

Receptor TRKB y conexina 43 en cáncer de ovario

Maritza Garrido P., Carmen Romero O.

Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción, Depto. Obstetricia y Ginecología, HCUCH.

SUMMARY Ovarian cancer is one of the most aggressive and poor prognosis cancer, which appears predominantly as Epithelial Ovarian Cancer (EOC). Many studies have been conducted to establish connections between neurotrophin receptors and the development, progression and response of cancer therapy. The tyrosine kinases receptors (TRK) have been considered as important target in several cancers, including EOC. Metastatic process and resistance to cancer therapies have been associated with the TRK neurotrophin receptor B (TRKB), whose main ligand is brain derived neurotrophic ligand (BDNF). Another important aspect in tumor development is the expression of adhesion molecules such as connexin 43. This protein is present in many tissues included the ovary and cancer cells. When TRK receptors are activated by their ligands, connexin 43 is phosphorylated and promotes several processes in tissues, like remodeling gap junctions and cellular permeability. All these features are very important in tumor cells, and probably would be involved in the process of metastasis, tumor growth and arrival of nutrients and therapy drugs to the tumor mass. The aim of this review is to expose current knowledge about connexin 43 and TRKB receptor in ovarian cancer.

INTRODUCCIÓN

La célula necesita comunicarse con su microambiente para mantener la homeostasis tisular. Para lograr este propósito, una señal química o ligando interacciona con un receptor específico celular. Esta interacción o mensaje es traducido por la célula, la que responde modificando su expresión proteica y provocando diversos cambios en su funcionamiento. Este proceso de comunicación en las células cancerígenas se encuentra alterado, por lo que se han estudiado diversas familias de

receptores, como los receptores tirosina quinasa y el rol que estarían cumpliendo en el contexto del cáncer. Estos receptores se encuentran presentes en una gran variedad de tejidos, incluyendo el ovario.

La presente revisión contempla nuevos aportes en el conocimiento del cáncer, específicamente acerca del rol que tiene el receptor TRKB y una de las proteínas de conexión, como la conexina 43, postulando la hipótesis de una relación entre TRKB y esta proteína en cáncer de ovario epitelial (COE).

CÁNCER OVÁRICO

El ovario es la gónada femenina cuyas funciones son la foliculogénesis y esteroidogénesis, procesos que implican la liberación del gameto femenino (ovocito) y la producción de hormonas esteroidales⁽¹⁾. Estos procesos no solo están regulados por el eje hormonal hipotálamo-hipófisis-gónada, sino también por estímulos habitualmente considerados nerviosos, como neurotransmisores y neurotrofinas⁽²⁾. Ejemplos de ello son la norepinefrina, el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) o los receptores tirosina quinasa A y B (TRKA y TRKB), involucrados no solo en los procesos fisiológicos ováricos, sino también en procesos patológicos y neoplásicos. Además el ovario es un órgano que tiene un ambiente enriquecido en factores de crecimiento y citoquinas, procesos desencadenados durante la ovulación, por lo que se piensa que junto con las altas condiciones de angiogénesis⁽³⁾, favorecería la transformación de células normales en células malignas.

Tomando en cuenta que el cáncer constituye la segunda causa de muerte en Chile -después de las enfermedades cardiovasculares⁽⁴⁾- y que dentro de los diferentes tipos de cáncer, uno de los más agresivos y de peor pronóstico es el cáncer ovárico -el que constituye la segunda causa de muerte por cáncer de origen ginecológico⁽⁵⁾-, se hace muy importante estudiar los mecanismos involucrados en su progresión y proponer nuevas moléculas blancas para futuros tratamientos. De las diferentes neoplasias malignas que afectan el ovario, un 70-80% corresponde a COE. Debido a su tardío diagnóstico, el COE presenta una baja supervivencia (31% a los 5 años)^(6,7), lo que indicaría que existen mecanismos más complejos y no estudiados que están involucrados en la aparición del cáncer, su progresión y resistencia a terapia⁽⁶⁾. En este contexto, se han publicado varios estudios acerca del rol de los receptores de neurotrofinas y la interac-

ción con sus receptores en cáncer. Muchos de ellos apuntan a los receptores de la familia tirosina quinasa (TRK), en especial el subtipo TRKB⁽⁸⁾.

RELACIÓN ENTRE LOS RECEPTORES TIROSINA QUINASA Y CÁNCER

Los receptores TRK pertenecen a la familia de receptores tirosina quinasa, cuyos ligandos son las neurotrofinas. Existen 3 subtipos: TRKA, TRKB y TRKC. Estos receptores juegan un rol clave en el desarrollo y mantención del sistema nervioso central. En la actualidad se ha encontrado que tienen participación en una gran cantidad de procesos fisiológicos en tejidos y órganos no neuronales⁽⁹⁻¹¹⁾. Un ejemplo de ello es la presencia de los receptores TRK en el ovario que participan en los procesos de foliculogénesis y esteroidogénesis^(12,13), así como también en procesos fuertemente relacionados con cáncer: angiogénesis, invasión celular y pérdida de la anoikis (muerte celular programada debido a la ausencia del anclaje célula-célula)⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Los receptores TRK al unirse a sus respectivos ligandos activan cascadas de señalización intracelulares, promoviendo diversas vías, lo que se traduce en efectos como supervivencia y angiogénesis⁽¹¹⁾, características fundamentales para células malignas.

Existen muchos estudios que apuestan a un desbalance de los receptores TRK en procesos neoplásicos⁽¹⁵⁾. Entre ellos hay trabajos publicados previamente por nuestro grupo de investigación, en los cuales se encontró que la activación del receptor TRKA por su ligando NGF está involucrado en la proliferación celular y angiogénesis en COE^(17,18). Además los niveles proteicos y transcritos del receptor TRKA van aumentando con la progresión del COE⁽¹⁸⁾, sugiriendo que el receptor TRKA puede ser considerado un marcador de mal pronóstico.

Otro blanco de investigación muy mencionado en la literatura corresponde al receptor TRKB.

Se han acumulado evidencias que relacionan la señalización alterada de este receptor con la promoción tumoral y metástasis en diferentes tipos de cáncer como neuroblastoma, cáncer de pulmón y ovario^(8,14,15). Además estudios observacionales vinculan la resistencia de terapias oncológicas con la presencia y activación de TRKB^(9,19).

Particularmente la activación del receptor TRKB a través de su ligando preferente, el factor neurotrófico derivado de cerebro o BDNF, provoca la autofosforilación de residuos de tirosina (Figura 1). Estos cambios químicos sirven para reclutar proteínas adaptadoras y producen la activación de diferentes vías de señalización intracelular que incluyen fosfoinositol 3 quinasa (PI3K), fosfolipasa gamma C (PLγC), y proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK)⁽¹¹⁾. Todas estas vías de señaliza-

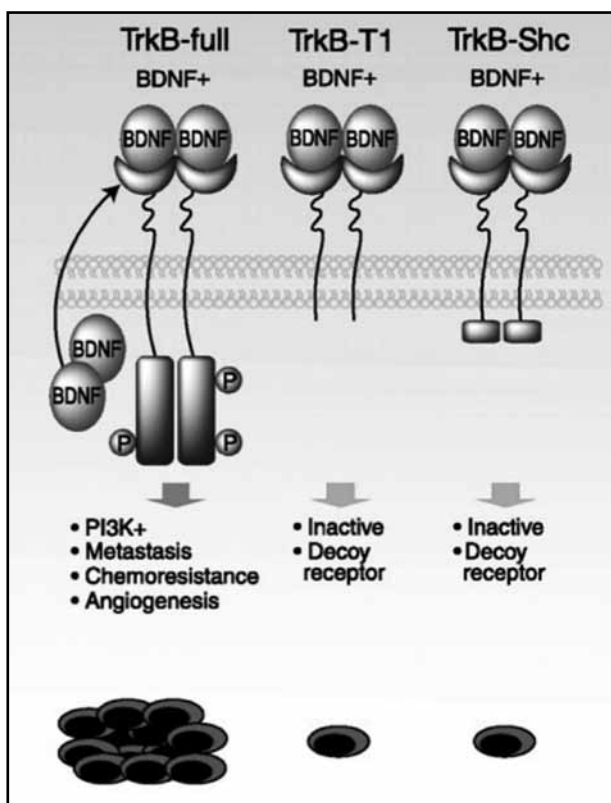


Figura 1. Efectos de la activación del receptor TRKB. La activación de la isoforma completa del receptor por la interacción con su principal ligando, BDNF, se ha vinculado a quimiorresistencia y angiogénesis en neuroblastoma⁽¹⁵⁾

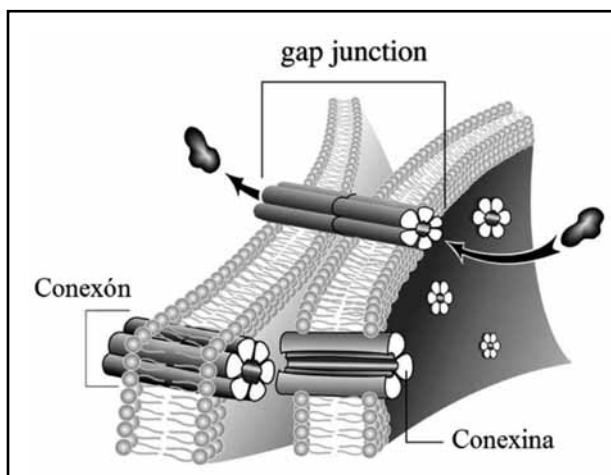


Figura 2. Estructura de una unión tipo *gap junction*. Células vecinas establecen uniones tipo *gap junction* para anclar sus membranas y regular la permeabilidad celular. La membrana de cada célula posee un conexón, conformado por un conjunto de proteínas llamadas conexinas⁽²¹⁾.

ción juegan un importante rol para los procesos de diferenciación, proliferación y supervivencia celular⁽⁸⁾, procesos finamente regulados de manera fisiológica por la célula, pero se cree que estarían desregulados en las células tumorales.

CONEXINA 43 Y CÁNCER

Las conexas son una familia de proteínas presente en las uniones celulares, del tipo *gap-junction*⁽²⁰⁾. Las uniones *gap* son canales que conectan el contenido intracelular de células vecinas, lo que se traduce en el flujo de iones y otras sustancias junto a un anclaje de las membranas (Figura 2), permitiendo la unión celular característica en los diferentes tejidos⁽²²⁾.

El rol de las conexas en cáncer ha sido bastante controversial, debido a que su funcionamiento y contribución a la progresión tumoral, al parecer, depende de varios factores: el establecimiento de uniones *gap* favorece el crecimiento tumoral⁽²³⁾, la adherencia e invasión a tejidos adyacentes y la presencia de nuevos focos tumorales^(24,25), pero la disminución del anclaje célula-célula puede significar una mayor capacidad de desprendimiento de

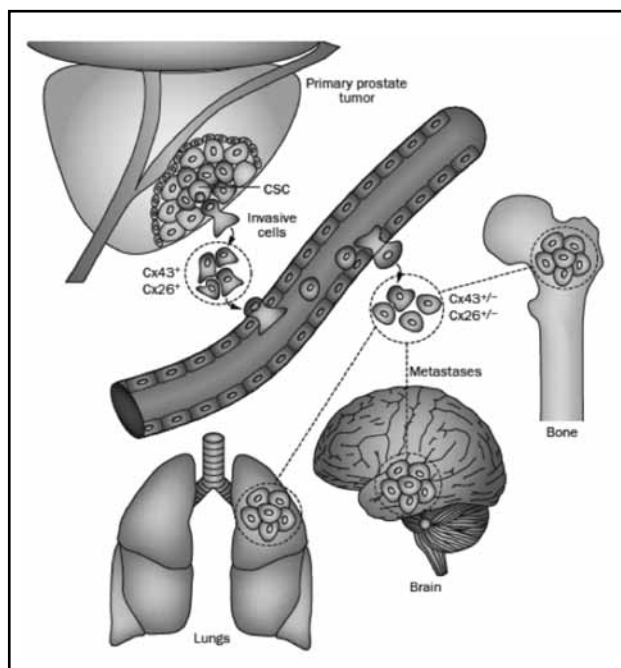


Figura 3. Mecanismo hipotético que involucra a las conexinas dependiendo de la etapa de progresión del cáncer prostático. La inhibición de las conexinas y/o uniones *gap* facilita la proliferación descontrolada y patrones de diferenciación aberrantes de células tumorales, promoviendo el cáncer. Entre la población de células cancerosas que existen, aquellas que no han perdido o han reanudado la expresión de conexinas, tendrían el potencial de invasión y colonización en otros órganos, produciendo metástasis²⁵. Cx: conexina. CSC: cancer stem cell.

células de la masa tumoral original (Figura 3). Así también, el incremento de conexinas ha tomado especial relevancia en las células endoteliales en el contexto de la neovascularización⁽²⁶⁾ y llegada de nutrientes al tumor, por lo que estas proteínas se han convertido en un blanco interesante de estudiar en cáncer.

Existen muchos tipos de conexinas, pero una de las más abundantes, ubicuas y estudiadas es conexina 43, presente también en el ovario⁽²⁷⁾. Conexina 43 no solo es una proteína que permite el anclaje célula-célula, sino que también es capaz de regular otros importantes aspectos del funcionamiento de la célula, tales como supervivencia, apoptosis y ciclo celular⁽²⁸⁻³⁰⁾, contribuyendo a la regulación del tamaño de las masas celulares en

los tejidos. El control del funcionamiento de esta proteína se realiza mediante modificaciones químicas, tales como fosforilación y desfosforilación de algunos aminoácidos de su estructura proteica⁽²⁸⁾. En las células cancerosas existe un funcionamiento celular anormal, por lo que el proceso de modificación química de conexina 43 probablemente está alterado, lo que produce cambios en el funcionamiento y distribución de las uniones *gap*. Esta no solo modifica el proceso de anclaje celular, sino que además puede estar relacionado con la capacidad metastásica y posteriormente estaría involucrada en el proceso de progresión de la masa tumoral^(26,31-34).

Conexina 43 puede ser fosforilada y por consiguiente modificada por la acción de muchas proteínas quinasa, mediante la activación de cascadas de señalización; esto produce diversos efectos celulares, pero uno de los más relevantes es la modificación de las uniones *gap*^(21,35-38). Bajo este contexto, conexina 43 se ha estudiado, en conjunto con la activación de diferentes receptores tipo tirosina quinasa en cáncer⁽³⁵⁾, como el receptor de crecimiento epidermal (EGF-R) y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R). Estos activan la vía PKC^(37,39) que produce la fosforilación de conexina 43 en el residuo de serina 368, desencadenando cambios de permeabilidad celular e incrementando la capacidad de migrar desde el tumor original,^(38,40,41) aspecto que podría tener asociación con metástasis y resistencia a terapias oncológicas.

Al igual que los efectos mencionados por los receptores de EGF y PDGF, otros estudios han demostrado que la endotelina, un potente mitógeno que está sobreexpresado en una gran cantidad de cánceres, a través de la unión a su receptor ET_AR promueve la proliferación de las células tumorales, neovascularización e invasividad⁽³²⁾. Se sabe además que la activación del receptor ET_AR produce fosforilación de conexina 43 vía PLC-PKC

en células de carcinoma ovárico⁽³²⁾, lo cual nuevamente evidencia una posible conexión entre la activación de cascadas de señalización vía PLC y la modificación de uniones *gap* mediante fosforilación de conexina 43.

De manera complementaria, es muy interesante destacar que en estudios realizados en células cardíacas con isquemia prolongada, condición semejante al ambiente del tumor en las primeras etapas de crecimiento, existe un curioso mecanismo de protección celular: ocurre fosforilación de conexina 43 por diferentes quinasas, entre ellas PKC. Esto produce inhibición de la apoptosis, estabilización del citoesqueleto, preservación de la función mitocondrial, regulación de la permeabilidad selectiva y la remodelación de las uniones *gap*⁽⁴²⁾. Este mecanismo de protección podría relacionarse con el funcionamiento y sobrevivencia de las células tumorales en el centro de la masa tumoral, o bien, probablemente sería muy importante para que las células que salen al torrente circulatorio y son responsables de la metástasis, puedan sobrevivir hasta que colonicen nuevos tejidos.

¿Podría existir una relación entre conexina 43 y el receptor TRKB en COE?

En muchos tejidos los receptores de la familia tirosina quinasa son capaces de modificar química-

mente a proteínas, tales como conexina 43^(35,37), por lo que el receptor TRKB, que pertenece a la misma familia, al unirse con su principal ligando (BDNF) y activarse, eventualmente podría modificar a conexina 43^(23,37,39).

Como se mencionó anteriormente, la interacción de TRKB y BDNF provoca su autofosforilación en residuos tirosina (tyr). La fosforilación de tyr816 activa la vía PLC γ 1-PKC, lo que conlleva a la fosforilación de otras proteínas⁽¹¹⁾. Justamente esta vía se ha asociado previamente a la fosforilación de conexina 43 en otros receptores de la familia tirosina quinasa^(23,35,37,40). Esto, sumado a que la presencia del receptor TRKB en cáncer de ovario se asocia a la promoción de metástasis, migración celular, inhibición de apoptosis y una menor recuperación de pacientes con cáncer⁽⁴³⁾, nos hace pensar que podría existir una conexión entre el receptor TRKB y conexina 43. Otro antecedente relevante se extrae de experimentos realizados en ovario de rata, los cuales demostraron que el factor de crecimiento nervioso (NGF) al activar su receptor de alta afinidad TRKA, provoca la fosforilación de conexina 43 y por consiguiente, la disrupción de las uniones *gap* en células tecales⁽⁴⁴⁾.

Se hace necesario entonces realizar otros estudios en esta área, tanto para seguir conociendo el rol de los receptores de neurotrofinas (TRKA y TRKB) en cáncer, así como para aclarar el rol de las conexinas y especialmente conexina 43 en COE.

REFERENCIAS

1. Leung P, Dashi E. The Ovary. San Diego. 3^o ed. San Diego, California, 2004:3-44.
2. Ojeda SR, Dissen GA, Junier MP. Neurotrophic factors and female sexual development. *Front Neuroendocrinol* 1992;13:120-62.
3. Murdoch WJ, McDonnell AC. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction* 2002;123:743-50.
4. Echevarria W, Nathanson MH. Gap junctions in the liver. En: Trauner M, Jansen P. *Molecular pathogenesis of cholestasis*. New York: Springer Science-Business Media, 2003: 36-43.
5. Banerjee S, Kaye S. The role of targeted therapy in ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2011;47 Suppl 3: S116-30.
6. Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. *Lancet* 2009;374:1371-82.
7. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 2001;22:255-88.
8. Desmet CJ, Peeper DS. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell Mol Life Sci* 2006;63:755-9.
9. Meakin SO, Shooter EM. The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci* 1992;15:323-31.
10. Lei L, Parada LF. Transcriptional regulation of Trk family neurotrophin receptors. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:522-32.
11. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361:1545-64.
12. Dissen GA, Hirshfield AN, Malamed S, Ojeda SR. Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology* 1995;136: 4681-92.
13. Salas C, Julio-Pieper M, Valladares M, Pommer R, Vega M, Mastronardi C *et al*. Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:2396-403.
14. Bassili M, Birman E, Schor NF, Saragovi HU. Differential roles of Trk and p75 neurotrophin receptors in tumorigenesis and chemoresistance ex vivo and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;65:1047-56.
15. Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R, Varela CR, Light JE *et al*. Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 2009;15:3244-50.
16. Yu X, Liu L, Cai B, He Y, Wan X. Suppression of anoikis by the neurotrophic receptor TrkB in human ovarian cancer. *Cancer Sci* 2008;99:543-52.
17. Campos X, Muñoz Y, Selman A, Yazigi R, Moyano L, Weinstein-Oppenheimer C *et al*. Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2007;104:168-75.
18. Tapia V, Gabler F, Muñoz M, Yazigi R, Paredes A, Selman A *et al*. Tyrosine kinase A receptor (trkA): a potential marker in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2011;121:13-23.
19. Odate S, Nakamura K, Onishi H, Kojima M, Uchiyama A, Nakano K *et al*. TrkB/BDNF signaling pathway is a potential therapeutic target for pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. *Lung Cancer* 2013;79:205-14.

20. Oyamada M, Oyamada Y, Takamatsu, T. Regulation of connexin expression. *Biochim Biophys Acta* 2005;1719:6-23.
21. Ministerio de Salud Gobierno de Chile. Programa Nacional de Cáncer. www.redsalud.gov.cl/archivos/cancer/PROGRNACCANCER.pdf
22. Maeda S, Tsukihara T. Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:1115-29.
23. Park JM, Munoz JL, Won BW, Bliss SA, Greco SJ, Patel SA *et al.* Exogenous CXCL12 activates protein kinase C to phosphorylate connexin 43 for gap junctional intercellular communication among confluent breast cancer cells. *Cancer Lett* 2013;331:84-91.
24. Li Z, Zhou Z, Welch DR, Donahue HJ. Expressing connexin 43 in breast cancer cells reduces their metastasis to lungs. *Clin Exp Metastasis* 2008;25:893-901.
25. Czyz J, Szpak K, Madeja Z. The role of connexins in prostate cancer promotion and progression. *Nat Rev Urol* 2012;9:274-82.
26. Gould VE, Mosquera JM, Leykauf K, Gattuso P, Duerst M, Alonso A *et al.* The phosphorylated form of connexin43 is up-regulated in breast hyperplasias and carcinomas and in their neoformed capillaries. *Hum Pathol* 2005;36:536-45.
27. Gershon E, Plaks V, Dekel N. Gap junctions in the ovary: expression, localization and function. *Mol Cell Endocrinol* 2008;282:18-25.
28. Vinken M, Decrock E, De Vuyst E, Ponsaerts R, D'hondt C, Bultynck G *et al.* Connexins: sensors and regulators of cell cycling. *Biochim Biophys Acta* 1815, 13-25.
29. Kardami E, Banerji S, Doble BW, Dang X, Fandrich RR, Jin Y *et al.* PKC-dependent phosphorylation may regulate the ability of connexin43 to inhibit DNA synthesis. *Cell Communication & Adhesion* 2003;10:293-7.
30. Solan JL, Fry MD, TenBroek EM, Lampe PD. Connexin43 phosphorylation at S368 is acute during S and G2/M and in response to protein kinase C activation. *J Cell Sci* 2003;116:2203-11.
31. Solan JL, Hingorani SR, Lampe PD. Changes in connexin43 expression and localization during pancreatic cancer progression. *J Membr Biol* 2012;245:255-62.
32. Spinella F, Rosanò L, Di Castro V, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 decreases gap junctional intercellular communication by inducing phosphorylation of connexin 43 in human ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2003;278:41294-301.
33. Li X, Liao QP. [Expression of connexin 43 in ovarian cancer and its relationship with chemoresistance]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2009;44:50-5.
34. Ogawa K, Pitchakarn P, Suzuki S, Chewonarin T, Tang M, Takahashi S *et al.* Silencing of connexin 43 suppresses invasion, migration and lung metastasis of rat hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci* 2012;103:860-7.
35. Warn-Cramer BJ, Lau AF. Regulation of gap junctions by tyrosine protein kinases. *Biochim Biophys Acta* 2004;1662:81-95.
36. Johnson KE, Mitra S, Katoch P, Kelsey LS, Johnson KR, Mehta PP. Phosphorylation on Ser-279 and Ser-282 of connexin43 regulates endocytosis and gap junction assembly in pancreatic cancer cells. *Mol Biol Cell* 2013;24:715-33.
37. Cameron SJ, Malik S, Akaike M, Lerner-Marmarosh N, Yan C, Lee JD *et al.* Regulation of epidermal growth factor-induced connexin 43 gap junction communication by big mitogen-activated protein kinase1/ERK5 but

- not ERK1/2 kinase activation. *J Biol Chem* 2003;278:18682-8.
38. Bao X, Reuss L, Altenberg GA. Regulation of purified and reconstituted connexin 43 hemichannels by protein kinase C-mediated phosphorylation of Serine 368. *J Biol Chem* 2004;279:20058-66.
 39. Hossain MZ, Jagdale AB, Ao P, Kazlauskas A, Boynton AL. Disruption of gap junctional communication by the platelet-derived growth factor is mediated via multiple signaling pathways. *J Biol Chem* 1999;274:10489-96.
 40. Ek-Vitorin JF, King TJ, Heyman NS, Lampe PD, Burt JM. Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C-dependent phosphorylation. *Circ Res* 2006;98:1498-505.
 41. Lin D, Takemoto DJ. Oxidative activation of protein kinase Cgamma through the C1 domain. Effects on gap junctions. *J Biol Chem* 2005;280:13682-93.
 42. Jeyaraman MM, Srisakuldee W, Nickel BE, Kardami E. Connexin43 phosphorylation and cytoprotection in the heart. *Biochim Biophys Acta* 2012;1818:2009-13.
 43. Au CW, Siua MKY, Liao X, Wonga ESY, Nganb HYZ, Tamb KF *et al.* Tyrosine kinase B receptor and BDNF expression in ovarian cancers - Effect on cell migration, angiogenesis and clinical outcome. *Cancer Lett* 2009;281:151-61.
 44. Mayerhofer A, Dissen GA, Parrott JA, Hill DF, Mayerhofer D, Garfield RE *et al.* Involvement of nerve growth factor in the ovulatory cascade: trkA receptor activation inhibits gap junctional communication between thecal cells. *Endocrinology* 1996;137:5662-70.

CORRESPONDENCIA

Dra. Maritza Garrido Palma
 Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción
 Departamento de Obstetricia y Ginecología
 Hospital Clínico Universidad de Chile
 Santos Dumont 999, Independencia, Santiago
 Teléfono: 2978 8460
 E-mail: mgarrido@hcuch.cl

