

# GENES I - ONCOGENES

Resumen por Mauricio Lema Medina de la clase de A. Muñoz. En la parte final, adicione un resumen sobre los genes de la enfermedad metastásica de un artículo de Massagué (J. Nat Cancer Rev 2009;Vol 9: 274-286).

Larga introducción de 22 minutos, no fácilmente resumible.

## **Oncogenes**

Se postulan por la existencia de cánceres hereditarios, alteraciones cromosómicas en algunas células cancerosas, relación entre potencial mutagénico y carcinogenicidad y análisis de virus que inducen tumores.

Los oncogenes son versiones mutadas o desreguladas de genes normales (proto-oncogenes). Los oncogenes tienen diferentes tipos de acciones: proliferación, antiapoptosis, proangiogénicos, invasores o capacidad metastásica. Se pueden activar por mutaciones, deleciones, sobre-expresión, fusión, expresión inadecuada en tiempo o célula.

Sir Peyton Rous estableció un extracto celular de sarcomas aviarios. Los inyectó en pollos sano (acelular), en 1911. Ganó el premio Nobel en 1966.

Los retrovirus tienen 2 moléculas de RNA que se insertan en el DNA por retotranscripción. Los retrovirus tienen LTR (con promotores y enhancers) en ambos extremos. Hay tres genes gag, pol y env. El gag codifica las proteínas viriónicas, el pol codifica la transcriptasa reversa y la integrasa. El env codifica la envoltura viral (se requiere de un splicing alternativo para que se traduzca).

Hay varios tipos de retrovirus: Transformantes débiles (ALV): inducen la aparición de tumores bastante tiempo tras la infección, no contienen ningún gen aparte de los propios. Los virus aislados de los tumores originan tumores más rápidamente, selección progresiva de virus con mayor potencial carcinogénico. Retrovirus transformantes agudos (RSV): contienen oncogenes transducidos del genoma del huésped, incremento progresivo de oncogenicidad por la acumulación de mutaciones en los oncogenes transducidos.

## **Por qué causan cáncer los retrovirus?**

### *Sobre-expresión*

El proto-oncogén cambia las secuencias reguladoras LTR son potentes promotores de las secuencias downstream.

### *Desregulación*

Al transducirse, el proto-oncogén pierde sus intrones, y con ello posibles secuencias reguladoras.

### *Fusión*

Con genes virales, originando proteínas híbridas de función alterada.

## **Mutación**

Los proto-oncogenes sufren cambios en su secuencia respecto a las que tenían en las células de las que provienen.

Varmus y Bishop en 1976 demostraron que las secuencias Src derivan del genoma celular (Premios Nobel en 1989 – Nature 260, 170-3, 1976). Tony Hunter en 1980 estableció que el Src fosforila residuos de tirosina.

## **Src**

El gen src codifica una tirosina-quinasa anclada a la membrana plasmática por un ácido mirístico que se regula por fosforilación / desfosforilación. El src oscila entre activa cuando tiene una conformación abierta (relajada) que expone los dominios SH3, SH2 y una PTK con la Y416 fosforilada. Cuando en el extremo carboxiterminal la Y527 está fosforilada, genera plegamiento e inhibición de de la Src por su afinidad por el dominio SH2 (configuración tensa, inactiva).

Cómo se activa la proteína Src? Existen dos mecanismos: 1. Que se pierda la fosfo Y527 por una fosfatasa (fosfotirosín fosfatasa). 2. La más común, cuando un factor de crecimiento activa su receptor con actividad tirosina kinasa, con autofosforilación de sus propias tirosina quinasa, que atraen el dominio SH2 de la Src, produciendo cambios conformacionales en ésta, activándola. Qué pasa en el oncogén v-src? Pues ha perdido el extremo carboxiterminal del Src – incluyendo la Y527 regulatoria (inhibitoria), convirtiéndola en constitutivamente activa. El gen Src está muy infrecuentemente mutado en cáncer humano, pero está frecuentemente sobre-expresado en neoplasias humanas. El gen Src pertenece a una familia que tiene 9 genes (se parecen, pero se expresan en diferentes tejidos celulares). Las kinasas de la familia Src (SFKs) son importantes en varios procesos que incluyen: regulación de la expresión génica; adhesión celular vía interacción con integrinas, actinas y kinasas de adhesión focal; migración celular.

Massagué demostró que el Src es el responsable del mantenimiento de la supervivencia de células de cáncer de mama en la médula ósea. Lo hace por varios mecanismos: 1. Estimulando el AKT inducido por el aducto quimioquínico SDF1/CXCR4 y, 2. Inhibición de la apoptosis de la vía TRAIL/DR4\_5.

Inhibidores del Src incluyen Dasatinib. Hay un Fase I AZD0530 (Saracatinib) que inhibe la reabsorción ósea (Hannon et al. Bone 2012).

## **Otros mecanismos de tumorigénesis retroviral**

Cómo transforman los retrovirus que no tienen oncogenes? Por la inserción aleatoria de LTRs en sitios especiales (ie, Myc) que causan proliferación.

Hay retrovirus que pierden varios genes, y sólo queda con un solo gen (ie, fos). Otros retrovirus fusionan un gen propio a otro transducido (gag/oncogén, ie abl). Algunos retrovirus contienen dos oncogenes (ie, AEV ES4, ErbA y ErbB. El ErbA es el receptor de la hormona tiroidea que bloquea la diferenciación, y el ErbB causa proliferación celular)

En humanos, los oncogenes que se ubican downstream de un promotor fuerte (ie, IgH) generan proliferación celular. Cuando se genera un gen híbrido de un factor de transcripción anormal.

## **Virus y cáncer en humanos**

La primera transmisión de un virus por filtrado acelular fue Ciuffo en 1901. En 1908 Ellerman y Bang hicieron lo mismo que Rous en leucemias. Blumberg en 1963 descubre Hepatitis B (Premio Nobel 1963) y Epstein descubre en 1964 el EBV, zur Hausen descubre el HPV (Premio Nobel 2008). Los virus pueden causar cáncer por transformación, porque adquieren oncogenes, o que al insertarse en cromosoma activan oncogenes celulares.

*Crterios para aceptar un papel causal de agentes infecciosos en carcinogénesis directa (Harald zur Hausen): 1. Presencia del genoma completo o parcial del agente en todas las células cancerosas, 2. La introducción del ácido nucléico del agente en cultivos celulares o animales debe causar inmortalización celular o inducir tumores, respectivamente. 3. La eliminación del ácido nucléico de las células (transfectadas) en las que se ha introducido debe causar la reversión de su inmortalización o del fenotipo maligno. 4. Estudios epidemiológicos de casos/controles y prospectivos deben identificar al agente como un factor de riesgo importante para el tipo de tumor concreto.*

Cómo se detectó el primer oncogén en tumores humanos?

Se identificó el Ras en 3 grupos simultáneos en 1982. Se estableció que había una mutación puntual en la posición 12 de una Lysina por una Valina.

Existen muchos oncogenes en prácticamente todos los componentes de las rutas de señalización. Por ejemplo, Sis/PDGF-B (ligando); ErbB (receptor Tirosina quinasa); Mas (receptor no Tirosina quinasa); Src (Tirosina quinasa no receptor); Shc (adaptores); Ras (proteínas G); Raf (efectores); AP-1, Jun y Fos (factores de transcripción).

## **Adicción oncogénica**

A pesar de la existencia de numerosas alteraciones genéticas en las células cancerosas, existen ejemplos en sistemas experimentales y en paciente de que la reversión de una o un pequeño número de estas anormalidades puede inhibir profundamente el crecimiento de las células cancerosas y, en algunos casos, mejorar la supervivencia. Aparente dependencia de algunos cánceres de uno o pocos genes.

Mecanismos

Letalidad sintética entre 2 genes: la mutación de un gene es compatible con la supervivencia, pero la de ambos genes es letal. Dependencia intergénica.

Ejemplos de adicción oncogénica en animales: c-myc, bcr/abl, ras, Her2/neu, Wnt-1. También se ha visto en humanos: Her2/neu, ciclina D1, ras, Beta Catenina, Ciclina E, BRAF, bcr/abl, c-kit, EGFR, VEGF y MITF.

## **Adicción no oncogénica**

El fenotipo tumoral es recesivo (Henry Harris, 1969).

## Modelos de progresión tumoral

1. Mutación selección (oncogenes, supresores, estabilidad)
2. Inestabilidad genética (de microsatélites, MIN). Fenotipo mutador (RER).
3. Inestabilidad genética (cromosómica, CIN). Aneuploidía (Just right instability).
4. Co-evolución de células cancerosa y estroma ("field characterization"): importancia del nicho, reclutamiento de células de la médula ósea que se instalan en el sitio de metástasis antes de las metástasis, y células estromales. Las interacciones dinámicas entre el epitelio y los fibroblastos se alteran.
5. Acondicionamiento del nicho pre-metastásico: los tumores secretan factores como VEGF, PDGF, TGFβ que inducen quimioquinas/SAA3 en nichos premetastásicos, que reclutan precursores hematopoyéticos de la médula ósea (HPC) y células metastásicas (MTC). Las HPC secretan factores premetastásicos como TNFα, MMP9, TGFβ y los fibroblastos activados por las células stem mesenquimáticas (MSC) secretan Fn y LOX que modifican la matriz favoreciendo el anclaje de MTC. A esto contribuye la expresión de P y E-Selectinas por el endotelio activado. Uniones vía CD44 pueden promover la supervivencia y proliferación de las MTC en el nicho metastásico. El reclutamiento temprano de progenitores endoteliales (EPC) al nicho mediante el switch angiogénico y potencia la progresión a macrometástasis. El asilamiento de microvesículas con mRNA anteceden las metástasi (exosomas).
6. Cancer-Stem Cells (subpoblaciones de células en los tumores con potencial proliferativo indefinido responsable del crecimiento tumoral y metástasis). La aparición de células cancerosas resistentes a terapia convencionales (las CSC aisladas expresan proteínas antiapoptóticas y elevados niveles de transportadores ABC). La diversidad fenotípica en tumores de origen clonal. La baja eficiencia de células de tumores primario en ensayo de clonogenicidad in vitro e in vivo. Sólo una muy pequeña proporción de células en los tumores son tumorigénicas (capacidad de generar y mantener un tumor).
7. Origen temprano de las metástasis: las metástasis resultan de la liberación "dormancy" of early disseminated cancer cells (Hussemann, Cancer Cell, 2008), Podsypanina et al (Science 2008): untransformed mouse mammary cells may establish residence in the lung once they have entered into de bloodstream and may assume malignant growth upon oncogene activation (KRAS, cMyc).
8. La inflamación debida a infección crónica, exposición continua a irritantes o alteración genética causa cáncer (los tumores son heridas que no curan).

Conocemos mucho mejor los genes implicados en la formación de tumores primarios que aquellos responsables de las metástasis específicas de tejido. A pesar de los avances en las terapias citotóxicas, hormona y dirigidas a dianas, éstas siguen siendo mayoritariamente insatisfactorias. La quimioterapia habitual se dirige a células proliferantes, pero las CSC se dividen raramente... O no. Son necesarias estrategias contra otros procesos, como EMT, interacciones con sus nuevos/cambiantes microambientes o la reactivación de dormancia metastásica. Si se confirma la hipótesis de las CSC, una terapia contra

ellas. Siendo el cáncer una enfermedad multigénica, le corresponde una terapia combinada o no si existe adicción oncogénica Y7O no oncogénica. La complejidad enorme del cáncer hace más probable una terapia efectiva prevención y detección temprana de tumores.

## **Metástasis: de la diseminación a la colonización órgano-específica**

Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Nat Cancer Rev 2009;Vol 9: 274-286.

Massagué y sus colaboradores inician describiendo la heterogeneidad del proceso metastásico. Diferentes tumores tienen diferentes sitios favoritos para metástasis. El cáncer de mama tiende a afectar los huesos, pulmones, hígado y cerebro; el cáncer de pulmón va al cerebro, hueso, adrenal e hígado; el melanoma cutáneo hace metástasis a los pulmones, cerebro, piel e hígado; el melanoma uveal exclusivamente al hígado; el cáncer de colon y páncreas afectan el hígado y el pulmón; el de próstata afecta predominantemente el hueso y los sarcomas al pulmón. Pero no para ahí la heterogeneidad, pues las latencias entre el tumor primario y la metástasis también varía mucho con latencias cortas características de cáncer del pulmón, páncreas y colon; y latencia de hasta décadas en ciertos cánceres de mama. Este artículo trata de organizar una visión coherente del proceso metastásico.

### Glosario

Como cualquier disciplina nueva la metastología requiere de una serie de conceptos nuevos que permitan la comunicación precisa entre los interesados. Veamos algunos de los términos que vamos a requerir en este documento:

**Infiltración:** Entrada de las células tumorales a los órganos distantes, por medio de la extravasación.

**Colonización:** El crecimiento de las metástasis que han co-optado el microambiente de los órganos distantes.

**Latencia:** Intervalo entre el diagnóstico tumoral y la detección clínica de metástasis.

**Intravasación:** La entrada de las células tumorales a la circulación sanguínea.

**Extravasación:** La salida de las células tumorales de los lechos capilares al parénquima de un órgano.

**Dormancy:** Estado de quiescencia celular en estado G0. En masas tumorales, se refiere a un balance entre proliferación y apoptosis.

**Fenotipo propagador de tumor:** Habilidad de las células infiltradas de reiniciar proliferación celular.

**Metastatic "speciation":** Proceso evolutivo por medio del que se originan nuevas poblaciones metastásicas.

**DTC - "Disseminated tumor cells":** Células tumorales identificadas en la circulación, médula ósea o ganglios linfáticos sin evidencia de progresión tumoral. Se observan con frecuencia en cáncer de mama.

Historia natural de la enfermedad metastásica

Primero está el tumor primario que inicia in-situ, y luego se convierte en invasor. Por intravasación, las células tumorales entran a la circulación. Por extravasación, las células infiltran los órganos distantes. Luego de una latencia variable, inician el proceso de colonización del órgano distante.

Es importante entender que los genes importantes para el desarrollo del tumor primario pueden no ser tan importantes para las metástasis. A su vez, los genes importantes para el proceso metastásico también se clasifican en varios subtipos: iniciación, progresión y virulencia.

Los genes iniciadores de metástasis son probablemente similares a los que permiten al tumor primario invadir los tejidos vecinos y que incluyen los procesos de motilidad celular (RHOC), EMT, degradación de matriz extracelular, movilización de progenitores de médula ósea, angiogénesis y evasión del sistema inmune. Por ejemplo, la EMT está bajo el control de genes como TWIST1, SNAI1, SNAI2; HGF/MET y MACC1 (en cáncer de colon); así como miR-126 y miR-335 que son TSG en cáncer de mama y colon.

Los genes de progresión tumoral son aquellos que permiten la extravasación, supervivencia y proliferación de células tumorales en órganos distantes. A diferencia de los genes iniciadores, los genes de progresión no necesariamente cumplen la misma función en el tumor primario. Ejemplos de estos genes son: COX-2, EREG, MMP1, LOX (lisina oxidasa), ANGPTL4, CCL5.

Los genes de virulencia son aquellos que son necesarios para sortear eficazmente las presiones específicas de cada órgano metastásico. Por ejemplo, en cáncer de mama la presencia de PTHRP, IL-11, GM-CSF, IL-6 favorecen la formación de metástasis osteolíticas.

El curso temporal de metástasis

Algunos tumores como el cáncer de mama (luminal A) y melanoma uveal pueden tener metástasis muchos años después de la resección de tumores pequeños. Se postula que estos tumores tienen habilidad para infiltrar, pero deben esperar hasta adquirir la competencia para colonizar. Otros tumores como el cáncer del pulmón, de páncreas o melanoma cutáneo son capaces de colonizar tejidos distantes casi desde el inicio de su historia natural. Para otros tumores, como el cáncer de colon, la evolución tumoral hasta alcanzar el tumor primario es larga, pero también tiene una latencia corta.

Infiltración general vs tejido-específica

Las células epiteliales no malignas tienen capacidad migratoria, y pueden adherir a la circulación de órganos como el pulmón o médula ósea. Por ejemplo, CD82 es un supresor de metástasis que normalmente se une al DARC (Duffy antigen chemokine receptor) endotelial. Cuando el CD82 se pierde, se favorece la extravasación. Las características de los sistemas circulatorios del pulmón, hueso, hígado y cerebro parecen ser relevantes para el proceso metastásico. En especial, los capilares sinusoides hepáticos y medular favorecen la extravasación. Los cánceres de mama que expresan COX-2, EREG, MMP1 y MMP2 favorecen la extravasación pulmonar. Al angiopoyetin-like 4 también incrementa la extravasación pulmonar.

Metástasis sin latencia

El cáncer de colon y páncreas y melanoma cutáneo tienen latencias cortas; posiblemente porque las células neoplásicas del tumor primario son competentes para la colonización. Por ejemplo, en melanoma la presencia del MITF es importante para formación de linaje y otros genes como SNAI2 que le dan plasticidad embrionaria.