividirse en al menos dos grupos de tumores: uno con características favorables (histología favorable, hiperdiploidía,<sup>10</sup> expresión de TrkA<sup>6,11</sup>) y otro con características desfavorables (histología desfavorable, amplificación N Myc, supresión ip, pérdida de la heterocigosidad de 14q<sup>12</sup> y expresión de TrkB).<sup>6,8</sup> Los neuroblastomas con características favorables son propensos a sufrir diferencia-

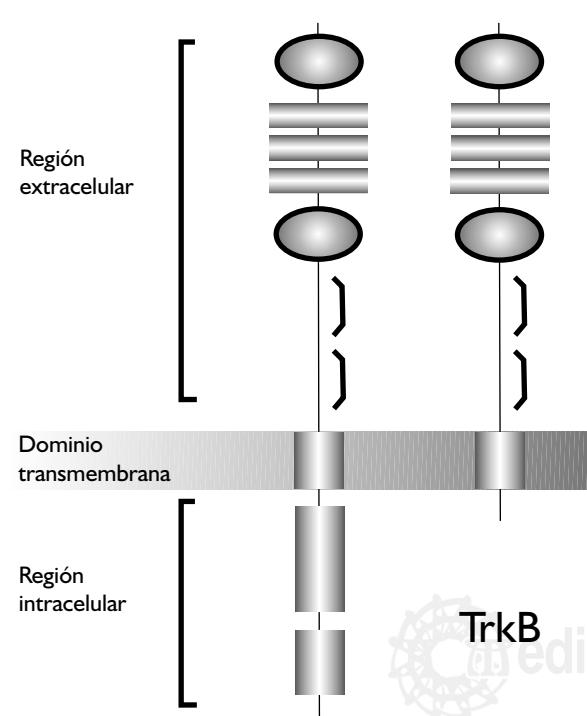
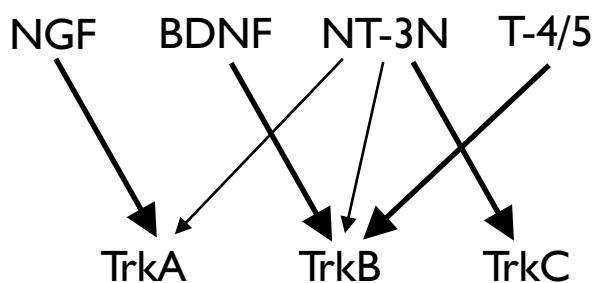


Figura 2. Estructura celular del receptor TrkB. Modificado de: *Cancer Letters* 2001; 169: 107-114.



**Figura 3.** Neurotrofinas y sus preferencias por los receptores Trk. Modificado de: *Cancer Letters* 2001; 169: 107-114.

ción o apoptosis; mientras que los neuroblastomas con características desfavorables son frecuentemente metastáticos y tienen un pobre pronóstico.<sup>5</sup> Aunque los tumores desfavorables suelen responder en un principio a la utilización de quimioterapia, usualmente presentan recurrencias y después desarrollo de resistencia al tratamiento. De hecho, la supervivencia de los pacientes con tumores con características desfavorables es menor de 40%.<sup>5</sup>

### El TrkB es la clave en la quimiorresistencia

Las neurotrofinas (NGF, BDNF, N-3 y N-4/5) son importantes para el crecimiento, supervivencia, diferenciación normal y protección del sistema nervioso.<sup>5,13</sup> Los receptores de factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y N-3 son: TrkA, TrkB y el TRC, respectivamente. La N-3 puede unirse a todos los receptores TRK y la N-4 se une preferentemente a TrkB (*figura 3*).

Se ha propuesto la hipótesis de que la expresión del BDNF y el TrkB por tumores de naturaleza neuroectodérmica podría contribuir de manera directa a su resistencia a la quimioterapia. Diversos estudios indican que el BDNF aumenta la supervivencia de las células del neuroblastoma, así como la extensión neurítica,<sup>17</sup> la invasión celular<sup>18</sup> y, finalmente, protege al neuroblastoma de

la citotoxicidad de la quimioterapia.<sup>19</sup> Ho y colaboradores demostraron que la vía BDNF/TrkB juega un papel importante, mediando la resistencia hacia una gran variedad de agentes quimioterapéuticos. La vía BDNF/TrkB es una vía autocri- na que al parecer juega un papel importante, mediando la resistencia del neuroblastoma,<sup>18</sup> aunque el mecanismo no es claro todavía. Para investigar el sistema de señalización por medio del cual la expresión del gen TrkB produce quimiorresistencia, se ha desarrollado una línea celular que no expresa TrkB: SY5Y.

La línea celular SH-SY5Y es un tipo celular específico en el que no se detectan niveles de expresión de TrkA, TrkB o TrkC, en la cual se estudia el impacto de TrkB exógeno y su posterior exposición a quimioterapia *in vitro*.

Los estudios demuestran que las células de la línea SY5Y, a las que se les introdujo el gen TrkB mediante un vector plásmido, expresan la proteína TrkB en niveles intermedio y alto (G7 y G12). Utilizando este modelo, se investigó si el BDNF endógeno podría activar el receptor TrkB e iniciar la transducción en células de neuroblastoma TrkB-transfectado. También se examinó la capacidad neutralizadora de los anticuerpos contra el BDNF (anti-BDNF) y del inhibidor Trk-selectivo (CEP-2563) para interferir con la activación autocrina.<sup>5</sup>

La autofosforilación del p-145TRKB en G7 (línea que expresa de forma intermedia la proteína TrkB) fue examinada por inmunoprecipitación con anticuerpos anti-Trk seguido de anticuerpos anti-fosfotirosina por *Western blot*. En ausencia de tratamiento con anticuerpos anti-BDNF o inhibidor Trk-selectivo, la autofosforilación de p-145TRKB es detectada, lo que sugiere que la actividad del gen transfundido es activa.

Al analizar los efectos de la expresión del TrkB en las células SY5Y sometidas a quimioterapia *in vitro*, el porcentaje de supervivencia fue significativamente alto, los niveles de TrkB eran proporcionales a la supervivencia demostrada por las células de neuroblastoma.<sup>5</sup>

Cuando las células SY5Y fueron tratadas con anti-BDNF más quimioterapia, el porcentaje de supervivencia celular fue significativamente menor, comparado con las células tratadas sólo con la quimioterapia.<sup>5</sup>

## Conclusiones

Las neurotrofinas tienen la capacidad de proteger al tejido neuronal normal de los daños físicos y químicos.<sup>13</sup> Se ha visto que el BDNF puede promover la supervivencia y quimiorresistencia en el neuroblastoma, aunque el mecanismo parecía desconocido hace poco; sin embargo, recientemente se ha demostrado que el BDNF/TrkB, mediante la activación de fosfatidil-inositol-3 cinasa (PI-3K), es capaz de bloquear en el neuroblastoma la apoptosis de las células que son tratadas con etoposide,<sup>20</sup> doxorubicina y cisplatino,<sup>11</sup> agentes quimioterapéuticos usados en el tratamiento de este tumor y de los cuales los mecanismos de acción van desde cambios en la polimerización de los microtúbulos, inhibición de la actividad de la topoisomerasa, hasta la alquilación del ADN.<sup>15</sup>

Basándose en su estudio, Jaboin y colaboradores señalan que el mecanismo mediante el cual el BDNF bloquea la apoptosis inducida por la quimioterapia es TrkB-dependiente, debido a: a) la incapacidad del NGF de proteger a las células del neuroblastoma de la quimioterapia, b) los hallazgos que sugieren que la acción del K252a (un inhibidor selectivo de Trk tirosina-kinasa) es capaz de bloquear la habilidad de protección del BDNF en las células del neuroblastoma expuestas a quimioterapia, lo que indica que la activación de Trk tirosina-kinasa es necesaria para mediar los efectos del BDNF.<sup>15</sup>

Además, se ha determinado que la quimiorresistencia inducida mediante la vía BDNF-Trk puede inhibirse mediante un pretratamiento con un inhibidor Trk cinasa o un inhibidor PI3-K. Con esto podemos suponer que la quimioterapia, en combinación con un inhibidor del tipo mencionado, podría impedir la quimiorresistencia del neuroblastoma.

16

Como lo demuestran estudios previos, las neurotrofinas (específicamente el BDNF) promueven la supervivencia y quimiorresistencia en el neuroblastoma.<sup>5,14,15</sup> 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.

La PI-3K podría representar un blanco farmacológico combinado con la quimioterapia en el tratamiento del neuroblastoma;<sup>11,15</sup> aunque los inhibidores selectivos de la PI-3K no han sido usados clínicamente, una posible opción podría ser el CEP-751 (inhibidor Trk tirosina-cinasa derivado de K252a) capaz de inhibir el crecimiento de injertos de neuroblastoma que expresan TRKB en modelos de ratones.<sup>16</sup>

En la actualidad, se busca determinar los sitios en la vía bioquímica de PI3-K necesarios para mediar la quimiorresistencia que ofrece la dupla BDNF/TRKB, para una delineación precisa de la señalización y, con esto, conducirnos a un sitio blanco específico para usarlo en el tratamiento del neuroblastoma.

## Agradecimientos

Agradecemos a la Ing. Cristina Rosas por su valiosa crítica en la estructura del texto y al Departamento de Investigación de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez por el apoyo otorgado durante el verano de investigación 2003.

## Referencias

1. Nakagawara A, Liu X-G, Ikegaki N, White PS, Yamashiro DJ, Nycum LM et al. Cloning and chromosomal localization of the human Trk-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics* 1995; 25: 538-546.
2. 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: 102-104.
3. Nakagawara A. Trk receptor tyrosine kinases: A bridge between cancer and neural development. *Cancer Letters* 2001; 169: 107-114.
4. Yano H, Chao MV. Neurotrophin receptor structure and interactions. *Pharma Acta Helv* 2000; 74: 253-260.

5. Ho R, Eggert A, Hishiki T, Minturn JE, Ikegaki N, Foster P, Camoratto AM, Evans AE, Brodeur GM. Resistance to chemotherapy mediated by TRKB in neuroblastomas. *Cancer Res* 2002; 62: 6462-6466.
6. Brodeur G, Pritchard J, Berthold F, Canseri N, Castel V. Revision of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1466-1477.
7. Israel MA, Hay RJ, Park JG, Gazdar A. *Atlas of human tumor cell lines*. San Diego: Academic Press, 1994; 42-78.
8. Jennings RW, LaQuaglia MP, Leong K. Fetal neuroblastoma: prenatal diagnosis and natural history. *J Pediatr Surg* 1993; 28: 1168-1174.
9. Azizkhan RG, Haase GM. Current biologic and therapeutic implications in the surgery of neuroblastoma. *Semin Surg Oncol* 1993; 6: 493-501.
10. Nakagawara A, Arima M, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Inverse relationship between TRK expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. *Cancer Res* 1992; 52: 1364-1368.
11. Jaboin J, Hong A, Kim CJ, Thiele CJ. Cisplatin-induced cytotoxicity is blocked by brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB signal transduction path in neuroblastoma. *Cancer Letters* 2003; 193: 109-114.
12. Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2264-2279.
13. Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmer E, Kokaia M. Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci* 1994; 17: 490-496.
14. Middlemas DS, Kihl BK, Moody NM. Brain derived neurotrophic factor protects human neuroblastoma cells from DNA damaging agents. *J Neurooncol* 1999; 45: 27-36.
15. 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'-kinase pathway. *Cancer Res* 2002; 62: 6756-6763.
16. Evans AE, Kisselbach KD, Liu X, Aggert A, Ikegaki N, Camoratto AM et al. Effect of CEP-751 (KT-6587) on neuroblastoma xeno-grafts expressing TrkB. *Pediatr Oncol* 2001; 36: 181-184.
17. 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: 847-854.
18. 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: 1798-1806.
19. Middlemas DS, Kihl BK, Zhou J, Zhu X. Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and chemoprotection of human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 16451-16460.
20. Jaboin J, Kim CJ, Kaplan DR, Thiele CJ. BDNF activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via PI-3 kinase. *Cancer Res* 2003; 62: 6756-6763.