



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**ANÁLISIS *IN SILICO* Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LAS  
PROPIEDADES CITOTÓXICAS DEL COMPUESTO C14I  
DIRIGIDO CONTRA EL COMPLEJO MOLECULAR K-  
RAS4B/PDE6 $\delta$ , EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER  
PANCREÁTICO.**

**TESIS**

Que presenta:

**ZULEYMA CRISTINA PÉREZ HERNÁNDEZ**

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

En la especialidad de

**BIOMEDICINA MOLECULAR**

Directores de la Tesis

**Tutor Dr. en C. Miguel Ángel Vargas Mejía**

**Cotutor Dr. en C. Arturo Rojo Domínguez**

Ciudad de México

AGOSTO. 2019



## **ASESORES**

**Dr. en C. Leopoldo Santos Argumedo**  
Investigador Titular 3E  
Departamento de Biomedicina Molecular  
CINVESTAV – IPN

**Dra. en C. Rosaura Hernández Rivas**  
Investigador Titular 3D  
Departamento de Biomedicina Molecular  
CINVESTAV – IPN

**Dr. Michael Schnoor**  
Investigador Titular 3A  
Departamento de Biomedicina Molecular  
CINVESTAV – IPN



AGRADECIMIENTO CONACyT

**Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía y cotutoría del Dr. Arturo Rojo Domínguez**  
**Durante la realización de este trabajo, la autora fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT con número de registro 632387**

**La agradezco a CONACyT por otorgarme la beca con el No. 484594 que permitió realizar mis estudios de Maestría en el departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV.**

---

## AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar mis agradecimientos, esperando que en estas líneas pueda expresarles de forma clara y atenta mi sincera gratitud hacia las personas, e instituciones que permitieron mi avance académico y la obtención de un grado más de estudios, así mismo me gustaría que pudieran percibir la emoción con la cual les agradezco.

En primer lugar, agradezco a los profesores del departamento de biomedicina molecular del CINVESTAV por aprobar mi ingreso y permanencia en este plan de estudios.

Por otro lado, quiero agradecer de forma particular al doctor Miguel Ángel Vargas Mejía, por ofrecerme un proyecto de tesis que me permitió entender la importancia y el valor de la ciencia altruista, a su vez le agradezco su esmero en impulsarme a la mejora continua y ayudarme a definir mis intereses en la ciencia.

También quiero hacer un agradecimiento especial al Dr. Arturo Rojo Domínguez, primero por aceptar ser mi cotutor y dedicarme tiempo, por transmitirme un poco de su experiencia y conocimientos en el área de bioinformática, en especial, agradezco su paciencia y comprensión a pesar de que me costaba trabajo dimensionar la importancia y funcionalidad de esta área de la investigación, además reconozco que gracias a sus correcciones y su esfuerzo mejoraré mi expresión oral y escrita.

A su vez quiero expresar mi gratitud a mis asesores de tesis, Dr. Leopoldo Santos Argumedo, Dra. Rosaura Hernández Rivas y el Dr. Michael Schnoor, por sus sabias observaciones e importantes recomendaciones para mejorar mi proyecto, además de dedicar su tiempo y paciencia en corregir mi escrito. ¡Gracias, pues con sus diferentes perspectivas han permitido enriquecer mi proyecto!

Mis agradecimientos son dirigidos a muchas más personas, y me es más apropiado hacer su mención por grupos.

Comenzaré expresando que me resultó muy reconfortante ser bien recibida en el grupo de trabajo del laboratorio, agradezco a todos los miembros del laboratorio por hacer amena y divertida nuestra jornada de trabajo, agradezco su amistad y ayuda en mi formación. Gracias Moni, por siempre ayudarnos con los materiales de laboratorio, y a mantener el orden. Gracias Mari, por distribuirnos del material necesario, gracias por enseñarme a usar los equipos y llamar nuestra atención para enmendar fallas. ¡Quiero hacer un agradecimiento especial a Pao, por ser mi sensei! Gracias por tu ayuda, pues fue de gran importancia en el desarrollo de mis primeros experimentos y la adquisición de experiencia, gracias por apoyarme a salvar el semestre a unas semanas de que terminara, gracias por compartir tu experiencia y motivación conmigo, y también por ser una guía protectora en todos los aspectos, también quiero agradecer a Lou por su ayuda, y paciencia, nunca olvidaré cuando me enseñaste a hacer los geles *jumbo*, y sobre todo por darme ánimos, y estímulos positivos “dulces” para no desfallecer, gracias a Pedro y a mis compañeritos nuevos Gio y Dayan por sus recomendaciones para mejorar mi exposición. Muchas gracias por ser un buen equipo.

También quiero mencionar que fue muy divertido y emocionante conocer a mis compañeritos de maestría, fue muy grato su apoyo y unión para iniciar lo que en ese momento era una nueva etapa, y aunque todos fueron importantes y recuerdo detalles de cada uno, en especial agradezco a Mariannela, ¡Gracias por ser mi amiga todo el tiempo! por nunca abandonarme, y mantener la esperanza en que algún día todo valdrá la pena, gracias por motivarme a continuar y a ver que aún en el peor escenario siempre hay algo rescatable. Quiero mencionar que cada plática contigo era reconfortante, gracias por acompañarme en las noches de experimentos, gracias por quedarte en vacaciones conmigo en el laboratorio. Gracias por hacerme reconsiderar mi futuro y motivarme a seguir en busca de mis sueños. Sólo puedo decir que me alegra mucho que seamos amigas y admiro tu entereza y tenacidad, espero sigas así.

Agradezco también a mis nuevos amigos Sandy, Juanito e Irving, quienes en poco tiempo se han convertido en una bonita familia, gracias por ayudarme a ver que hay más vida después de la ciencia, y principalmente quiero

agradecerte Irving por ser tan bueno conmigo y consentirme cuando las cosas van mal, te quiero mucho, me siento muy feliz por haberte conocido.

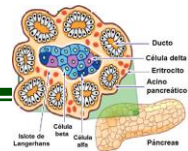
De forma especial, quiero agradecer a mi familia abuelos, padres, tíos, primos y hermanos. Todos han sido un gran apoyo y una motivación para seguir adelante, principalmente agradezco a mis padres, no sé qué hice para merecer unos padres tan amorosos como ustedes. Gracias por cuidarme tanto, por apoyarme tanto, por amarme tanto; sin esperar, recompensa alguna. ¡Pero qué hazaña más grande! algo que no logro comprender.

Los amo más de lo que puedo expresar y me satisface que de alguna forma pueda darles una recompensa a todo el apoyo, cariño y tiempo que me han dedicado durante todos estos años, gracias por escucharme cada vez que algo me aflige y por ayudarme a resolver mis conflictos. Me han demostrado que cada uno de mis logros es digno de reconocimiento. Es por eso que este triunfo, más que mío es de ustedes. Durante 26 años me ayudaron a construir y a subir cada peldaño hasta este momento. Yo solo he puesto la parte que me correspondía, el último granito que culmina con toda esta trayectoria estudiantil.

Gracias también a mis hermanos por su cariño, gracias por darme fortaleza y ánimo cada vez que me siento triste, gracias por ayudarme a evolucionar, a adquirir seguridad y gracias por hacerme sentir como un ejemplo, son los mejores hermanos, ahora entiendo que me preparan para la vida cada que me molestan. No imagino la vida sin ustedes. Los quiero mucho hermanos y agradezco que sean tan raros, porque eso los hace inigualables. No cabe duda, no pude tener una mejor combinación familiar: padres amorosos, hermanos raros y yo tan afortunada. Si fue Dios o el destino quien nos hizo coincidir en esta vida, no me queda más que decir gracias a lo que sea que ande por ahí que sea más grande que todo.

Personas que resultaron muy importantes son mis abuelos, por su cariño, cuidado, regaños, apoyo y enseñanzas. A mis primos que son como mis hermanos (Christian, Beverly y Brandon) gracias por compartir una infancia tan bonita, aprendimos a compartir y a valorar lo poco que teníamos.

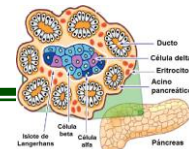
Me siento feliz por ser yo en este día, teniendo la mirada fija hacia adelante, me alegra echar un vistazo al pasado y sonreír por todos los bellos recuerdos que tengo, como cuando mis padres me enseñaron a andar en patines, creo que esa felicidad la puedo comparar con la que ustedes sentirán este día que yo obtendré mi título. Me alegra mucho devolverles un momento feliz. Gracias.



# ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
1.1. Generalidades del páncreas .....	3
1.2. Cáncer de páncreas .....	4
1.2.2. Epidemiología .....	5
1.3. Etiología .....	8
1.4. Diagnóstico del cáncer de páncreas .....	9
1.5 Tipos de cáncer pancreático .....	11
1.6. Genética y progresión del cáncer pancreático .....	12
1.7. K-RAS .....	13
1.8. GTPasas de la familia Ras .....	13
1.9. Activadores de Ras .....	17
1.10. Efectores de las Ras GTPasas .....	18
1.11. Mutaciones en K-RAS .....	19
1.12. Isoforma K-Ras4B .....	20
1.13. Estrategias terapéuticas contra el blanco molecular K-Ras .....	22
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>25</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>31</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>32</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>32</b>
<b>6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>32</b>
<b>7. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>33</b>





**8. METODOLOGÍA..... 34**

8.1. Acoplamiento molecular. .... 34

8.2. Cultivo celular de las líneas cancerosas pancreáticas. .... 37

8.3. Efecto del compuesto C14I en la viabilidad celular de las células cancerosas pancreáticas. .... 38

8.4. Impacto del compuesto C14I en la formación de colonias en las líneas celulares Mia-PaCa-2. .... 40

8.5. Western blot ..... 40

8.6. Medición de apoptosis/necrosis ..... 41

**9. RESULTADOS ..... 43**

9.1 Interacción *in silico* del compuesto C14 y C14I con el complejo molecular K-ras4B/PDE6δ..... 43

9.2 Determinación del IC<sub>50</sub> del compuesto C14 y C14I..... 51

9.3 Determinación de la actividad antiproliferativa del compuesto C14I ..... 54

9.4 Determinación de muerte por apoptosis inducida por el compuesto C14I ..... 55

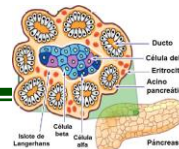
9.5 Determinación del impacto del compuesto C14I sobre el estado de activación de los principales efectores de K-Ras, que son ERK<sup>P</sup> y AKT<sup>P</sup> ..... 57

**10. DISCUSIÓN..... 60**

**11. CONCLUSIONES ..... 69**

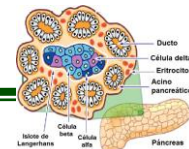
**12. PERSPECTIVAS ..... 70**

**13. BIBLIOGRAFÍA..... 71**



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Anatomía del páncreas. ....	4
<b>Figura 2.</b> Tasa de mortalidad por cáncer de páncreas a nivel global.....	6
<b>Figura 3.</b> Nuevos casos de cáncer y porcentaje de la mortalidad por cáncer, 2012. 7	
<b>Figura 4.</b> Estadificación TNM del cáncer de páncreas 2012. ....	10
<b>Figura 5.</b> Modelo de progresión de cáncer pancreático a partir de lesiones precursoras de neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN).....	13
<b>Figura 6.</b> Estructura del dominio catalítico de la isoforma K-Ras4B. ....	14
<b>Figura 7.</b> Ciclo de activación de las proteínas Ras y sus vías de señalización. ....	15
<b>Figura 8.</b> Región hipervariable de las isoformas de Ras GTPasas y modificaciones post-traduccionales que favorecen su anclaje a la membrana plasmática.....	16
<b>Figura 9.</b> Señalización río arriba de las Ras GTPasas.....	17
<b>Figura 10.</b> Activación de Ras y vías de señalización río abajo. ....	19
<b>Figura 11.</b> Mutaciones más frecuentes en la molécula de K-Ras. ....	20
<b>Figura 12.</b> Estructura del complejo K-Ras4B/PDE6δ. ....	21
<b>Figura 13.</b> Modulación cíclica de la localización celular de la isoforma K-Ras4B mediada por proteínas Ca <sup>2+</sup> /CaM y PDE6δ. ....	22
<b>Figura 14.</b> Estrategias terapéuticas contra el blanco molecular K-Ras y sus modificaciones postraduccionales. ....	24
<b>Figura 15.</b> Estructura del compuesto C14 2-[(3-clorofenil)-metil-metil-amino]-N-croman-4-il-acetamida.....	26
<b>Figura 16.</b> Modelo <i>in silico</i> de la interacción del compuesto C14 con el complejo molecular K-Ras4B/PDE6δ.....	27
<b>Figura 17.</b> Curva dosis.respuesta del compuesto C14 a las 72 horas.....	28
<b>Figura 18.</b> Estructura del compuesto C14I. ....	30
<b>Figura 19.</b> Diseño experimental para determinar EL IC <sub>50</sub> del compuesto C14I. ....	39
<b>Figura 20.</b> Esquema general para determinar muerte celular. ....	42
<b>Figura 21.</b> Modelo <i>in silico</i> de la interacción del complejo K-Ras4B <sup>WT</sup> /PDE6δ con los compuestos C14 y C14I. ....	44
<b>Figura 22.</b> Mapas de interacción del complejo K-Ras4B <sup>WT</sup> /PDE6δ con los compuestos C14 y C14I.....	45



**Figura 23.** Interacción *in silico* de los compuestos C14 y C14I con la interfaz del complejo K-Ras4B<sup>G12C</sup>/PDE6δ..... 47

**Figura 24.** Mapas de interacción del complejo K-Ras4B<sup>G12C</sup>/PDE6δ con los compuestos C14 y C14I..... 47

**Figura 25.** Modelo *in silico* de la interacción del complejo K-Ras4B<sup>G12D</sup>/PDE6δ con los compuestos C14 y C14I..... 48

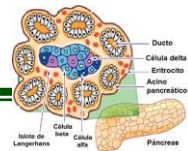
**Figura 26.** Mapas de interacción del complejo K-Ras4B<sup>G12D</sup>/PDE6δ con los compuestos C14 y C14I..... 49

**Figura 27.** Curvas de dosis respuesta de las líneas celulares MIA PaCa-2 y hTERT-HPNE con los compuestos C14 y C14I a las 72 h..... 53

**Figura 28.** El efecto anti proliferativo del compuesto C14I en la línea celular MIA PaCa-2, es similar al obtenido con gemcitabine. .... 55

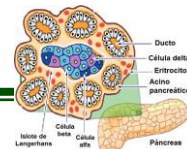
**Figura 29.** El compuesto C14I induce muerte por apoptosis desde las 24 h en las células MIA PaCa-2. .... 57

**Figura 30.** Reducción de la activación de ERK y AKT en las células MIA PaCa-2 tratadas con C14I..... 59



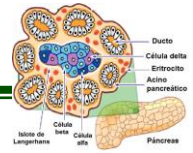
## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Factores de riesgo de cáncer de páncreas.....	8
<b>Tabla 2.</b> Parámetros de Lipinski del compuesto C14I.....	30
<b>Tabla 3.</b> Características de las líneas celulares que se emplearán en este estudio	38
<b>Tabla 4.</b> Aminoácidos de K-Ras4B <sup>WT</sup> y PDE6δ en interacción con C14 y C14I .....	46
<b>Tabla 5.</b> Aminoácidos de K-Ras4B <sup>G12C</sup> y PDE6δ en interacción con C14 y C14I ....	48
<b>Tabla 6.</b> Aminoácidos de K-Ras4B <sup>G12D</sup> y PDE6δ en interacción con C14 y C14I ....	50
<b>Tabla 7.</b> IC <sub>50</sub> calculados para las líneas celulares MIA PaCa-2 y hTERT-HPNE .....	52



## ABREVIATURAS

1. **AJCC:** Comité de la Unión Americana de Cáncer.
2. **AKT:** Serin/Threonin cinasa.
3. **ATCC:** American Type Culture Collection.
4. **BRCA2:** gen Breast Cancer Type 2.
5. **C14:** compuesto 2-[(3-clorofenil)-metil-metil-amino]-N- croman-4-il-acetamida.
6. **C14I:** compuesto 2-[(3-yodofenil)-metil-metil-amino]-N- croman-4-il-acetamida.
7. **C14I<sup>131</sup>:** compuesto 2-[(3-yodofenil)-metil-metil-amino]-N- croman-4-il-acetamida marcado con yodo 131.
8. **CA19-9:** antígeno carbohidrato 19-9 o antígeno sializado de Lewis.
9. **CAAX:** motivo C-cisteína, A aminoácidos alifáticos y X cualquier aminoácido.
10. **CaM:** proteína calmodulina.
11. **DMSO:** dimetilsulfóxido.
12. **EGFR:** receptor del factor de crecimiento epitelial.
13. **ERK:** cinasa regulada por señalización extracelular.
14. **FTIs:** inhibidores de la enzima farnesiltransferasa.
15. **GAP:** proteínas activadoras de GTPasas.
16. **GDP:** nucleótidos de guanidina difosfato.
17. **GEFs:** factores de intercambio de guanosinas.
18. **GGTI:** inhibidores de la geranil transferasa.
19. **GLOBOCAN:** base de datos de Global Cancer Observatory.
20. **GRB2:** proteína dos unida a receptores de factor de crecimiento.
21. **GTP:** nucleótidos de guanidina trifosfatados.
22. **H-Ras:** isoforma de la GTPasa ras codificada por el gen H-Ras proto-oncogén.
23. **HVR:** región hipervariable de las GTPasas Ras.
24. **I<sup>131</sup>:** radioisótopo 131 de yodo.
25. **IARC:** Agencia Internacional de Búsqueda de Cáncer.
26. **IC<sub>50</sub>:** índice de citotoxicidad media.
27. **ICMT** la enzima isoprenilcystein carboxi metil transferasa.
28. **INK4A:** gen Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 2D.

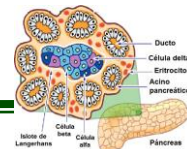


29. **IPMN**: neoplasia papilar intraductal.
30. **IUPAC**: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.
31. **K-RAS**: gen (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)
32. **K-Ras**: proteína de la familia de las GTPasas Ras codificada por el gen K-RAS.
33. **K-Ras4B**: una Isoforma de las GTPasas Ras codificada por el gen K-RAS.
34. **LKB**: gen Liver Kinase B1.
35. **MAPK**: proteína quinasas activadas por mitógenos.
36. **MCN**: neoplasia quística mucinosa.
37. **MMFF94**: Campo de fuerza molecular Merck 94.
38. **MOE**: Molecular Operating Environment.
39. **MTT**: compuesto 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.
40. **N-Ras**: isoforma de la GTPasa ras codificada por el proto-oncogene N-Ras.
41. **PAGE**: Electroforesis en Geles de Poliacrilamida.
42. **PanCAN**: red de acción contra el cáncer pancreático.
43. **PanIN**: neoplasia intraepitelial pancreática.
44. **PDAC**: adenocarcinoma ductal pancreático.
45. **PDB**: archivo del Banco de Datos de Proteínas.
46. **PDE6δ**: la subunidad δ de la proteína fosfodiesterasa 6.
47. **PET**: tomografía de emisión de positrones.
48. **PLD**: proteína fosfolipasa D1.
49. **PNET**: tumores pancreáticos neuroendocrinos.
50. **RALBIP1**: la proteína 1 de unión al complejo molecular CDC42/RAC-GAP-RAL.
51. **RaIGDS**: Estimulador de disociación de nucleótidos de guanina Ral.
52. **Rce1**: enzima endopeptidasa.
53. **RMSD**: raíz de la desviación cuadrática media de la posición de los átomos.
54. **RMSF**: fuerza de rigidez media cuadrada.
55. **RNAi**: RNA de interferencia.
56. **SDS**: dodecil sulfato de sodio.
57. **SH2**: dominio de homología a Src 2.
58. **TNM**: reglas de estadificación por tamaño, nódulo y metástasis.

BLANCO

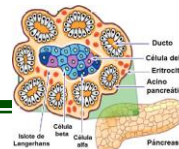






## RESUMEN

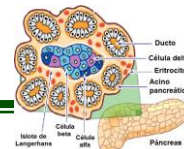
El cáncer de páncreas es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. Esto ha llevado a múltiples grupos de investigación al desarrollo de terapias dirigidas contra blancos moleculares. Se ha encontrado que la mutación del gen K-RAS, dicta el inicio y la progresión del adenocarcinoma ductal pancreático en un 90%. Por lo cual la inhibición de la señalización oncogénica de K-Ras es un atractivo blanco terapéutico, sin embargo, sigue siendo un reto encontrar compuestos selectivos contra K-Ras. De las estrategias con mayor éxito fue deltarasin, un compuesto que se une a la subunidad delta de la proteína fosfodiesterasa (PDE6 $\delta$ ), esta proteína actúa como chaperona para favorecer el anclaje de las isoformas K-Ras4B a la membrana plasmática. Este compuesto fue reportado por su efecto citotóxico en células de cáncer K-Ras dependientes. Sin embargo, la unión de deltarasin a PDE6 $\delta$  interfiere con la función de otros procesos celulares dependientes de esta proteína. Como una estrategia más selectiva, nuestro grupo de trabajo propuso el uso de compuestos que funcionaran como grapas moleculares para estabilizar al complejo K-Ras4B/PDE6 $\delta$ , y de esta forma inhibir la liberación de K-Ras4B hacia la membrana plasmática. En una búsqueda *in silico* se encontró que el compuesto C14 presentaba un alto puntaje de interacción con la interface del complejo K-Ras4B/PDE6 $\delta$ . Al probarlo *in vitro* mostró un alto potencial citotóxico contra células de cáncer de páncreas. Para determinar la farmacocinética y farmacodinámica del compuesto C14, se generó un análogo que pudiera ser marcado con yodo radioactivo, obteniendo el compuesto C14I. En el presente trabajo el compuesto C14I fue caracterizado para asegurar que no cambiaran de forma significativa sus propiedades y conservara el mecanismo de acción del compuesto C14. Los resultados obtenidos mostraron que el compuesto C14I mejora la interacción con su blanco molecular, el complejo K-Ras4B/PDE6 $\delta$ . Adicional a esto, se observó que aumenta la actividad citotóxica, la inducción de muerte por apoptosis y reduce los niveles de activación de los principales efectores de K-Ras en células K-Ras dependientes, y no afecta de forma significativa a células no tumorigénicas. Estos resultados sugieren que el compuesto C14I puede funcionar, no sólo como una herramienta molecular para estudiar farmacocinética y farmacodinámica, sino más bien tiene un alto potencial como un compuesto contra cáncer de páncreas, e inclusive podría proponerse como un radiofármaco.



## ABSTRACT

Pancreatic cancer is one of the leading worldwide health problems. This has led to divers research groups to look for a target therapy. It has been reported that K-RAS mutations are necessary at the onset and progression in 90% of pancreatic ductal adenocarcinoma. Therefore, the inhibition of K-Ras oncogenic signaling is an attractive molecular target. However, it remains a challenge to find selective compounds against K-Ras. A successful strategy was deltarasin, a compound that binds to PDE6 $\delta$ , a protein that acts as a chaperone protein to help K-Ras4B to bind plasmatic membrane. This compound was reported by its cytotoxic effect on K-Ras-dependent cancer cells. However, deltarasin-joining PDE6 $\delta$  interferes with the function of other cell processes that depend on this protein. As a more selective strategy, our research group proposed to obtain compounds that functioned as molecular staples to stabilize the K-Ras4B/PDE6 $\delta$  complex, thus inhibiting the release of K-Ras4B to the plasma membrane.

The compound C14 was found *in silico* searching by high interaction score with the K-Ras4B/PDE6 $\delta$  interphase complex. This compound was tested *in vitro* and showed a high cytotoxic effect against pancreatic cancer cells. To determined pharmacokinetics and pharmacodynamics of C14, an analogue that could be labeled with radioactive iodo was generated, named C14I compound. In this project, C14I compound was characterized to ensure that does not change significantly their properties and maintain the same mechanism of action as C14. The results obtained showed that compound C14I improves the interaction with its molecular target, the K-Ras4B/PDE6 $\delta$  complex. Additionally, it showed an augmented cytotoxic activity, induction of death by apoptosis, reduce activation levels of the main effectors of K-Ras in K-Ras-dependent pancreatic cancer cells, and does not significantly affect non-tumorigenic cell. These results suggest that compound C14I may function as a molecular tool to study pharmacokinetics and pharmacodynamics and it could be proposed as a radiopharmaceutical.

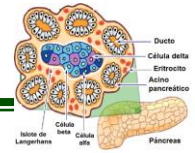


# 1. INTRODUCCIÓN

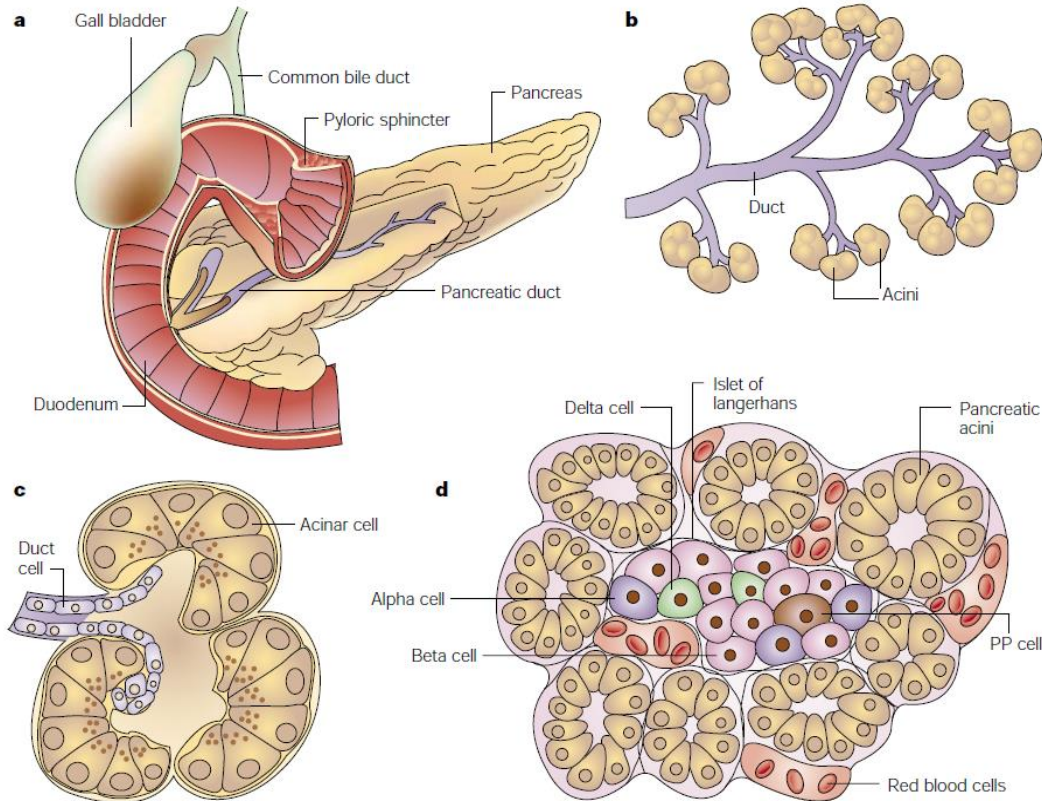
## 1.1. GENERALIDADES DEL PÁNCREAS

El páncreas es una glándula anfícrica extra-parietal del duodeno, que mide entre 14 y 18 cm de longitud, de 2 a 9 cm de ancho y de 2 a 3 cm de grosor, y pesa aproximadamente 100 g (Dobelbower, 1990), se extiende en posición transversal sobre la pared abdominal posterior desde el duodeno hasta el bazo, por detrás del estómago a una altura variable entre la primera y tercera vértebra lumbar (Bockman, 1993), sin embargo para su estudio se divide en cuatro porciones anatómicas que son la cabeza, el cuello, el cuerpo y la cola (Dobelbower, 1990).

Este órgano es de origen endodérmico, deriva de un brote dorsal y otro brote ventral del asa duodenal (Pandol, 2010); presenta una combinación de linajes celulares que lo convierten en una glándula de secreción mixta (Jennings, Berry, Strutt, Gerrard & Hanley, 2015). Se considera anfícrico porque tiene una función endocrina que secreta hormonas que regulan el metabolismo energético a nivel de torrente sanguíneo, la segunda función es exocrina relacionada con funciones digestivas (Hill, 2018). A nivel exocrino el páncreas es una glándula tubuloacinar, es decir presenta células acinares que sintetizan, almacenan y secretan enzimas digestivas (Leung & Ip, 2006) y células ductales que secretan fluido alcalino  $140 \text{ mM NaHCO}_3$  (Lee & Muallem, 2008; Argent, *et al.*, 2006). Además, se ha reportado que el páncreas drena alrededor de 1200 ml/día, de líquido rico en bicarbonato y pro enzimas digestiva, que son secretados al intestino para favorecer la digestión y absorción de biomoléculas que forman parte de los alimentos (Jennings, Berry, Strutt, Gerrard & Hanley, 2015; Hegyi, Maléth, Venglovecz & Rakonczay, 2011). La porción endocrina se estructura en forma de “islotos de Langerhans” y conforman solo un 2% del volumen pancreático (Thorel *et al.*, 2012). Cada islote se compone de cinco tipos de células  $\alpha$ , células  $\beta$ , células  $\delta$ , células g y las células F o PP, que sintetizan glucagón, insulina, somatostatina, ghrelina y polipéptido pancreático, respectivamente. Estas hormonas del sistema



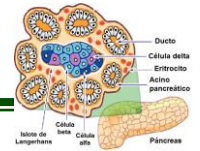
endocrino son liberadas hacia el torrente sanguíneo y regulan el metabolismo energético de todas las células del organismo (Longnecker, 2014; Hezel, Richard, Dunne & Aram, 2015) (Figura 1).



**Figura 1. Anatomía del páncreas.** a) Anatomía macroscópica del páncreas b) porción exocrina del páncreas, unidades funcional y estructural c) estructuración celular de los acinos pancreáticos (unidad funcional de la porción exocrina), d) estructura celular de los islotes pancreáticos (unidad funcional de la porción endocrina) que detalla la heterogeneidad de células que lo conforman. (Tomado de Bardees et al., 2002).

## 1.2. CÁNCER DE PÁNCREAS

El cáncer pancreático es un conjunto de alteraciones metabólicas genéticas y epigenéticas contenidas en un microambiente denso y complejo en las células cancerosas. El inicio de esta enfermedad requiere que una célula normal sea transformada a una célula cancerígena, para ello debe sufrir mutaciones en genes que activen sus procesos de proliferación y crecimiento descontrolado, de tal forma que le confieren inestabilidad genómica, desencadenando una acumulación progresiva de mutaciones y una



desregulación de los procesos de proliferación y de muerte celular (Goral, 2015).

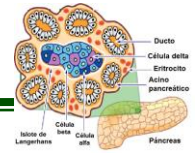
La acumulación de mutaciones aumenta en forma gradual al igual que la anomalía de su progenie celular, estas mutaciones acumuladas en la célula le confieren invasividad, y una tasa de proliferación descontrolada, formando lesiones pre-neoplásicas primarias que evolucionan a neoplasias malignas (cáncer).

El cáncer de páncreas se caracteriza por ser de rápida evolución y por la formación de un microambiente tumoral denso que le confiere una alta resistencia a los tratamientos que conlleva a una baja tasa de supervivencia, por lo que es importante contar con nuevas estrategias para tratarlo, una propuesta está enfocada en la identificación de blancos moleculares y biomarcadores que funcionen en el desarrollo de terapia personalizada (Matrisian, Aizenberg & Rosenzweig, 2012).

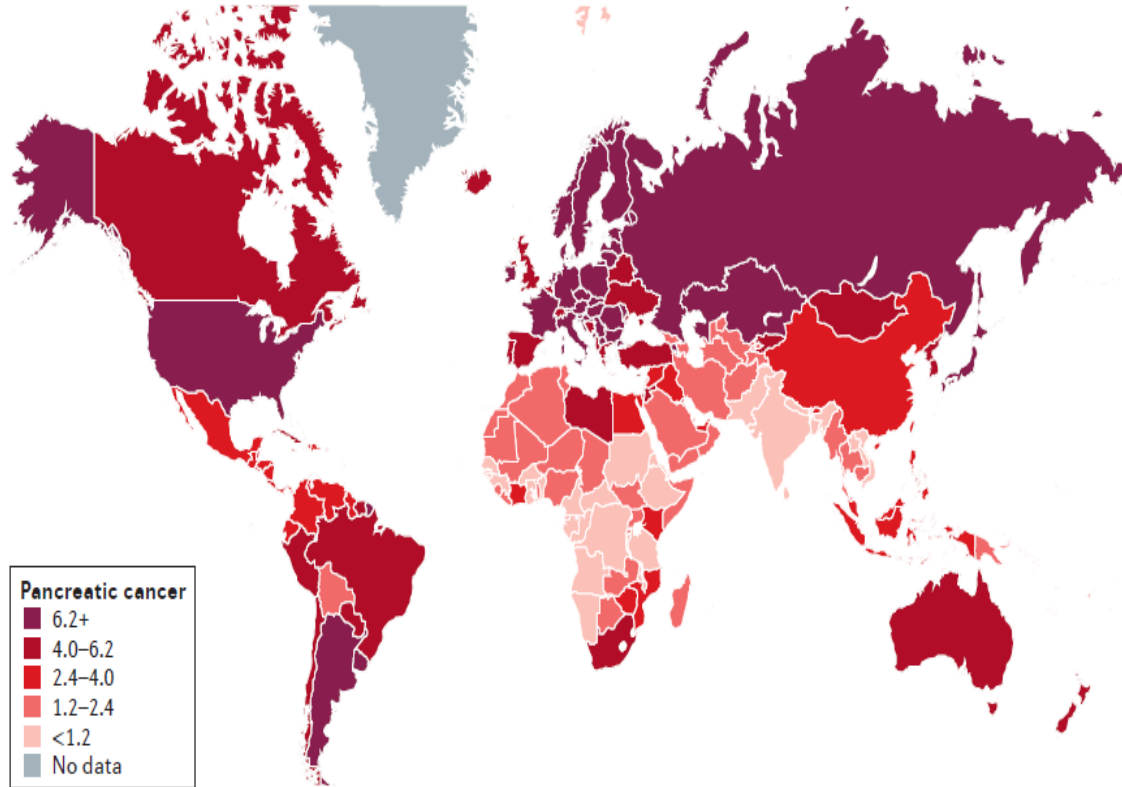
### 1.2.2. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de páncreas es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, a pesar de su baja tasa de incidencia en comparación con otros tipos de cáncer, presenta una elevada tasa de mortalidad. En el proyecto GLOBOCAN 2012 la IARC “International Agency for Research on Cancer” logró estimar que el cáncer de páncreas causa más de 331,000 muertes por año, colocándose como la séptima causa de muerte por cáncer a nivel mundial (Figuras 2 y 3) (Ferlay *et al.*, 2012).

En los últimos reportes de GLOBOCAN 2018, el cáncer de páncreas se posiciona en el onceavo lugar de incidencia, y se mantiene como la cuarta causa de muerte por cáncer en los países desarrollados (Rawlaa, Sunkarab & Guduputi, 2019). A su vez, las predicciones estadísticas indican que en la siguiente década será la segunda causa de mortalidad por cáncer (Kleeff *et al.*, 2016; Rishi *et al.*, 2015; Bekkali & Oppong, 2017).

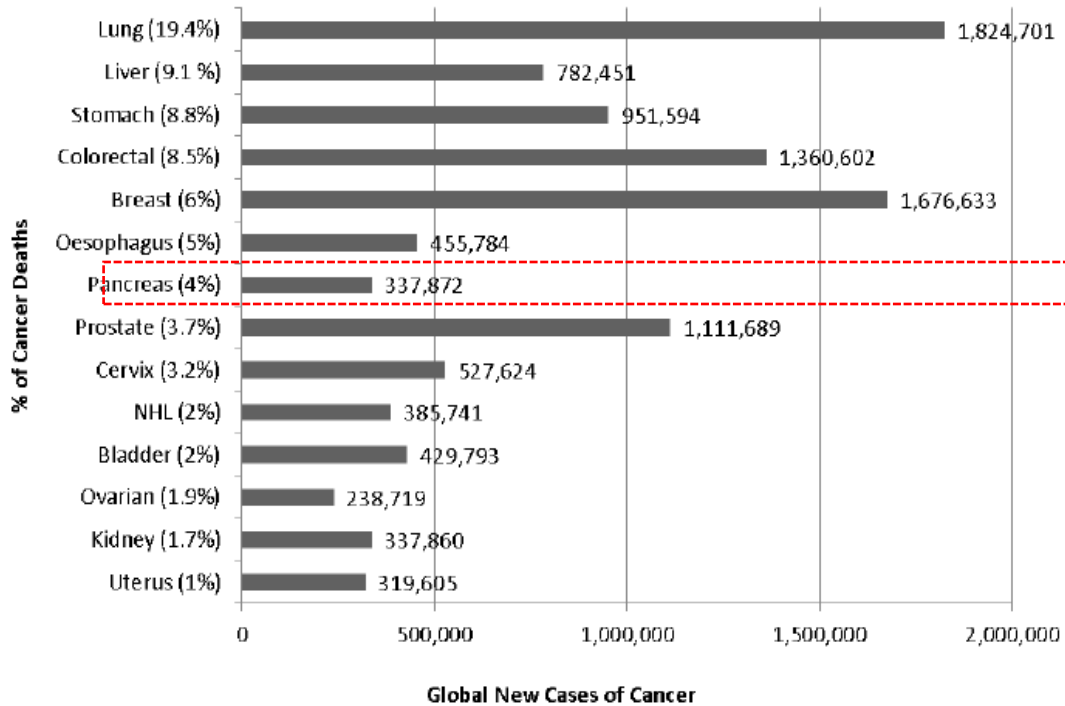
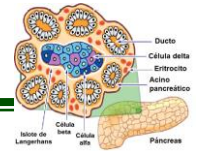


En México este tipo de cáncer se posiciona como la octava causa de muerte asociada a cáncer, con un registro de la tasa de mortalidad mayor en los estados del norte del país (Rizo-Ríos *et al.*, 2015).



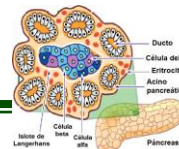
**Figura 2. Tasa de mortalidad por cáncer de páncreas a nivel global.** La tasa de mortalidad que se encuentra representada por la intensidad de color y es una tasa de estandarización anual de la mortalidad por cáncer de páncreas, en hombres y mujeres (Índice por cada 100,000 personas, 2012). (Tomado y modificado de Ferlay *et al.*, 2016).

La tasa de supervivencia en cáncer de páncreas a 5 años de ser detectado es apenas del 5%, la mayoría de los pacientes son diagnosticados en las etapas más tardías de la enfermedad, dándole apenas unos meses de supervivencia. Este mal pronóstico se debe a la baja respuesta que tiene la enfermedad a los tratamientos convencionales, y su alta agresividad, promovida por el desarrollo de quimiorresistencia a la mayoría de los tratamientos farmacológicos convencionales e incluso a la radioterapia, así como un diagnóstico tardío (Ducreux, 2019).



**Figura 3. Nuevos casos de cáncer y porcentaje de la mortalidad por cáncer, 2012.** En la gráfica de barras se muestra el porcentaje de incidencia de los catorce principales tipos de cáncer. Se remarca que el cáncer pancreático se posiciona como la séptima causa de muerte por cáncer a nivel mundial a pesar de que su incidencia es baja. (Datos de tomados de GLOBOCAN, 2012).

El alto impacto que tiene el cáncer de páncreas en la salud a nivel mundial ha adquirido mayor relevancia en las últimas décadas, promoviendo que asociaciones como la red de acción contra el cáncer pancreático (PanCAN) busquen solucionar este problema desde varios enfoques. Un enfoque es a nivel preventivo, teniendo como objetivo determinar los factores de riesgo asociados al desarrollo de las neoplasias; otro enfoque es el diagnóstico temprano a partir de la identificación de moléculas que funcionen como biomarcadores; y, por último, un enfoque terapéutico que busca determinar los blancos moleculares e idear estrategias para el desarrollo de terapia dirigida. De esta forma se pretende doblar la tasa de supervivencia para el año 2020 (Matrisian, Aizenberg & Rosenzweig, 2012).



### 1.3. ETIOLOGÍA

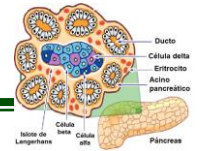
El 90% de los procesos de transformación de las células que da lugar al cáncer de páncreas, son causados por mutaciones somáticas adquiridas. Estas mutaciones se han asociado a algunos factores de riesgo, que pueden ser no modificables como: edad avanzada, sexo masculino, historia familiar y factores genéticos, raza y tipo de sangre (Rawlaa, Sunkarab & Guduputi, 2019). A su vez, estas mutaciones también se asocian a factores de riesgo modificables: que se encuentran relacionados con estilos de vida con poca actividad física, obesidad, alta ingesta de alcohol y tabaquismo, así como con procesos inflamatorios crónicos, infecciones con *Helicobacter pylori* y diabetes (Matrisian, Aizenberg & Rosenzweig, 2012) (Tabla 1). Se cree que estos factores someten a las células a condiciones de estrés, que provocan mutaciones en genes implicados en procesos de proliferación y supervivencia de las células. Recientemente se dilucidó parcialmente el mecanismo por el cual la alta ingesta de glucosa induce mutaciones que promueve cáncer de páncreas (Hu *et al.*, 2019). A su vez un 10% de los casos de cáncer de páncreas son de tipo familiar, es decir se producen como el resultado de mutaciones genéticas de línea germinal en los genes INK4A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2D), BRCA2 (Breast Cancer Type 2) y LKB (Liver Kinase B1) (Hezel, Richard, Dunne & Aram, 2015; Wolfgang *et al.*, 2013).

**Tabla 1. Factores de riesgo de cáncer de páncreas**

Factores de riesgo	
Modificables	No modificables
<i>Tabaquismo</i>	Edad
<i>Obesidad</i>	Sexo
<i>Alta ingesta de grasa</i>	Historia familiar
<i>Exposición ocupacional a productos derivados de petróleo</i>	Pancreatitis crónica
<i>Gastrectomía parcial</i>	Predicción genética
<i>Diabetes mellitus</i>	Grupo sanguíneo diferente al "O"

(modificado de Munira *et al.*, 2013)



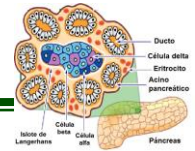


## 1.4. DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PÁNCREAS

Una de las principales causas de letalidad del cáncer de páncreas, se encuentra relacionado con un diagnóstico tardío. De forma normal el cáncer de páncreas, al igual que otros tipos de cáncer es clasificado por las reglas TNM de la AJCC “American Joint Committee on Cancer”, las cuales estadifican los procesos neoplásicos con base en el tamaño de la masa tumoral, la diseminación hacia nódulos linfáticos y posteriormente su diseminación hacia torrente sanguíneo con la evolución a metástasis (Kakar *et al.*, 2017). Esta estadificación sirve como guía para la elección del tratamiento, así como para determinar el pronóstico de vida del paciente (Figura 4).

Un diagnóstico temprano puede aumentar las posibilidades de una remoción quirúrgica curativa, sin embargo, la mayoría de los pacientes se diagnostica en estados avanzados teniendo como consecuencia un pronóstico de sobrevivida menor a un año (Loc, Smith, Matters, Kester & Adair, 2014).

La primera elección del médico es la remoción quirúrgica, la cual sólo es factible en las etapas iniciales del cáncer, cuando el tumor es de pequeño tamaño y se encuentra bien delimitado; como terapia adyuvante el uso de fármacos. Cuando se diagnostica en etapas más avanzadas, el único tratamiento es la quimioterapia o radioterapia. La quimioterapia de elección para tratar el cáncer de páncreas consta de fármacos antineoplásicos, que actúan sobre la síntesis del el DNA, de tal forma que afectan principalmente a las células de crecimiento rápido. La terapia de elección para tratar el cáncer de páncreas es gemcitabine, un profármaco que al activarse actúa como un análogo de nucleótidos que interfiere con la síntesis de DNA (Sousa Cavalcante & Monteiro, 2014). Otras alternativas de tratamiento son; el 5-fluorouracilo, que es un antimetabolito que inhibe la síntesis de timidina, o el oxiplatino que es un agente quelante que actúa sobre el DNA, produciendo enlaces alquílicos inter e intracatenarios, que inhiben la síntesis y replicación del material genético. (Pick, 2011)

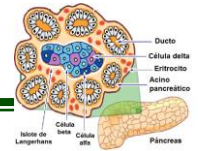


Las causas del diagnóstico tardío se deben a que es asintomático e inespecífico, inclusive los estudios a nivel genómico, epigenético y metabólico son difíciles de interpretar, por la gran heterogeneidad de las neoplasias malignas del páncreas (Matrisian, Aizenberg & Rosenzweig, 2012).

El diagnóstico clínico de la mayoría de los pacientes con cáncer de páncreas se realiza generalmente en los estadios TMN 3 y 4 que es cuando aparecen los signos y síntomas que incluyen inflamación y fibrosis, ictericia, diabetes, pérdida de peso y caquexia. Estos son signos y síntomas un tanto inespecíficos, que en la práctica clínica son indicadores sugerentes de cáncer de páncreas. Para realizar un diagnóstico adecuado es necesario realizar algunos estudios físicos como tomografías computarizadas y endoscopía con ultrasonido, resonancia magnética e incluso recurrir a técnicas más sofisticadas como la tomografía de emisión de positrones (PET) (Miura *et al.*, 2006). Al igual que para otras enfermedades se buscan métodos de diagnóstico temprano, y no invasivo, que ayuden en la detección y pronóstico de la enfermedad, así como su uso como guía en la terapia de elección, pero a pesar de los esfuerzos el único biomarcador usado actualmente es el antígeno sérico de cáncer CA 19-9, sin embargo, presenta una baja especificidad (Jiménez *et al.*, 2018; Goggins, 2011).

Estado 1A y 1B	Estado 2A y 2B	Estado 3	Estado 4 (metástasis)
<p>Tumor is 2 cm or smaller 2 cm</p>	<p>Tumor is larger than 4 cm 4 cm</p>	<p>Portal vein Cancer in 4 or more lymph nodes Common hepatic artery Celiac axis (trunk) Superior mesenteric artery</p>	<p>Stage IV Pancreatic Cancer Pancreatic cancer has spread to other parts of the body. Lung Liver Peritoneal cavity</p>
Media de supervivencia 24.1-20.6 meses	Media de supervivencia 15.4-12.7 meses	Media de supervivencia 10.6 meses	Media de supervivencia 4.5 meses
Cirugía con quimioterapia o radioterapia	Cirugía con quimioterapia o radioterapia	Cirugía con quimioterapia con Gemzar, tratamiento para el dolor y terapia de prueba.	Quimioterapia con Gemzar y tratamiento para el dolor y terapia de prueba.

**Figura 4. Estadificación TNM del cáncer de páncreas 2012.** La estadificación TNM es una clasificación de la evolución del cáncer de páncreas. Estas siglas refieren: el tamaño de la masa tumoral (T), su diseminación hacia nódulos linfáticos (N), diseminación hacia bazo sanguíneo y progresión a metástasis (M). Funciona como guía en el pronóstico de vida, y la elección del tratamiento. (Modificado de Pick, A. M. 2011; <https://www.cancer.gov/espanol>).

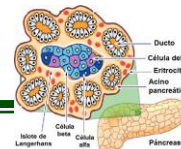


## 1.5 TIPOS DE CÁNCER PANCREÁTICO

Aparte de la estadificación del cáncer de páncreas por su grado de evolución, existe otra clasificación de importancia clínica, la cual determina el tipo de cáncer con base en las características del proceso tumoral y el tipo de célula que le dio origen, esto se utiliza como una guía para encontrar características que ayuden a mejorar la respuesta al tratamiento y el pronóstico de vida de los pacientes con cáncer de páncreas. Se sabe que los procesos neoplásicos en la glándula pancreática pueden ser iniciados por la transformación de células de origen ductal, células de tipo acinar o las células de los islotes pancreáticos (Rishi, Goggins, Wood & Hruban, 2015). Dependiendo de la estirpe celular que inicia la neoplasia, hay una evolución hacia diversos tipos de cáncer. Sin embargo, un 90% de los diagnósticos de cáncer de páncreas se define como adenocarcinoma ductal pancreático (PDACs). Un 5% se clasifica como tumores pancreáticos neuroendocrinos (PNETs), cuyo origen es a partir de la transformación de células de los islotes pancreáticos. El 5% restante puede clasificarse como: un neoplasma pseudopapilar sólido, un carcinoma de células acinares, o como un pancreatoblasma que libera enzimas digestivas (Hackeng, Hruban, Offerhaus & Brosens, 2016).

El cáncer de páncreas tipo PDAC es el más frecuente y también el más estudiado, se sabe que tanto las células de origen acinar, como las células de origen ductal pueden iniciar los procesos que evolucionarán a PDAC. Las lesiones primarias que pueden derivar a un PDAC se clasifican en: neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN) que se considera de origen acinar, la neoplasia papilar intraductal (IPMN) y neoplasia quística mucinosa (MCN) que se considera que tienen origen ductal (Basturk, 2015), (Figura 4).

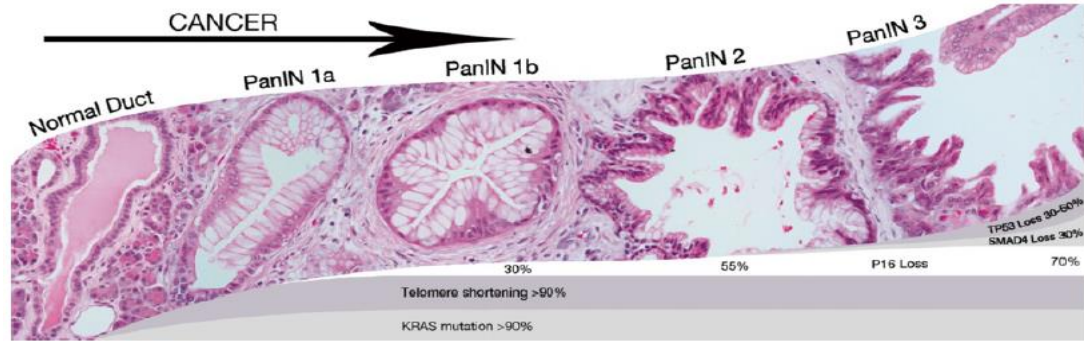
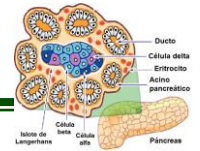
Las lesiones tipo PanIN son las más frecuentes y también las mejor caracterizadas. Desde 1999 se hizo una descripción morfológica de la evolución de esta lesión y se clasificó dependiendo el grado de su atipia, en tres diferentes grados: PanIN 1A y PanIN 1B, PanIN 2, PanIN 3 y carcinoma



*in situ*. Las primeras lesiones se caracterizan por presentar células planares y se define como PanIN 1A. Una vez que las células adquieren una forma papilar se vuelve PanIN 1B. Cuando hay más alteraciones celulares como: una polarización nuclear, se clasifican como PanIN 2. El último grado es el PanIN 3 que se caracteriza por la pérdida de la polaridad, atipia nuclear y mitosis frecuente (Koorstra, Hustinx, Offerhaus & Maitra, 2008).

## 1.6. GENÉTICA Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER PANCREÁTICO

Los aspectos moleculares de las lesiones tipo PanIN en sus diferentes grados de progresión, sugieren que hay una acumulación de mutaciones e inestabilidad genómica, conforme progresa la lesión (Leslie, 2017; Goral, 2015). Con el uso de técnicas de secuenciación del genoma completo y del exoma, fueron analizadas las diferentes fases de las lesiones PanIN. Se encontró la mutación del gen K-RAS en un 99% de las lesiones PanIN-1, así como un aumento en la proporción de células que poseen esta mutación en los grados PanIN más avanzados (Kanda, 2012). Esto sugiere que K-RAS es un gen iniciador y conductor, que le confiere a las células la capacidad de evolucionar a un estadio PanIN-2, en donde se han identificado mutaciones secuenciales a la mutación de K-RAS, como la mutación que inducen la pérdida de la función de p16. A su vez una detección progresiva de mutaciones en otros genes involucrados con el control del ciclo celular (los genes TP53 o SMAD4), se han detectado en las lesiones tipo PanIN-3. La acumulación de estas mutaciones en la célula le confiere invasividad y otras características de malignidad. Así modulan la progresión de las lesiones primarias, hasta su evolución a PDAC (Moore & Donahue, 2016) (Figura 5). El número de genes alterados en cáncer de páncreas que se han identificado sigue incrementando, sin embargo, dado que la presencia de la mutación en K-RAS es detectada en el 95% de los casos de PDAC analizados, sugieren a este oncogén como un atractivo blanco terapéutico (Bournet, Buscail, Muscari, Cordelier & Buscail, 2016).



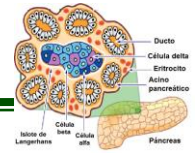
**Figura 5. Modelo de progresión de cáncer pancreático a partir de lesiones precursoras de neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN).** Este modelo de progresión de las lesiones tipo PanIN, muestra una acumulación de alteraciones genéticas que conducen la progresión de la neoplasia. Las lesiones PanIN 1 y PanIN 2 son displacias de bajo grado. Las lesiones PanIN 3 son displacias de alto grado, que eventualmente se convierte en adenocarcinoma pancreático invasivo. La secuencia de mutaciones genéticas concuerda con la progresión morfológica de PDAC. Primero la mutación en K-RAS y el acortamiento de los telómeros en un 90% de las lesiones primarias, después una pérdida progresiva de p16 a partir de PanIN1b, y por último, la pérdida de los genes SMAD4 y TP53 en las lesiones de grados más avanzados. (Tomado y modificado Hackeng *et al.*, 2016).

### 1.7. K-RAS

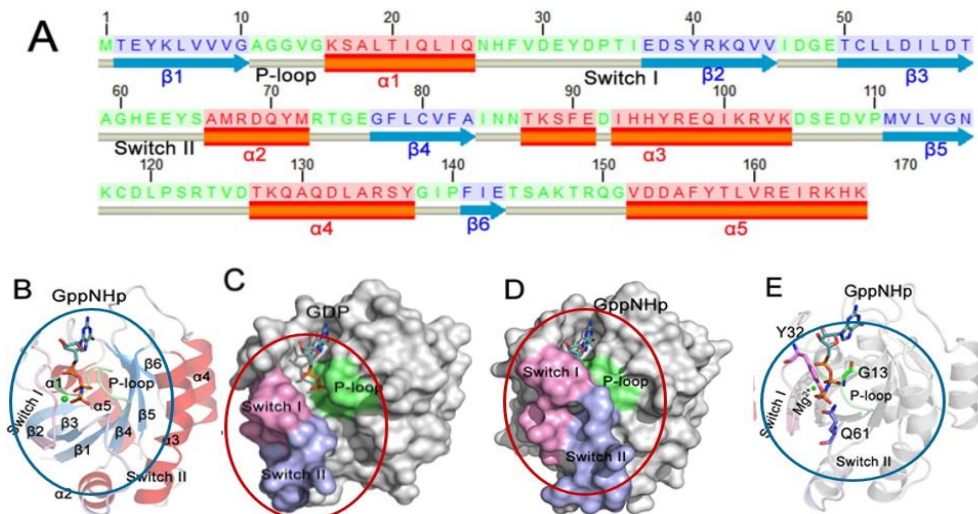
El gen K-RAS se encuentra localizado en la banda cromosomal 12p12.1, y al igual que N-RAS y H-RAS forman parte de la familia de oncogenes Ras, estos 3 genes tienen como producto proteico cuatro isoformas de las Ras GTPasas pequeñas. Las isoformas K-Ras4A, K-Ras4B son producto del “splicing alternativo” que sufre el gen K-RAS y las isoformas N-Ras y H-Ras son producto de sus respectivos genes (Jinesh, Sambandam, Vijayaraghavan, Balaji & Mukherjee, 2017).

### 1.8. GTPasas DE LA FAMILIA RAS

De forma general las pequeñas Ras GTPasas son proteínas de 21 kDa, funcionan como *switches* celulares que regulan procesos celulares, las cuatro isoformas tienen un 90% de identidad. Conservan la secuencia de sus primeros 166 aminoácidos, que corresponde a su dominio G, la estructura tridimensional de este dominio se forma a partir del plegamiento de seis laminas  $\beta$  y cinco  $\alpha$  hélices que se conectan por diez *loops* (Schmick *et al.*, 2014). El dominio G adquiere una estructura tridimensional que forma tres regiones funcionales; el *loop-P* (residuos 10 al 17) el *switch 1* y el *switch 2*.

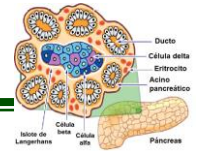


Estas regiones son funcionales porque cambian su conformación cuando se unen a los nucleótidos de guanidina trifosfatados (GTP) y a los nucleótidos de guanidina difosfato (GDP). El cambio de su conformación cuando se une a GTP o GDP, le permite adquirir estructuras que favorecen su interacción con proteínas activadoras o desactivadoras, así como con las proteínas efectoras involucradas en vías de señalización de importancia a nivel celular. (Lu, Jang, Nussinov & Zhang, 2016) (Figuras 6A y 6B).

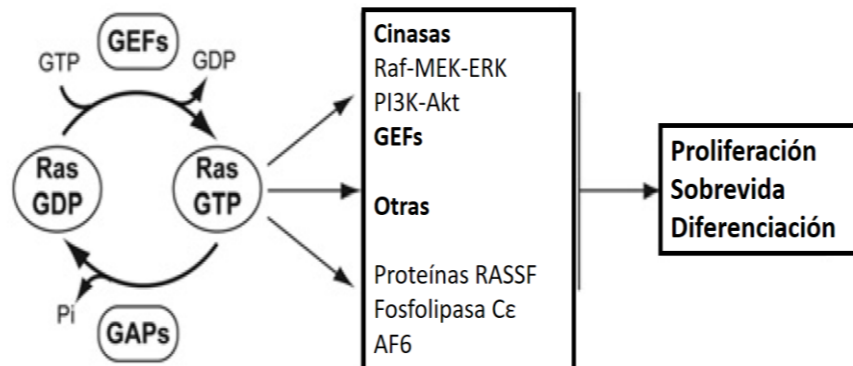


**Figura 6. Estructura del dominio catalítico de la isoforma K-Ras4B.** A) Estructura primaria y secundaria de la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico K-Ras4B. en azul se representan las láminas  $\beta$ , en rojo las  $\alpha$ -hélice y en gris los *loops* B) plegamiento del dominio catalítico cuando se encuentra unido con GppNHp (análogo no hidrolizable de GTP) C) estructura tridimensional relajada del dominio catalítico inactivo (se enmarca en azul, la conformación del *switch 1* en rosa, *switch 2* en azul y *loop-P* en verde) cuando se encuentra unido GDP D) estructura tridimensional del dominio catalítico activo (enmarcado en rojo) adquiere conformación cerrada de los dominios funcionales (*switch 1* en rosa, *switch 2* en azul y *loop-P* en verde) cuando se encuentra unido al análogo de GTP E) estructura tridimensional del dominio catalítico que resalta los aminoácidos estabilizadores de los nucleótidos. (Tomado y modificado de Lu, Jang, Nussinov & Zhang, 2016).

El cambio conformacional de las GTPasas, es inducido por la unión a sus ligandos GTP o GDP. Esta dinámica le confiere una función como un *switch*, que regula procesos celulares. En un estado activo el GTP se encuentra estabilizado por puentes de hidrógeno formados entre los residuos G13, Y32 y Q61, (Lu, Jang, Nussinov & Zhang, 2016) (Figura 6E) de tal forma que el *loop-P*, el *switch 1* y el *switch 2*, se encuentran en conformación cerrada (Figura 6D). La conformación cerrada o activa, puede ser reconocida por efectores como Raf, PI3K, RalGDS y por las GAP (proteínas activadoras de GTPasas), estas últimas son proteínas clave que regulan la desactivación de

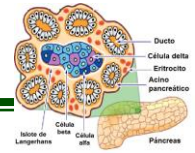


las proteínas Ras. Las proteínas GAP se unen con la forma activa de Ras (Ras-GTP) de tal forma que estabilizan al aminoácido Q61 y favorecen la hidrólisis del GTP, (Simanshu *et al.*, 2016). El resultado de la hidrólisis del GTP le permite adquirir una conformación relajada en los dominios funcionales, lo cual como consecuencia le quita la capacidad de interactuar con las proteínas efectoras. (Figura 6C) (Lu, Jang, Nussinov & Zhang, 2016; Shaoyong *et al.*, 2015). El estado inactivo se mantiene hasta que el GDP es desplazado por GTP, el proceso de activación requiere de Factores de Intercambio de Guanosinas (GEFs) que son proteínas que favorecen la liberación de GDP y la unión de GTP. El proceso cíclico de activación y desactivación de las proteínas Ras es de vital importancia para el control de múltiples vías de señalización, que promueven procesos de crecimiento, proliferación, apoptosis, migración, división y diferenciación celular (Figura 7) (Kodaz *et al.*, 2017; Newlaczyl *et al.*, 2014).

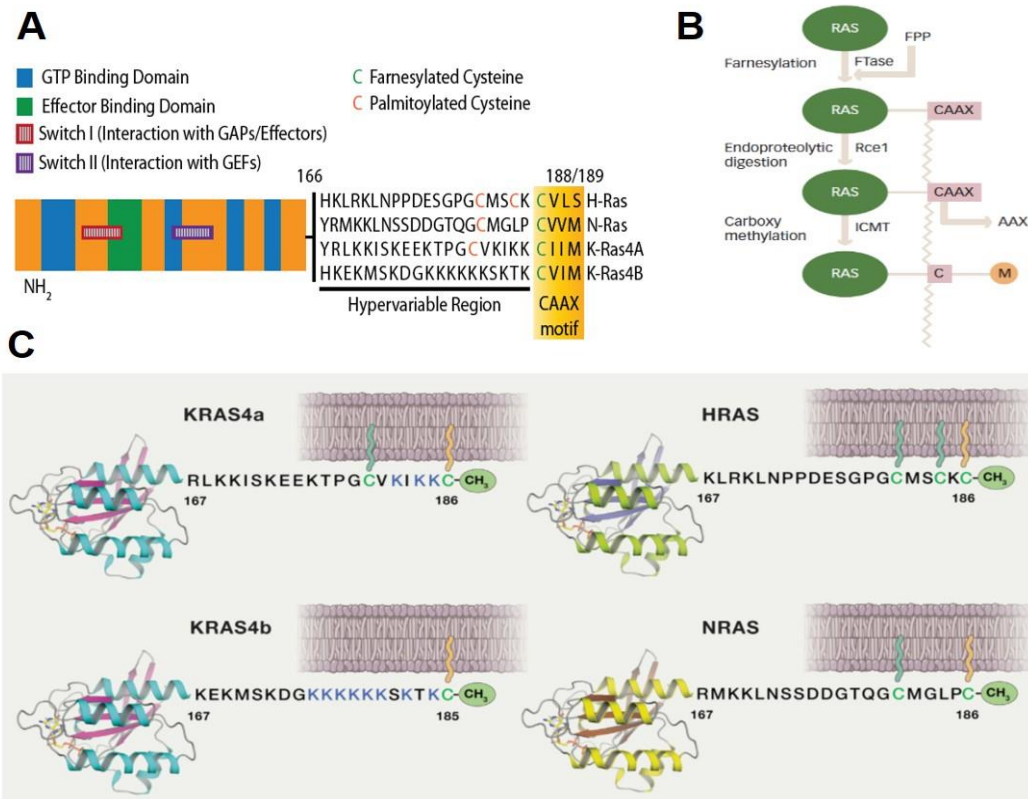


**Figura 7. Ciclo de activación de las proteínas Ras y sus vías de señalización.** La activación de las proteínas Ras GTPasa dependen de las GEFs, éstas favorecen el intercambio de GDP por GTP. Una vez unido el GTP, las Ras GTPasas quedan activas y pueden activar a sus efectores involucrados en diversas vías de señalización, tales como; proliferación, sobrevida y diferenciación. Para desactivar estas vías las GAPs promueven la hidrólisis del GTP a GDP, inactivando a las Ras GTPasas y por consiguiente la señalización. (Tomado de Newlaczyl *et al.*, 2014).

El segundo componente presente en el extremo carboxilo terminal de las GTPasas Ras, es una región hipervariable (HVR). La HVR consta de aproximadamente 20 aminoácidos que difieren entre las 4 isoformas, pero conservan el motivo CAAX (C-cisteína, A aminoácidos alifáticos y X cualquier aminoácido). El motivo CAAX es reconocido por enzimas que de forma secuencial realizan modificaciones post-traduccionales en estos residuos.

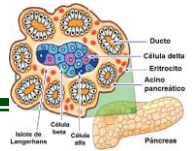


Estas modificaciones favorecen su unión a la membrana para ejercer su función. Primero, el motivo CAAX es reconocido por una enzima farnesiltransferasa, que une un grupo farnesilo de 15 carbonos en la cisteína del motivo CAAX. Esta modificación se detecta por la endopeptidasa Rce1, que cataliza la eliminación de los tres aminoácidos terminales. Posteriormente es metilado por la enzima isoprenilcystein carboxi metil transferasa (ICMT) (Gurung & Bhattacharjee, 2015). Estas modificaciones post-traduccionales, son requeridas para que las isoformas se anclen a diferentes dominios membranales y así ejercer su función. Las isoformas K-Ras4A, H-Ras y N-Ras sufren una o dos adiciones de grupos palmitoil. Esta palmitolación adicional, permite el anclaje de forma estable en la membrana, en un proceso dependiente de transporte vesicular (Figura 8) (Stephen, Esposito, Bagni & McCormick, 2014)



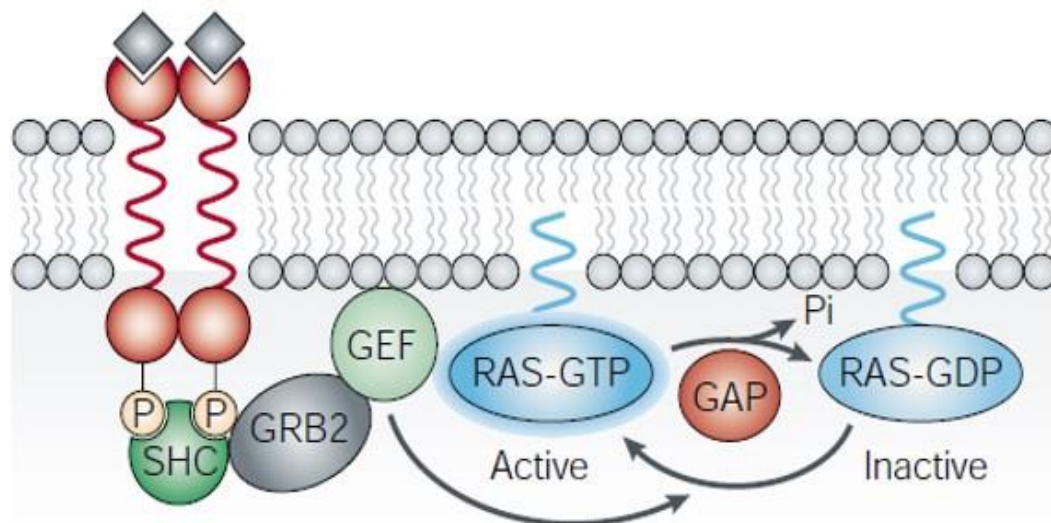
**Figura 8. Región hipervariable de las isoformas de Ras GTPasas y modificaciones post-traduccionales que favorecen su anclaje a la membrana plasmática.** A) secuencia de la región hipervariable de las isoformas de las Ras GTPasas, B) proceso de farnesilación C) anclaje de las isoformas a la membrana plasmática, mediados por sus modificaciones post-traduccionales. Se observa que la isoforma K-Ras4B sólo presenta una modificación post-traduccionales que permite su anclaje a la membrana plasmática. (amarillo grupo farnesilo) (verde grupo palmitoil). (Tomado y modificado de Stephen et al., 2014; Simanshu et al., 2017; Gurung & Bhattacharjee, 2015).



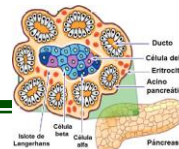


## 1.9. ACTIVADORES DE Ras

De forma normal, las Ras GTPasas se encuentran ancladas a la membrana plasmática, para ser activadas por una amplia gama de receptores que responden a estímulos extracelulares. Uno de los mejor caracterizados son los receptores tipo tirosina cinasa como EGFR (receptor de factor de crecimiento epitelial). La inducción de su actividad es regulada por señales extracelulares, que inducen procesos de trans-fosforilación de tirosinas, formando estructuras que sirven para el anclaje de proteínas con dominios SH2, como la proteína adaptadora GRB2 (proteína dos unida a receptores de factor de crecimiento), cuya función reside en reclutar a las proteínas GEFs, y así promover la activación de las proteínas Ras. Este paso es rápidamente limitado por la acción de las Ras GAPs, de tal forma que se evita una sobre-activación de procesos celulares (Figura 9) (modificado de Gurung & Bhattacharjee, 2015).

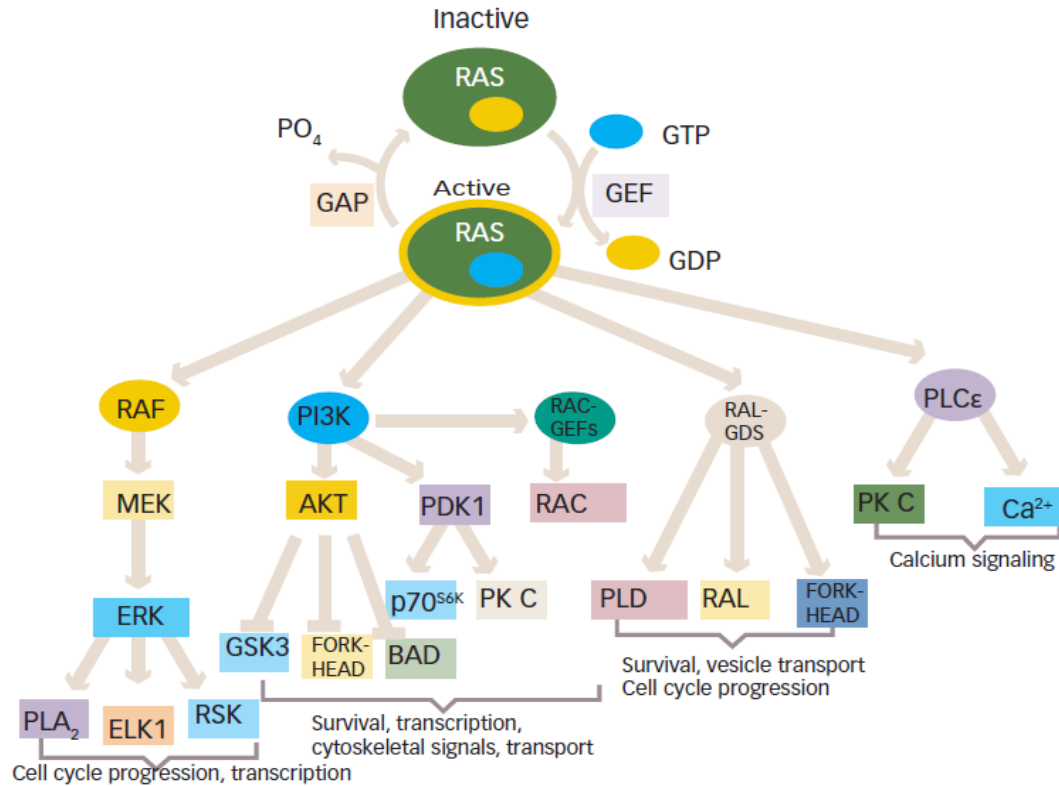
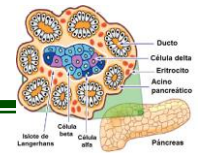


**Figura 9. Señalización río arriba de las Ras GTPasas.** El estado de activación de Ras es controlado por un ciclo de hidrólisis y unión de GTP, catalizado por GAPs y GEFs, respectivamente. La activación es dependiente de receptores, que al ser activados sufren fosforilaciones que permiten la unión de proteínas adaptadoras que acercan a las proteínas GEFs con las GTPasas, de tal forma que promueven su activación. El paso es limitado por las GAP que se encuentran ancladas a la membrana y permiten una regulación negativa de los procesos de activación, promoviendo la homeostasis. (Tomado y modificado de Gurung & Bhattacharjee, 2015).



## 1.10. EFECTORES DE LAS Ras GTPasas

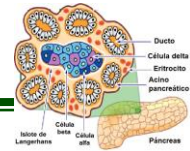
Se ha descrito que las Ras GTPasas son un nodo importante que regula la interconexión de múltiples vías de señalización. Las dos principales vías activadas por Ras son: MAPK (RAF/MEK/ERK), implicadas en procesos de proliferación, diferenciación, supervivencia y ciclo celular; y PI3K/AKT/mTOR, en la cual su efector mTOR, forma el complejo 1 (mTORC1) promueve la transcripción de genes involucrados en crecimiento, ciclo celular y metabolismo energético, mientras que el complejo mTORC2 fosforila AKT, hace una retroalimentación positiva para procesos de supervivencia y proliferación. Además, se ha reportado que la activación de AKT en las células cancerosas: promueve un aumento de la actividad de la telomerasa, e inhibición de apoptosis al bloquear la liberación de citocromo citotóxico de la mitocondria e inactivación de factores pro-apoptóticos, así como la regulación de angiogénesis a través de la activación del óxido nítrico sintasa (Cazzanelli *et al.*, 2018). Otras vías dependientes de Ras son p38, JNK y NF- $\kappa$ B que se activan en condiciones de estrés. Por otra parte, las vías de RalGDS (estimulador de disociación de nucleótidos de guanina Ral) también son activadas por las Ras GTPasas. La vía de las RalGDS induce la activación de fosfolipasa D1 (PLD) y la proteína 1 de unión al complejo molecular CDC42/RAC-GAP-RAL (RALBIP1), el cual se ha relacionado con los procesos de supervivencia, progresión del ciclo celular e inhibición de transcripción de factores de arresto celular como FORKHEAD. Otro efector importante es la proteína Tiam 1 que es un regulador positivo de Rho, el cual regula el citoesqueleto de actina. A su vez existen otras vías de señalización que dependen de Ras de forma indirecta (Gurung & Bhattacharjee, 2015; Cazzanelli *et al.*, 2018).



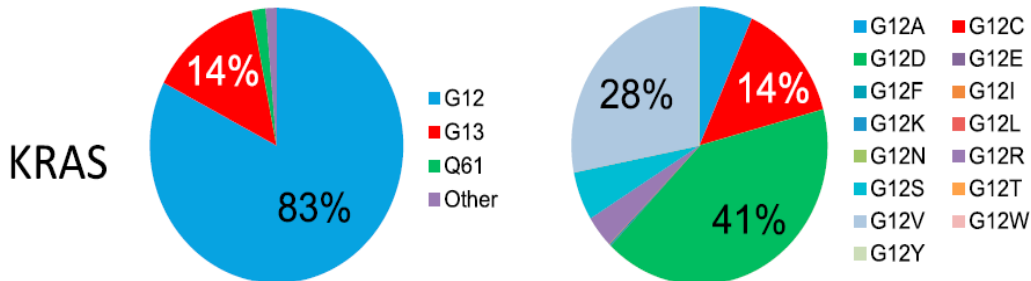
**Figura 10. Activación de Ras y vías de señalización río abajo.** Proceso cíclico de activación-desactivación de las GTPasas tipo Ras y la activación de sus efectores, que están implicadas en múltiples procesos celulares. ERK = extracellular regulated kinase; GSK3 = glycogen synthase kinase 3; MEK = mitogenactivated kinase/ERK kinase; P70S6K = p70 ribosomal protein S6 kinase; PDK1 = phosphatidyl triphosphate dependent kinase1; PI3Ks = phosphoinositide-3 kinases; PKC = protein kinase C; PLA<sub>2</sub> = phospholipase A2; PLD = phospholipase D; RALGDS-guanine nucleotide exchange factors (GEFs) for RAL; RSK = p90 ribosomal protein S6 kinas. (Tomado y modificado de Gurung & Bhattacharjee, 2015).

### 1.11. MUTACIONES EN K-RAS

La mutación en los genes RAS ha sido encontrada en diferentes tipos de neoplasias. Pero de forma particular las mutaciones en el gen K-RAS se encuentran principalmente implicadas en procesos neoplásicos en órganos de origen endodérmico como colon, pulmón y páncreas (Quinlan, Quatela, Philips & Settleman, 2008). La mutación de K-RAS se encuentra asociada con una reprogramación metabólica de las células, manteniendo encendidas las vías que conducen a la formación de células tumorales (Chuang, Huang, Kulpa & Chen, 2017). De forma general las mutaciones de K-RAS inciden de forma predominante en el codón 12, generando la sustitución de la glicina 12 por otro aminoácido, siendo más frecuente la sustitución G12D. Sin embargo, los



pacientes que tienen la mutación en el codón 13 tienen un peor pronóstico (Newlaczyl, Hood, Coulson & Pior, 2014).

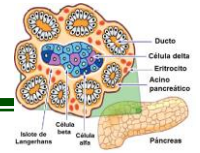


**Figura 11. Mutaciones más frecuentes en la molécula de K-RAS.** Las mutaciones en los aminoácidos 12, 13 y 61. comprenden el 99% de mutaciones encontradas en cáncer humano. La mutación más frecuente son sustituciones del aminoácido 12. Estas mutaciones mantienen un estado activo de K-Ras, manteniendo encendidas las vías de señalización implicadas en procesos de supervivencia y proliferación. (Tomado y modificado de Hobbs et al., 2016; Jomckheere et al., 2017).

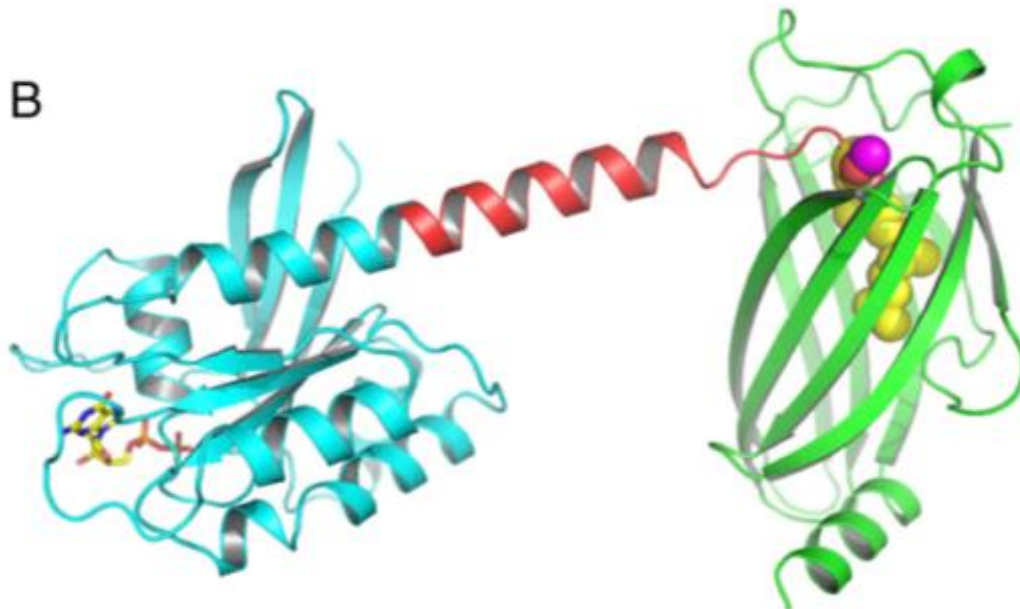
### 1.12. ISOFORMA K-Ras4B

Aunque teóricamente la alta homología en estas isoformas se encuentra en los dominios de unión a efectores, hay evidencias de que la isoforma K-Ras4B es de mayor importancia médica, ya que es esencial durante el desarrollo embrionario en el ratón, y a nivel de RNA mensajero sus perfiles de expresión son dominantes en la mayoría de los tejidos. También se ha visto que sus mutaciones se encuentran en alta frecuencia en procesos de cáncer de origen endodérmico. Otra diferencia que pretende explicar esto, indica que la unión de la isoforma K-Ras4B se ve enriquecida en dominios lipídicos que se encuentran asociados principalmente con efectores de las MAPK (Newlaczyl, Hood, Coulson & Pior, 2014; Newlaczyl, Coulson & Pior, 2017).

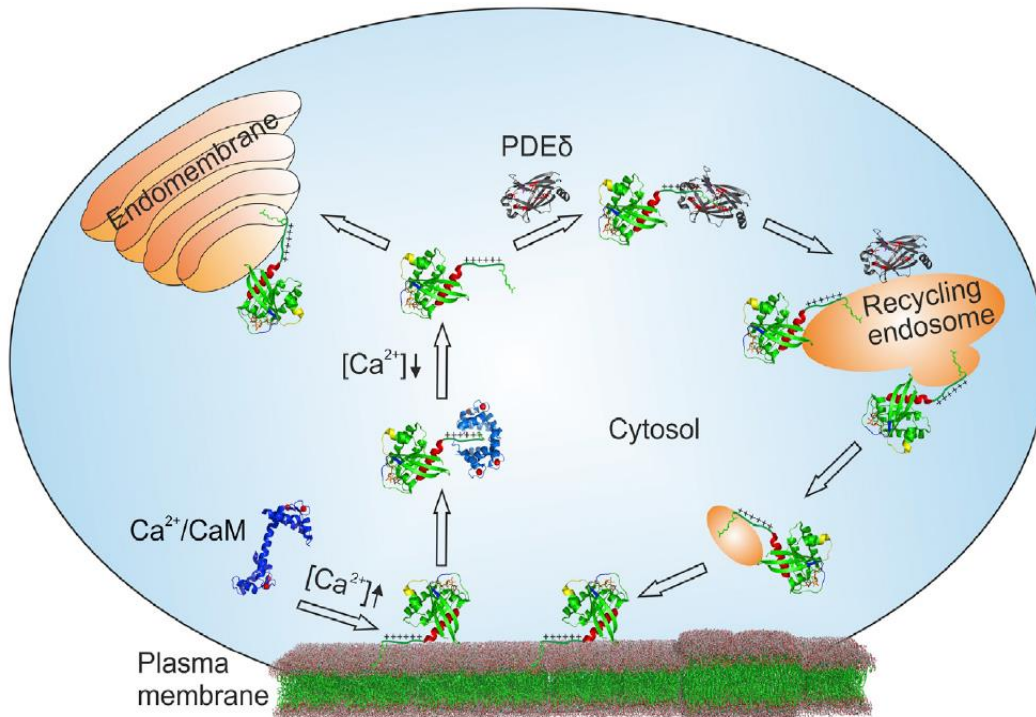
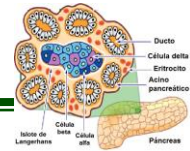
Un estudio más detallado de la isoforma K-Ras4B, ha encontrado que la principal diferencia de esta isoforma reside en su región HVR, la cual es susceptible únicamente a una farnesilación en la cisteína del motivo CAAX y presenta una secuencia rica en lisinas, estas características en su dominio HVR, hacen que su transporte sea mediado por la subunidad  $\delta$  de la fosfodiesterasa 6 (PDE6 $\delta$ ). De esta forma PDE6 $\delta$  se une al grupo farnesilo de K-Ras4B y actúa como chaperona para favorecer su anclaje a la membrana



plasmática (Chandra *et al.*, 2011) (Figura 12). Otra característica importante del HVR de la isoforma K-Ras4B, es la fosforilación en el residuo 181 que funciona como un elemento regulador de auto inhibición. Por otro lado, la secuencia rica en lisinas es importante, porque favorece su unión a dominios lipídicos enriquecidos con fosfatidilserina y ácido fosfatídico (Zhou *et al.*, 2017). Algunas evidencias sugieren que la isoforma K-Ras4B tiene una preferencia por acoplarse con las vías RAS/MAPK mientras que H-Ras y N-Ras participan en la activación de PI3K/AKT (Newlaczyl *et al.*, 2014). Una explicación de esto sugiere que la isoforma K-Ras4B al depender de PDE6 $\delta$  para ser anclada a la membrana plasmática, presenta una asociación preferencial hacia nanoclusters de lípidos desordenados y con carga negativa. Estos nanoclusters de la membrana celular se asocian a vías de señalización específicas. (Newlaczyl *et al.*, 2014; Henis, Hancock & Pior, 2009). Además, en otros estudios se ha reportado que la isoforma K-Ras4B, presenta una regulación cíclica en la interacción con la membrana plasmática, la cual es mediada por proteínas Ca<sup>2+</sup>/CaM y PDE6 $\delta$ , (Sperlich, 2016) (Figura 13).



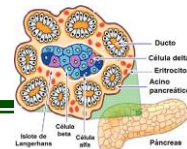
**Figura 12. Estructura del complejo K-Ras4B/PDE6 $\delta$**  La estructura del cristal del complejo K-RAS4B/PDE6 $\delta$  muestra como la subunidad  $\delta$  de la fosfodiesterasa presenta una cavidad hidrofóbica que permite la interacción con el farnesilo de K-Ras4B (grupo farnesilo en amarillo). (Tomado y modificado de Dharmiah *et al.*, 2016).



**Figura 13. Modulación cíclica de la localización celular de la Isoforma K-Ras4B mediada por proteínas Ca<sup>2+</sup>/CaM y PDE6δ.** Cuando los niveles de calcio en la célula son elevados, la isoforma K-Ras4B es extraída de la membrana plasmática, este proceso es favorecido por su unión con la proteína CaM (calmodulina). Cuando los niveles de calcio bajan se pierde la unión de CaM /K-Ras4B, de esta forma K-Ras4B queda libre y puede unirse a endomembranas o a PDE6δ. El complejo K-Ras4B/PDE6δ es conducido hacia endosomas de reciclamiento, de esta forma la PDE6δ libera a la isoforma K-Ras4B para que sea anclada a las membranas de los endosomas, que posteriormente regresan a membrana plasmática. (Tomado y modificado de Sperlich et al.,2016).

### 1.13. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS CONTRA EL BLANCO MOLECULAR K-Ras

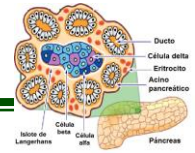
El objetivo general de las estrategias terapéuticas en contra de K-Ras es disminuir la señalización oncogénica aberrante. La cual es consecuencia de las mutaciones activadoras del gen K-RAS. Es por ello que se propone a K-Ras como un blanco molecular. Y las propuestas terapéuticas se plantean a diferentes niveles. Una estrategia de inhibición directa contra K-RAS es a nivel traduccional, mediante RNA interferentes; sin embargo, esta estrategia no puede ser usada en la clínica por la estabilidad del RNAi y su alta toxicidad. Una segunda alternativa ha sido la búsqueda de compuestos que se unan directamente a K-Ras, bloqueando la unión a sus efectores, o favoreciendo la hidrólisis del GTP, para mantener a K-Ras inactivo. No obstante, ésta ha sido una tarea complicada por dos razones; primero la estructura de K-Ras no



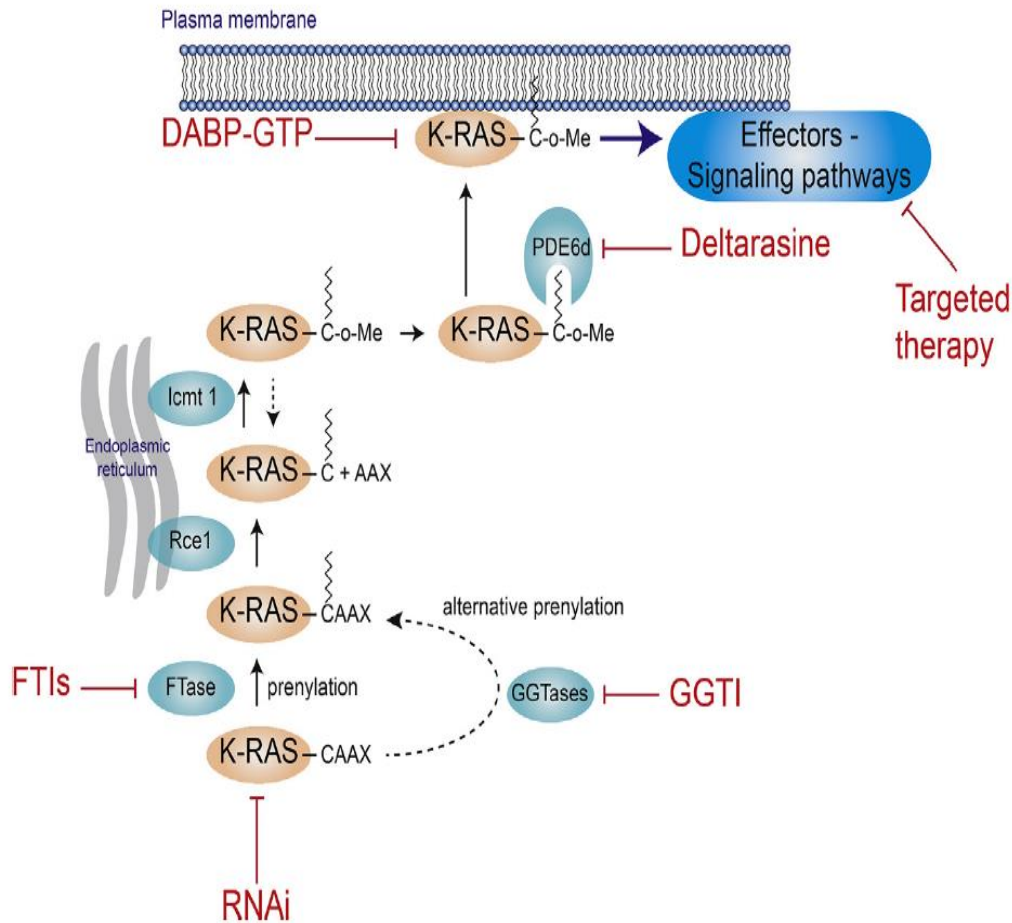
presenta una superficie topológica adecuada, es decir no cuenta con cavidades para la unión de moléculas antagonistas de alta afinidad y segundo, una baja especificidad de las moléculas inhibitoras de K-Ras, como consecuencia de la alta similitud del dominio G, entre las diferentes isoformas de las Ras GTPasas. La inhibición directa de la función de K-Ras o el impedir su síntesis no han sido estrategias exitosas. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevos protocolos basados en mecanismos indirectos (Jonckheere *et al.*, 2016; Waters & Der, 2018).

Para que las proteínas Ras GTPasas activen a sus efectores y por ende sus vías de señalización, es necesario que se encuentren ancladas a la membrana plasmática. Partiendo de esta idea se ha propuesto interferir con ese proceso mediante diferentes métodos, como; bloquear las modificaciones postraduccionales que requiere K-Ras para ser anclada a la membrana plasmática. Dentro de los primeros intentos se reportaron inhibidores la enzima farnesiltransferasa, con resultados prometedores. Pero no se contaba con la existencia de un mecanismo alternativo de prenilación de K-Ras, mediado por enzimas geraniltransferas. Después, se intentó usar los inhibidores de ambos mecanismos de prenilación, sin embargo, registraron un elevado efecto citotóxico, así ninguna de estas estrategias terapéuticas ha sido exitosa (Appels, Beijnen & Schellens, 2005).

Una de las terapias más prometedoras fue desarrollada después de que se reportó que PDE6δ es capaz de funcionar como chaperona para el anclaje de K-Ras4B a la membrana plasmática y que su silenciamiento modula la señalización oncogénica de Ras en células de cáncer de páncreas K-Ras dependientes (Chandra *et al.*, 2011); con base en esto, el grupo de Zimmermand y colaboradores en el 2013 publicaron a deltarasin, un compuesto dirigido a la cavidad hidrofóbica de PDE6δ. Este compuesto inhibe el anclaje de K-Ras4B a la membrana plasmática, sin embargo, presenta una desventaja, al inhibir la función de PDE6δ no sólo afecta su interacción con el farnesilo de la región HVR de K-Ras4B. También tiene un impacto en la

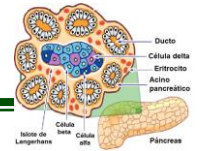


interacción que tiene PDE6δ con otras proteínas farnesiladas y por ende en su función (Jonckheere *et al.*, 2016; Adriane *et al.*, 2014). En otro estudio se reportó deltazina 1, un análogo de deltarasin desarrollado con el fin de aumentar la especificidad del compuesto por el blanco terapéutico y así reducir la toxicidad, sin embargo, cuando se intentó evaluar su potencial farmacológico, resultó ser rápidamente metabolizado en los modelos murinos, invalidando su uso en experimentos *in vivo* (Papke *et al.*, 2016).



**Figura 14. Estrategias terapéuticas contra el blanco molecular K-Ras y sus modificaciones post-traduccionales.** Resumen esquemático de las estrategias terapéuticas para la inhibición de diferentes procesos involucrados en la señalización de K-Ras. FTase: Farnesiltransferasa, FTI: inhibidor de FTase, GGTase: Geranilgeraniltransferasa, GGTI: inhibidor de GGTase, Me: metilo, DABP-GTP (Diamino-benzophenone-phosphoamidate-GTP), Rce1: enzima convertidora de Ras 1, Icmt1: Isoprenilcisteína carboximetiltransferasa 1, PDE6δ. fosfodiesterasa 6δ. (Tomado de Jonckheere *et al.*, 2016).

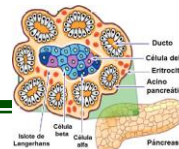




## 2. ANTECEDENTES

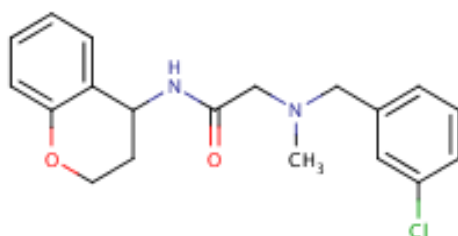
La mutación en el gen K-RAS se encuentra en el 90% de los casos de cáncer de páncreas, y se ha descrito como un elemento clave para el inicio y progresión de este tipo de cáncer. Esto ha llevado a proponerlo como un blanco terapéutico, sin embargo, la alta similitud con las otras isoformas de las Ras GTPasas, así como su participación en múltiples vías de señalización, han complicado esta tarea (Waters & Der, 2018). No obstante, la búsqueda continúa y es apoyada con un estudio más detallado, con el fin de aumentar la especificidad de los fármacos por K-Ras y evitar así un daño generalizado en las células no tumorogénicas (Liu, Wang & Li, 2019). Uno de los hallazgos de mayor relevancia fue que la región carboxilo terminal de la isoforma K-Ras4B, sólo sufre la adición de un grupo farnesilo, por lo cual su anclaje a la membrana plasmática no es mediada por transporte vesicular, posteriormente se determinó que requiere la ayuda de una proteína chaperona (PDE6 $\delta$ ) para promover su anclaje a la membrana plasmática (Chandra *et al.*, 2011), este hallazgo trajo nuevas propuestas para inhibir la señalización de K-Ras4B (Nussinov, Tsai, Chakrabarti & Jang, 2016). En el 2013 se publicó el compuesto deltarasin por el grupo de (Zimmermann *et al.*, 2013), este benzimidazol se une directamente a la cavidad hidrofóbica de PDE6 $\delta$  impidiendo la interacción con el grupo farnesilo de K-Ras4B, lo que impide el anclaje de K-Ras4B a la membrana plasmática. Sin embargo, la proteína PDE6 $\delta$  funciona como chaperona de otras proteínas farnesiladas, esto provoca que su inhibición afecte otros procesos celulares (Zhang, Constantine, Frederick & Baehr, 2012).

En la búsqueda de una alternativa más específica, nuestro grupo de trabajo ha ideado una estrategia más selectiva, cuyo objetivo es encontrar compuestos que estabilicen el complejo K-Ras4B/PDE6 $\delta$  y de esta forma, se aumente la especificidad para inhibir solamente con el anclaje de la isoforma K-Ras4B a la membrana plasmática. Con esta estrategia se busca reducir la



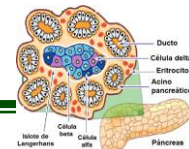
señalización, que promueven procesos de proliferación y supervivencia, de células de cáncer de páncreas dependientes de la proteína K-Ras, sin afectar otros procesos celulares. Para la búsqueda de este compuesto se realizó un cribado virtual, sobre la interfaz del complejo molecular de K-Ras4B/PDE6 $\delta$  diseñado por homología. Se probaron compuestos de la quimioteca ENAMINE y se seleccionaron 38 compuestos con mayor *score* de interacción y potencial farmacológico (Casique, 2016) (Figura 13). Posteriormente a este trabajo, fue publicado el cristal del complejo K-Ras4B/PDE6 $\delta$  (Dharmaiah *et al.*, 2016), con el cual se validó que los 38 compuestos previamente seleccionados sobre el complejo modelado tuviesen interacción con el complejo K-Ras4B/PDE6 $\delta$  del cristal (Casique *et al.*, 2018). Los 38 compuestos fueron probados *in vitro* a una concentración de 200  $\mu$ M sobre una línea celular de cáncer de páncreas dependiente de K-Ras (MIA PaCa-2), los resultados obtenidos fueron analizados y se seleccionó al compuesto C14 por reducir la viabilidad de la línea celular cancerígena dependiente de K-Ras (MIA PaCa-2) (Casique *et al.*, 2018).

Con base en este resultado preliminar, se comenzó un nuevo proyecto de maestría de la Q.F.B. Lorena Gorgonio perteneciente a nuestro grupo de trabajo, este trabajo tenía como propósito la caracterización del compuesto C14 (Figura 15). Se describió su estructura química y sus grupos funcionales: un grupo N-metilacetamida, un grupo clorofenilo y un grupo benzopirano o cromeno, el cual es una estructura compuesta por un anillo bencénico rígido y un heterociclo de seis átomos con un oxígeno en la posición dos (Gorgonio, 2016).

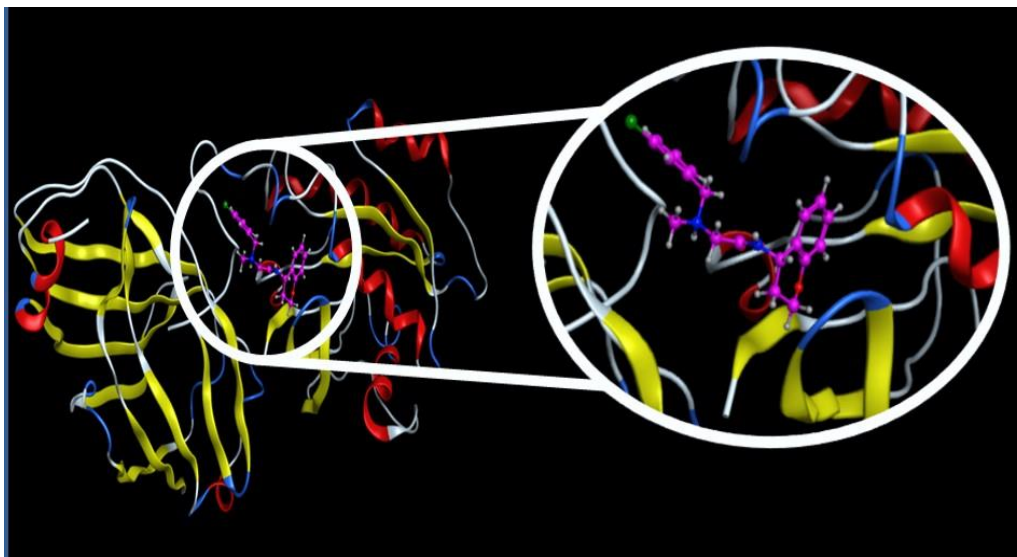


Compuesto: C14
IUPAC: 2-[(3-clorofenil)-metil-metil-amino]-N-croman-4-il-acetamida
peso molecular: 344.83 g/mol

**Figura 15. Estructura del compuesto C14 2-[(3-clorofenil)-metil-metil-amino]-N- croman-4-il-acetamida.** El compuesto orgánico C14 presenta en su estructura un grupo benzopireno, un grupo clorofenilo y N-acetamida (Briseño, trabajo de tesis., 2019).



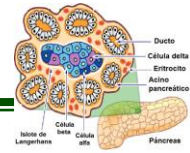
Después de la descripción de su estructura, se realizaron análisis *in silico* de la interacción del compuesto C14 con el complejo molecular K-Ras4B/PDE6 $\delta$  (Figura 16).



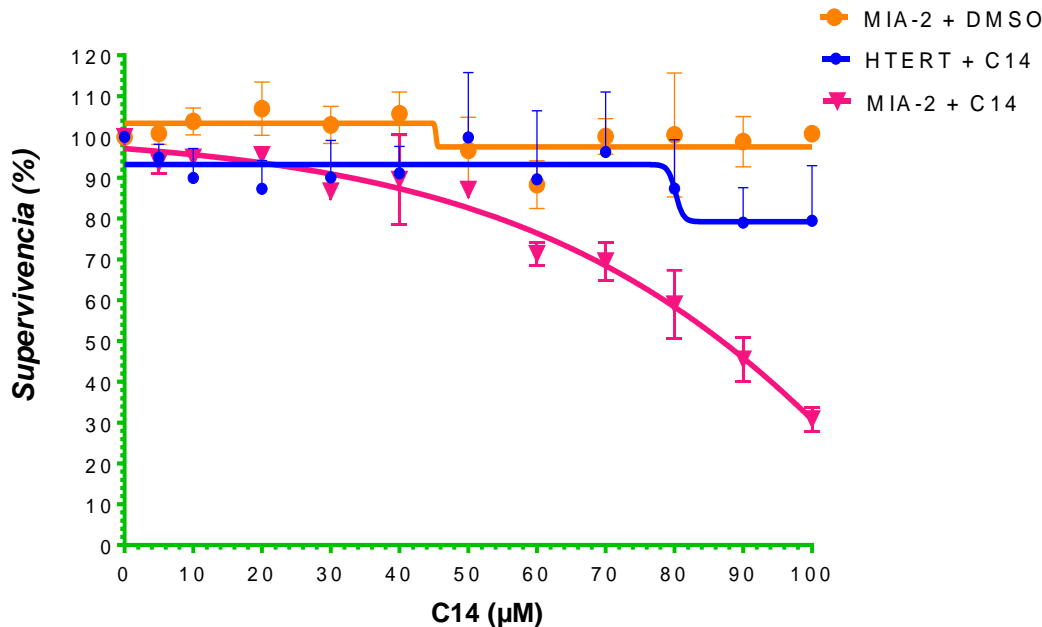
**Figura 16. Modelo *in silico* de la interacción del compuesto C14 con el complejo molecular K-Ras4B/PDE6 $\delta$ .** El compuesto C14 presenta interacciones *in silico* con la interfaz del complejo molecular K-Ras4B/PDE6 $\delta$ , por medio de interacciones formadas por puentes de hidrógeno y puentes salinos. (Tomado de Briseño, trabajo de tesis, 2019).

Una vez demostrada la interacción del compuesto C14 con la interfaz del complejo proteico K-Ras4B/PDE6 $\delta$ , se evaluó su capacidad antineoplásica en líneas celulares de páncreas. Una de estas líneas celulares, es la línea celular MIA PaCa-2 proveniente de un adenocarcinoma ductal infiltrante. Esta línea celular presenta la mutación G12C en el gen K-RAS, en TP53 en el codón 248 y una delección homocigota en CDKN2A (Deer *et al.*, 2010). La otra línea celular en que se probó el compuesto proviene de células ductales pancreáticas metaplásicas, denominada hTERT-HPNE.

Esta última, es una línea celular no tumorigénica, fue immortalizada por la transfectarla con la subunidad catalítica de telomerasa humana, las células mantuvieron un control de crecimiento normal y sin mutaciones en las proteínas p16, K-Ras o p53 (Lee, Nguyen, Ulrich, Pour & Ouellette, 2003) ambas líneas celulares fueron tratadas con el compuesto C14 a diferentes concentraciones, desde 10  $\mu$ M hasta 100  $\mu$ M durante 72 h, (Figura 17) y se determinó su curva de dosis respuesta. Los resultados permitieron sugerir,



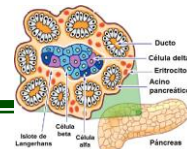
que el compuesto C14 presenta un efecto citotóxico selectivo contra la línea celular de cáncer de páncreas, ya que con una concentración 100  $\mu\text{M}$  se obtuvo una disminución del 70% en la línea celular MIA PaCa-2, mientras que la misma concentración probada en la línea celular hTERT-HPNE tuvo un efecto citotóxico en sólo 20% de estas células no tumorigénicas.



**Figura 17. Curva dosis respuesta del compuesto C14 a las 72 horas.** Se evaluó la viabilidad de las células después de estar incubadas por 72 h con diferentes concentraciones del compuesto C14. La línea rosa corresponde a la curva dosis-respuesta obtenida con la línea celular de cáncer de páncreas MIA PaCa-2 y en azul se observa el efecto del compuesto C14 sobre la línea celular de páncreas no tumorigénica hTERT-HPNE, como un control, se probó el efecto del DMSO sobre la línea MIA PaCa-2 (línea anaranjada). Con estos datos se determinó un  $\text{IC}_{50}$  de 90  $\mu\text{M}$ . (Tomado de Gogonio, 2016).

También se demostró que el compuesto C14 induce muerte por apoptosis a una concentración de 90  $\mu\text{M}$  durante 24 h, los resultados fueron obtenidos por citometría de flujo y mediante ensayos de microarreglos de proteínas fosforiladas se determinó que el compuesto C14 interfiere en la vía de señalización de K-Ras, ya que en la línea celular MIA PaCa-2 se observó la disminución de p70S6, ERK, GSK-3, JNK, AKT.

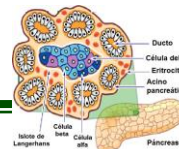
Esto sugiere que el compuesto C14 tiene efecto sobre la síntesis de proteínas, proliferación y supervivencia en la línea celular MIA PaCa-2 dependiente de K-Ras oncogénico (Gorgonio, 2016). También se demostró mediante ensayos



en un modelo de xenoinjerto murino, que el compuesto C14 tenía un efecto antineoplásico, teniendo una reducción de la masa tumoral de hasta 80%.

Con base en los resultados de nuestro grupo de trabajo, se apoyó la idea de seguir con el estudio del compuesto C14. No obstante, el continuar con su estudio implicaba determinar cómo era su biodistribución; por lo cual se planteó el marcaje del compuesto con un radioisótopo. Como otros estudios reportan el uso de radioisótopos de yodo (Jeon *et al.*, 2015; Yurt, Durkan, Yildirim, Acar & 2006), se propuso la obtención de un análogo del compuesto C14, que mantuviese la interacción con su blanco molecular y sus propiedades citotóxicas, o inclusive las mejorara. De esta forma se realizó la síntesis de un derivado del compuesto con un cambio único: la sustitución del halógeno, cambiando el cloro del compuesto C14 por yodo. Así se obtuvo el compuesto C14I, que mantiene la misma estructura, grupos funcionales y el farmacóforo, y de esta forma se espera que su comportamiento sea muy similar al compuesto cabeza de serie C14.

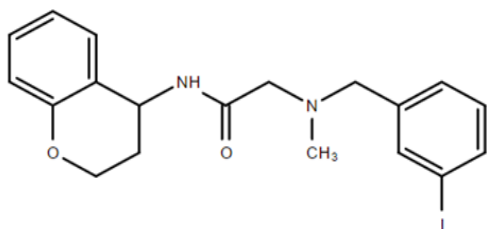
Las características estructurales y fisicoquímicas del compuesto C14I son similares a las del compuesto C14 y al igual que el compuesto C14, el compuesto C14I cumple con las cinco reglas de Lipinski (Tabla 2), que son los parámetros fisicoquímicos que predicen si un compuesto tiene propiedades farmacológicas y si su probabilidad de absorción es alta (Figura 18). El compuesto C14I presenta un peso molecular menor de 500 g/mol, este es un descriptor fundamental que predice la permeabilidad a través de la barrera intestinal y vascular, a su vez el compuesto C14I también cumple con el número de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno, así reduce la unión inespecífica con otras moléculas. Además, su puntaje del coeficiente de partición octanol/agua o LogP es de 3.88, es decir que, aumento en comparación al compuesto líder C14 que tiene un LogP de 3.63, este aumento era esperado en función de la menor electronegatividad del yodo con respecto al cloro. De esta forma, su presencia en el compuesto C14I, le confiere menor polaridad a la carga parcial del compuesto C14I y



por ende mayor solubilidad en un medio hidrofóbico, y mejor capacidad de atravesar la membrana plasmática (Lipinski, Lombardo, Dominy & Feeney, 2001).

**Tabla 2. Parámetros de Lipinski del compuesto C14I**

	<b>C14I</b>	<b>REFERENCIA<sup>1</sup></b>
	<b>C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	
<b>Peso molecular</b>	438.3 g/mol	≤500 g/mol
<b>Aceptores de puentes de hidrógeno</b>	4	≤10
<b>Donadores de puentes de hidrógeno</b>	2	≤5
<b>LogP</b>	3.88	≤5
<b>Núm. de átomos</b>	42	20-70

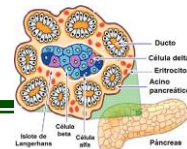


Compuesto: C14I

IUPAC: 2-[(3-yodofenil)-metil-metil-amino]-N-croman-4-il-acetamida

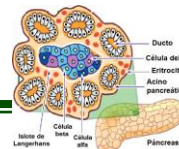
peso molecular: 438.3 g/mol

**Figura 18. Estructura del compuesto C14I.** La nomenclatura IUPAC del compuesto C14I es; 2-[(3-yodofenil)-metil-metil-amino]-N-croman-4-il-acetamida. Sus principales grupos funcionales son: un yodofenilo, un grupo metilamino, un grupo acetamida, y un benzopireno.



### 3. JUSTIFICACIÓN

La caracterización del compuesto C14 *in vitro* ha generado resultados prometedores, al igual que los primeros resultados obtenidos en los modelos murinos, con base en esto se planteó la obtención del análogo del compuesto C14, el compuesto C14I; el cual presenta una molécula de yodo en su estructura. De tal forma que, la sustitución con un radioisótopo de yodo, le confiera características que le permitan ser usado en estudios posteriores como una herramienta molecular, para determinar su biodistribución. Sin embargo, el cambio de un solo átomo podría tener un impacto en la interacción del compuesto con su blanco molecular K-Ras4B/PDE6 $\delta$ , y a su vez un efecto en la actividad citotóxica es por ello que con este proyecto se busca caracterizar el compuesto C14I *in silico* e *in vitro*.



#### 4. HIPÓTESIS

El compuesto C14I se une al complejo molecular K-Ras4B/PDE6 $\delta$  y presenta mayor actividad citotóxica en comparación al cabeza de serie C14, en células de cáncer de páncreas

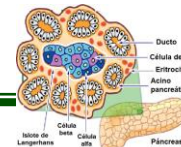
#### 5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las propiedades citotóxicas del compuesto C14I en una línea celular de cáncer de páncreas y determinar su probable interacción con K-Ras4B y PDE6 $\delta$ .

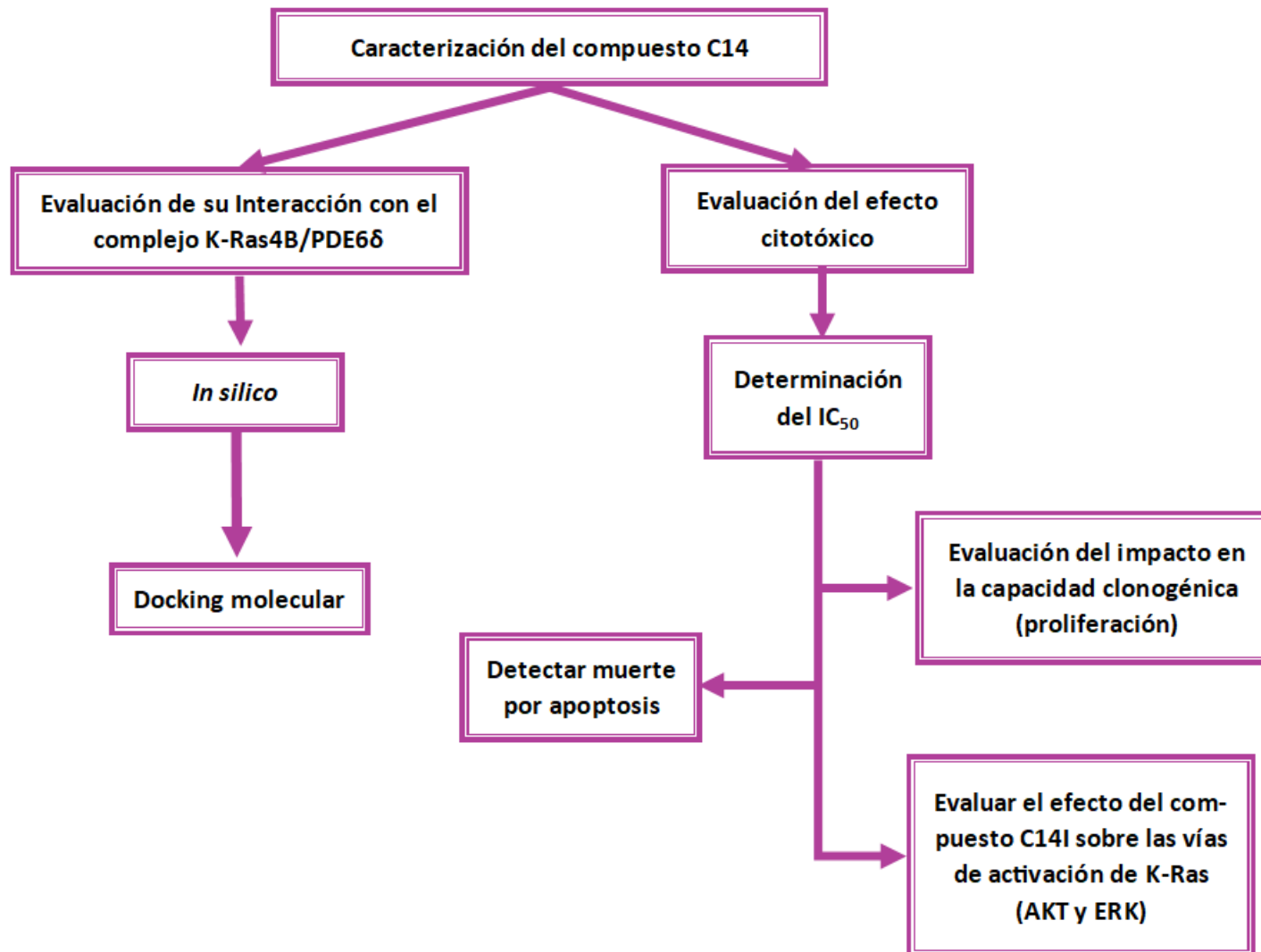
#### 6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

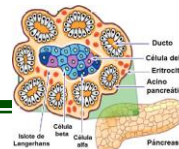
1. Análisis *in silico* de las interacciones del compuesto C14I con el complejo molecular K-Ras4B/PDE6 $\delta$  (WT y en las mutantes G12C y G12D).
2. Determinar el IC<sub>50</sub> del compuesto C14I (MIA PaCa-2, y hTERT-HPNE).
3. Evaluar la capacidad clonogénica de células MIA PaCa-2 bajo el tratamiento con el compuesto C14I.
4. Detectar si el compuesto C14I induce muerte por apoptosis (MIA PaCa-2, y hTERT-HPNE).
5. Evaluar el efecto del compuesto C14I sobre la vía de activación de dos de los principales efectores dependientes de K-Ras; AKT<sup>P</sup> y ERK<sup>P</sup>.





## 7. DESARROLLO EXPERIMENTAL





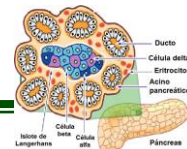
## 8. METODOLOGÍA

### 8.1. ACOPLAMIENTO MOLECULAR

Para determinar *in silico* los posibles sitios de contacto del compuesto C14I sobre la interfaz del complejo molecular K-Ras4B/PDE6 $\delta$ , se empleó el programa bioinformático MOE (*Molecular Operating Environment*) versión 2014.09. En este programa se construyó la estructura del compuesto C14I y también fue importado el archivo PDB de la estructura del cristal del complejo K-Ras4B/PDE6 $\delta$ . Una vez decodificados los archivos del ligando y del blanco molecular en el programa MOE 2014.09, se prepararon las estructuras.

#### ***Preparación del ligando***

La estructura del compuesto C14I fue construida con el programa MOE 2014.09. y después, fue preparada. Para esto, primero se determinó el estado de protonación del compuesto, se asignaron cargas parciales y se optimizaron tanto la geometría del compuesto como la orientación de los átomos de hidrógeno. Posteriormente se verificó la carga neta del compuesto, y se sometió al campo de fuerza MMFF94x para llevarlo a un estado de mínima energía. Después de esta preparación preliminar, se obtuvieron los confórmeros o estereoisómeros del compuesto C14I. Los confórmeros fueron ordenados por puntajes, y se seleccionaron los 10 confórmeros del compuesto C14I con menores puntajes de energía. Cada confórmero es una estructura 3D distinta del mismo compuesto, en donde los átomos del compuesto C14I adquirieron diferentes orientaciones en los ejes X, Y y Z, de esta forma, los 10 confórmeros con menor energía son aquellos en los que sus átomos tienen un acomodo más favorable termodinámicamente. Los 10 confórmeros seleccionados se volvieron a evaluar, y por último, se realizó una segunda minimización de energía de acuerdo al campo de fuerza MMFF94x usando como criterio de convergencia un valor de RMS (gradiente de la raíz cuadrática media) con una fuerza inferior a 0.1 kcal/mol/Å<sup>2</sup>.



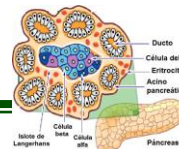
## **Preparación del complejo molecular K-Ras4B/PDE6δ**

Se buscó en el PDB (Protein Data Bank) la existencia del complejo molecular K-Ras4B/PDE6δ cristalizado y con estructura determinada por difracción de rayos X (Dharmaiah *et al.*, 2016). La estructura del complejo molecular fue exportada al programa MOE 2014.09, el archivo se visualizó en una celda unitaria de tal forma que sólo se trabajó con un complejo proteína-proteína. Posteriormente fue preparada la estructura del complejo molecular, mediante la adición de los átomos de hidrógeno y de las cadenas laterales de los aminoácidos faltantes. Después se determinó su estado de protonación, y se asignaron cargas eléctricas parciales en cada átomo. También, el complejo, se sometió al campo de fuerza MMFF94x hasta alcanzar un RMS de 0.1 kcal/mol/Å<sup>2</sup>, de esta forma se realizó la minimización de energía de la estructura cristalográfica.

Para generar las interfaces del complejo molecular correspondientes a las mutaciones G12C y G12D del gen K-RAS, se hizo una mutación *in silico*, es decir se realizó el cambio de aminoácido correspondiente en la posición doce de la secuencia de aminoácidos de la proteína K-Ras4B. De esta forma se generaron las interfaces del complejo K-Ras4B<sup>G12C</sup>/PDE6δ y K-Ras4B<sup>G12D</sup>/PDE6δ. Las cuales fueron preparadas de la misma forma que el cristal original K-Ras4B/PDE6δ, al cual lo referiremos posteriormente como el complejo K-Ras4B<sup>WT</sup>/PDE6δ, o complejo sin mutación.

## **Docking**

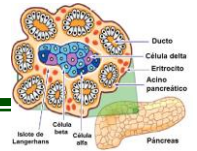
El acoplamiento molecular se llevó a cabo utilizando el software MOE 2014.09. Primero, se subió el archivo del complejo K-Ras4B/PDE6δ, preparado previamente como se menciona en la sección anterior. Posteriormente se definió el sitio del complejo K-Ras4B/PDE6δ con el cual debían interactuar los compuestos; de esta forma se seleccionaron los aminoácidos que se encuentran en la interfaz de ambas proteínas en un intervalo de 15 Å. Una vez definido el sitio del receptor, se inició la simulación del *docking* molecular, para



ello se seleccionó el archivo con los 10 mejores conformeros, que fueron preparados y seleccionados como se describió previamente.

Los cálculos del *docking* o acoplamiento molecular fueron llevados a cabo con los ajustes de parámetros estándar recomendados. Es decir, como método de emplazamiento se usó *Alpha triangle*, este algoritmo de posición fue evaluado por el puntaje con el campo de fuerza para *docking* London dG. Después, para obtener las mejores poses del acoplamiento molecular se sometió a un refinamiento, esto implica realizar otra minimización de energía del ligando en el sitio fijo, bajo el campo de fuerza London dG. Las mejores poses de interacción fueron enlistadas por puntaje y se evaluaron las 50 poses con mejores puntajes, cada pose fue analizada por separado. Para la elección de la mejor pose del compuesto se tomó como criterio primero el puntaje y segundo que tuviera interacciones tipo: donadores de hidrógeno, aceptores de hidrógeno o interacciones H-pi, simultáneamente con aminoácidos de ambas proteínas en la interfaz entre ellas (K-Ras4B y PDE6 $\delta$ ).

La elección de las mejores poses con base en los criterios anteriores pretende determinar si el compuesto C14I funciona como una grapa molecular para estabilizar al complejo K-Ras4B/PDE6 $\delta$  de la misma forma en que lo hace C14. Una vez hecha la elección de la mejor pose del compuesto C14I, se evaluó el reacomodo de los átomos de la misma pose después de hacer el cambio del átomo del halógeno yodo por cloro; de esta forma se evaluó el comportamiento del compuesto C14, posicionado con la mejor pose de interacción del compuesto C14I. De la misma forma se evaluó el comportamiento del compuesto C14I, al ser posicionado con la mejor pose del C14; es decir, se obtuvo la mejor pose del compuesto C14 y sobre esta pose se hizo el cambio del átomo de cloro por yodo, dando libertad a los átomos del compuesto, para evaluar su reacomodo. Las mejores poses obtenidas por esta estrategia fueron comparadas en función del puntaje, patrones de interacción e interacciones de ligación calculadas con los mismos parámetros descritos anteriormente.

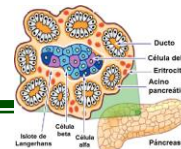


## 8.2. CULTIVO CELULAR DE LAS LÍNEAS CANCEROSAS PANCREÁTICAS

Para evaluar el efecto citotóxico del compuesto C14I contra células de cáncer pancreático K-Ras dependientes. Se trabajó con la línea celular MIA PaCa-2, porque cumple con las características previamente descritas; como control se usó la línea celular hTERT-HPNE por ser una línea celular no tumorigénica proveniente de páncreas. Ambas líneas celulares fueron cultivadas en monocapa, adheridas al fondo de la caja de cultivo, o placa; usando medios de cultivo específicos sugeridos por la American Type Culture Collection, suplementados con un 10% de suero fetal bovino, penicilina (50 U/mL) y estreptomina (50 mg/ml). Se incubaron alrededor de 55 mil células por  $\text{cm}^2$  a  $37^\circ\text{C}$  con  $\text{CO}_2$  al 5%. Se usó una incubadora con regulación electrónica de la temperatura y la concentración de  $\text{CO}_2$ . La manipulación de las células se llevó a cabo en una campana de flujo laminar estéril.

La obtención de los subcultivos se realizó por pases; a partir de cultivos celulares que se encontraban en semiconfluencia. Para esto se disgregó la monocapa de células utilizando tripsina. Una vez disgregada la monocapa se neutralizó el efecto de la tripsina con el medio de cultivo. Después, las células tripsinizadas fueron centrifugadas a 1000 g durante 5 minutos en tubos cónicos de 15 mL.

Tras la centrifugación, se decantó el sobrenadante, y así fue obtenido el botón celular, el cual se resuspendió en 4 mL de medio de cultivo, con un pipeteo suave. Para determinar el número de células se colocó una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  en un contador automático de células, y se realizaron los cálculos para sembrar 55 mil células por  $\text{cm}^2$  de las cajas o placas de cultivo.



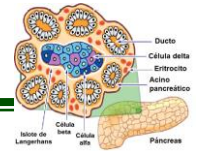
**Tabla 3. Características de las líneas celulares que se emplearán en este estudio**

LÍNEA CELULAR	PROCEDENCIA	DIAGNÓSTICO	EDAD	MUTACIONES	KRAS DEPENDIENTE
MIA PaCa-2 (Deer <i>et al.</i> , 2010)	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma ductal pancreático	65 años	K-RAS codón 12 TP53 codón 248 CDKN2A HD	Si
hTERT-HPNE (Barsov, 2011)	<i>Homo sapiens</i>	Metaplasia de epitelio ductal pancreático	52 años	Telomerasa P53 CDKN2A PP2A	No

### 8.3. EFECTO DEL COMPUESTO C14I EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS PANCREÁTICAS

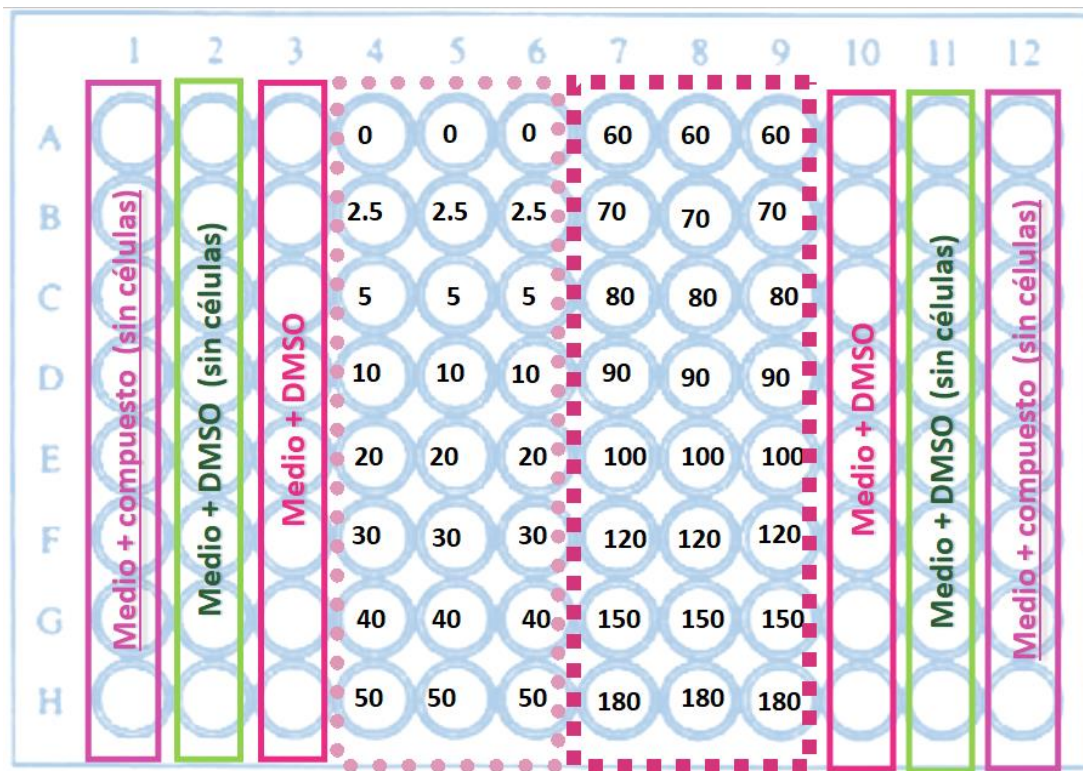
La evaluación de la viabilidad de las líneas celulares MIA PaCa-2 y hTERT-HPNE, tratadas con el compuesto C14I, se evaluó mediante ensayos de viabilidad con la técnica de MTT, que evalúa la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), a un compuesto colorido formazán. Como la reducción del MTT se realiza por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenada, los resultados obtenidos determinan la funcionalidad mitocondrial de las líneas celulares tratadas. Por lo tanto, la cantidad de formazán producido es proporcional a la cantidad de células vivas (Mackenzie *et al.*, 2013).

Las líneas celulares MIA PaCa-2 y hTERT-HPNE, se cultivaron en monocapas se disgregaron con tripsina EDTA, y se sembraron alrededor de 30,000 células por pozo, en cajas de 96 pozos. Se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h para favorecer su adherencia. Se preparó el compuesto en DMSO al 0.2%, y se adicionaron diferentes concentraciones del compuesto, a cada pozo. Posteriormente se incubaron por 24 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> permitiendo la acción del compuesto. Se retiró el medio de cultivo a cada pozo y se cambió por 100 µL de medio que no contiene suero ni rojo fenol. Una vez cambiado el medio de cada pozo, se agregaron 50 µL de MTT en buffer libre de calcio y magnesio; se incubaron por 3 h a 37°C, en este tiempo se redujo

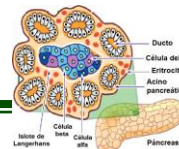


el MTT a cristales de formazán, se cuantificó la cantidad de formazán por absorbancia. Para esto, se adicionó a cada pozo 100  $\mu$ L de isopropanol y se pusieron en movimiento a temperatura ambiente hasta la disolución de los cristales de formazán. La densidad óptica se midió en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 540 nm.

Para determinar el IC<sub>50</sub> se analizó el efecto citotóxico de diferentes concentraciones del compuesto C14I en la línea celular MIA PaCa-2, se graficó el efecto citotóxico en porcentajes equivalentes a la absorbancia obtenida a 540 nm, y después se interpoló la concentración del compuesto C14I que abate al 50% de la población celular. Se realizó lo mismo con la línea celular hTERT-HPNE. En ambas líneas celulares fue evaluado el efecto citotóxico del compuesto C14I a las 24, 48 y 72 horas (Figura 16).



**Figura 19. Diseño experimental para determinar el IC<sub>50</sub> del compuesto C14I.** En una placa de 96 pozos se evaluó el efecto del compuesto C14I sobre la viabilidad en las líneas celulares MIA PaCa-2 y hTERT-HPNE. Distribución de la placa; blanco de la absorbancia: medio más el compuesto, o medio más DMSO (columnas 1,2,11 y 12); Control positivo: nos da el máximo de absorbancia de las células cuando la concentración del compuesto es cero (pozos 4A, 5A y 6A). Control del vehículo: en el cual se prueba el efecto citotóxico que podría tener el vehículo (DMSO) sobre la viabilidad celular (columnas 3 y 10). El efecto que tienen las diferentes concentraciones del compuesto se evaluó por triplicado (columnas 4-9)



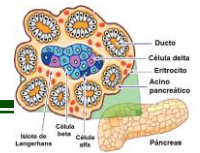
#### 8.4. IMPACTO DEL COMPUESTO C14I EN LA FORMACIÓN DE COLONIAS EN LA LÍNEA CELULAR MIA PaCa-2

El ensayo clonogénico o ensayo de formación de colonias, evalúa la capacidad proliferativa de las células. El objetivo de estos ensayos es evaluar la capacidad de las células para dividirse y formar colonias después de haberse expuesto a un tratamiento (Mackenzie *et al.*, 2013); en este caso se evaluó la capacidad de formar colonias de las células MIA PaCa-2 después de ser tratadas con el compuesto C14I. Para esto las células se cultivaron en placas de doce pocillos, donde se colocaron 300 células por pozo, incubándolas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h para permitir la adhesión celular. Se disolvieron los compuestos en DMSO al 0.2%, y se agregó la cantidad de compuesto correspondiente al IC<sub>50</sub> previamente obtenido. Se incubaron por 10 días con el compuesto, durante este periodo se hizo el cambio de medio con compuesto cada tercer día. Después se cultivaron con medio nuevo sin compuesto para dejar crecer a las células que resistieron el tratamiento, las células se incubaron durante los 10 días restantes a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>; para determinar el número de colonias formadas después del tratamiento, después de este tiempo se quitó el medio y se colocaron 2 mL de cristal violeta al 0.1% en ácido cítrico durante 15 minutos, se decantó el colorante y se observó al microscopio invertido para realizar un recuento de colonias. Para hacer el método cuantitativo se hizo un lisado con dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1% y se midió la absorbancia a 570 nm.

#### 8.5. WESTERN BLOT

Las líneas celulares MIA PaCa-2 y hTERT-HPNE se cultivaron en placas de ocho pocillos, donde se sembraron 50 mil células por pocillo, incubándolas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h para permitir la adhesión celular. Se agregaron las cantidades correspondientes a los IC<sub>50</sub> de los diferentes compuestos y después se incubaron bajo las condiciones de temperatura y CO<sub>2</sub> previamente descritas, se dejó el compuesto por 24 h. Posteriormente se determinó la activación de dos de los principales efectores de K-Ras

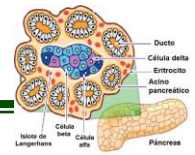




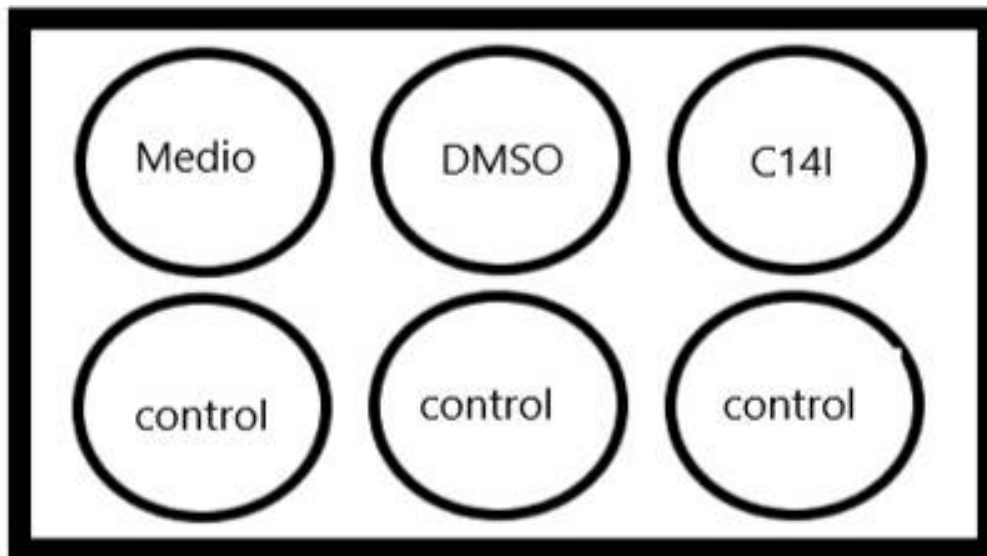
oncogénico, ERK y AKT. Se realizaron extracciones de proteína total y se corrieron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, la separación electroforética de las proteínas se obtuvo a 100-120 V en geles de poliacrilamida al 15%. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas en membranas PVDF tratada con metanol, ddH<sub>2</sub>O y equilibrada con el buffer de transferencia. El gel se colocó sobre la membrana durante 15-30 min a temperatura ambiente con el buffer de transferencia, la transferencia se llevó a cabo por una hora a 400 mA. Una vez que las proteínas se transfirieron a la membrana de PVDF, la membrana fue incubada con la solución bloqueadora (Svel y 5% y Tween 0.2%) durante una hora y en agitación constante a 37°C, el exceso de la solución bloqueadora se eliminó y se incubó con los anticuerpos primarios anti-ERK total y anti-AKT total o con los anticuerpos anti-ERK fosforilado y anti-AKT fosforilado, por una noche a 4°C. La membrana se lavó con buffer de lavado (3 veces), después se incubó durante una hora en agitación constante a 37°C con el anticuerpo secundario anti-ratón, para detectar las proteínas de interés la membrana fue lavada y se reveló por quimioluminiscencia.

## 8.6. MEDICIÓN DE APOPTOSIS/NECROSIS

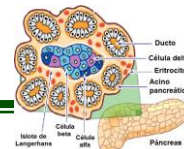
Para evaluar el tipo de muerte celular inducida por el compuesto C14I se usó el kit Apoptosis/Necrosis Detection (ab176749 *abcam*), que discrimina entre apoptosis y necrosis. La apoptosis es un proceso de muerte celular altamente regulado en las células, de esta forma se evita una reacción inflamatoria. La necrosis se describe como la muerte celular no controlada que induce perturbación y descontrol del ambiente que rodea a la célula provocando inflamación (Porth & Porth, 2011). Las líneas celulares MIA PaCa-2 y hTERT-HPNE se cultivaron en placas de seis pozos, se colocaron 50 mil células por pozo y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h para permitir la adhesión celular. Después de la incubación de las células se añadió a cada pozo la concentración correspondiente al IC<sub>50</sub> del compuesto C14I, las células fueron incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Después de este periodo de incubación, las células fueron despegadas con tripsina, se



centrifugaron a 500 g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante, los botones celulares se resuspendieron en 200  $\mu$ L de buffer de trabajo y se realizaron las tinciones con 1  $\mu$ L de indicador de apoptosis verde (200X), 1  $\mu$ L de yoduro de propidio (200X), para la detección de la apoptosis y necrosis; y 0.5  $\mu$ L de citocalceína 450 (200X) para identificar las células vivas. La preparación se incubó durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron 300  $\mu$ l de buffer de trabajo y se analizó por citometría de flujo.



**Figura 20. Esquema general para determinar muerte celular.** Diseño experimental de la placa de 6 pozos en la cual se evaluó el tipo de muerte celular inducida por el compuesto C14I, teniendo como controles células crecidas en medio completo sin ningún compuesto y las células incubadas con el vehículo (DMSO).



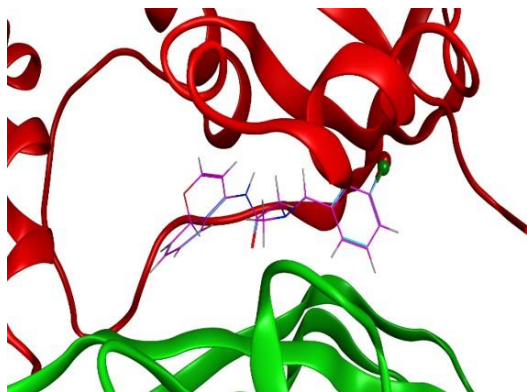
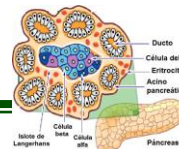
## 9. RESULTADOS

### 9.1 INTERACCIÓN *IN SILICO* DE LOS COMPUESTOS C14 Y C14I CON EL COMPLEJO MOLECULAR K-RAS4B/PDE6 $\delta$

Tomando en cuenta que el objetivo de este trabajo es determinar si el compuesto análogo C14I presenta características similares al compuesto cabeza de serie o compuesto líder C14. Lo primero que se debía evaluar era que ambos compuestos presentaran patrones, y puntajes de interacción similares con la interfaz del complejo K-Ras4B/PDE6 $\delta$ , el cual es el blanco terapéutico. Para esto se realizó un análisis de interacción *in silico*, usando el programa MOE 2014.09. En este programa se decodificó el archivo del complejo molecular cristalizado K-Ras4B/PDE6 $\delta$  (Dharmaiah *et al.*, 2016), y se construyeron las estructuras del compuesto líder C14 y del compuesto análogo C14I.

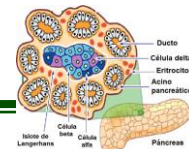
Una vez cargadas estas estructuras, fueron preparadas y minimizadas como se describe en la metodología. Después, se realizaron análisis de *docking* molecular y se seleccionó la mejor pose de interacción para cada compuesto, teniendo como criterios; primero el mejor puntaje del *docking* molecular y segundo que presentara un mayor número de interacciones moleculares simultáneamente con los aminoácidos de las dos proteínas del complejo, de tal forma que funcionen como grapas moleculares entre K-Ras4B y PDE6 $\delta$ . De esta forma, se obtuvo la mejor pose del compuesto C14I, y se comparó con la mejor pose del compuesto cabeza de serie C14. Así se encontró que ambos compuestos tenían patrones de interacción similares y compartían su disposición espacial dentro de la interfaz del complejo K-Ras4B/PDE6 $\delta$ .

Tal como se muestra en el modelo 3D en la figura 21, las mejores poses de los compuestos C14 y C14I son prácticamente iguales, pues se traslapan casi por completo; sin embargo, es notable que la principal diferencia entre la pose del compuesto C14 y la pose del compuesto C14I, es la posición del cloro (esfera verde) o del yodo (esfera roja) respectivamente.



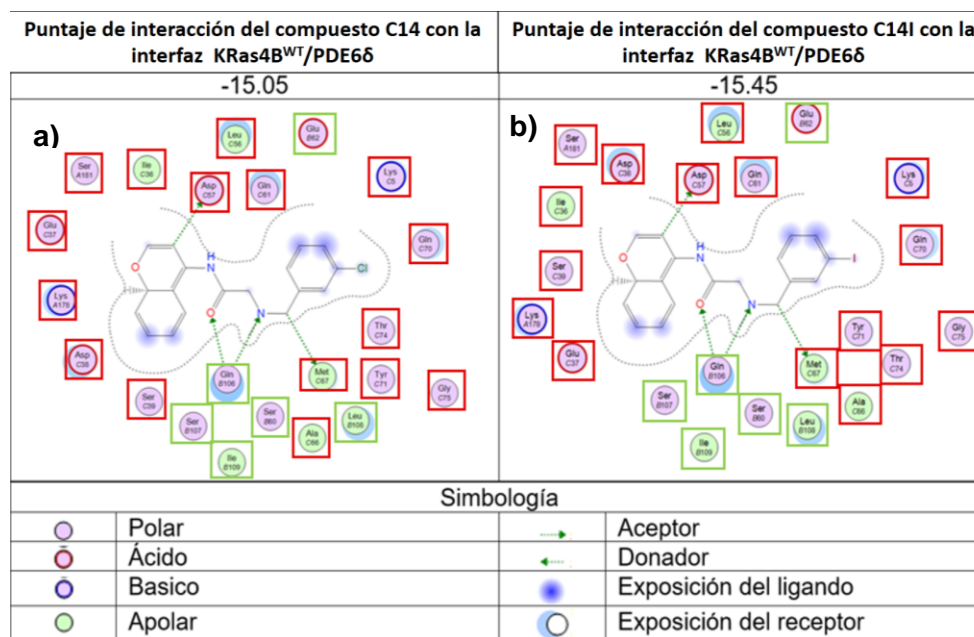
**Figura 21. Modelo *in silico* de la interacción del complejo K-Ras4B<sup>WT</sup>/PDE6δ con los compuestos C14 y C14I.** Modelo 3D del acoplamiento molecular *in silico* sobre la interfaz de interacción del complejo molecular K-Ras4B/PDE6δ (cristal publicado por Dharmiah *et al.*, 2016), la proteína K-Ras4B se representa en rojo y la proteína PDE6δ en verde. El compuesto C14 (estructura en azul), se posiciona en la interfaz, en cercanía a las dos proteínas del complejo. Se realizó el mismo acoplamiento con el compuesto C14I (estructura en rosa) y se observó un traslape casi perfecto del compuesto C14 y C14I. La diferencia más notable es la disposición espacial de los halógenos (cloro en verde y yodo en rojo).

La pequeña diferencia en la disposición espacial de los átomos de ambos compuestos, es decir la diferencia en la pose de los compuestos C14 y C14I sobre su ligando, puede explicarse por la sustitución del halógeno, pues a pesar de que el cloro y el yodo pertenecen a la misma familia, presentan diferencias en la electronegatividad (2.5 yodo y 3.0 cloro) y el tamaño del radio atómico (0.97 Å cloro y 1.32 Å yodo). De esta forma, como la nube electrónica del yodo es mayor que la del cloro y la distancia de enlace con el carbono también es mayor, el efecto estérico del compuesto C14I aumenta, pudiendo provocar un reacomodo en la disposición espacial de todos los átomos de su estructura. En la figura 22 se muestra un análisis más detallado del *docking* molecular, que es representado como un mapa de interacción 2D de los compuestos C14 o C14I con los aminoácidos de la interfaz del complejo K-Ras4B/PDE6δ. Al comparar el mapa de interacción del compuesto C14, con el mapa del compuesto C14I, se encontró que ambos compuestos interaccionan esencialmente con los mismos aminoácidos, sin embargo, se observan algunas diferencias en la distribución de ellos. No obstante, cuando se analizan las interacciones de los aminoácidos en función de los grupos funcionales, no se observan cambios importantes, tal se muestra en la Tabla 4. Así mismo, las interacciones detectadas bajo los parámetros de referencia



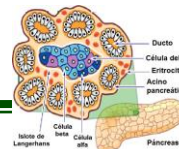
(interacciones marcadas con líneas punteadas) son iguales para el compuesto C14 y el compuesto C14I. Es decir, ambos compuestos presentan una interacción con Asp57 y Met67 de la proteína K-Ras4B y una doble interacción con Gln106 de PDE6 $\delta$ .

A pesar de la gran similitud en los patrones de interacción de los compuestos C14 y C14I en los modelos 2D y 3D, los puntajes de interacción obtenidos en el *docking* molecular muestran una ligera mejoría de 0.4 kcal/mol, en el puntaje de interacción del compuesto C14I con la interfaz del complejo K-Ras4B/PDE6 $\delta$ , en comparación al puntaje obtenido con el compuesto líder C14.



**Figura 22. Mapas de interacción del complejo K-Ras4B<sup>WT</sup>/PDE6 $\delta$  con los compuestos C14 y C14I.** a). Representación 2D de las interacciones del compuesto C14 con aminoácidos de las proteínas K-Ras4B<sup>WT</sup> (recuadros en rojo) y PDE6 $\delta$  (recuadros en verde). b). Representación 2D del mapa de interacción del compuesto C14I con aminoácidos de las proteínas K-Ras4B<sup>WT</sup> (recuadros en rojo) y PDE6 $\delta$  (recuadros en verde).

Estos resultados sugieren que el yodo (I), por su mayor radio atómico, induce un mejor acomodo del compuesto C14I en la interfaz K-Ras4B/PDE6 $\delta$  y, por ende, una mejoría en los puntajes de interacción; lo que podría tener un impacto positivo en la actividad citotóxica. Sin embargo, es importante recordar que la interfaz con la que se obtuvieron estos resultados corresponde a una



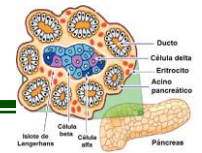
proteína K-Ras4B wild type (K-Ras4B<sup>WT</sup>), es decir, que no presenta el cambio de aminoácido correspondiente a las mutaciones relacionadas con la señalización oncogénica de K-Ras.

**Tabla 4. Aminoácidos de K-Ras4B<sup>WT</sup> y PDE6δ en interacción con C14 y C14I**

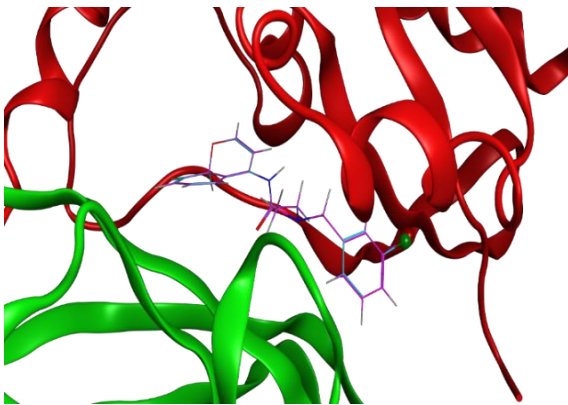
AMINOÁCIDO	PROPIEDAD	POSICIÓN	PROTEÍNA	GRUPO FUNCIONAL C14	GRUPO FUNCIONAL C14I
Lys	Básico	5	K-Ras4B	* Clorofenilo	* Yodofenilo
Ile	Apolar	36	K-Ras4B	* Benzopireno	* Benzopireno
Glu	Ácido	37	K-Ras4B	* Benzopireno	* Benzopireno
Asp	Ácido	38	K-Ras4B	* Benzopireno	* Benzopireno
Ser	Polar	39	K-Ras4B	* Benzopireno	* Benzopireno
Leu	Apolar	56	K-Ras4B	* Acetamida	* Acetamida
<b>Asp</b>	<b>Ácido</b>	<b>57</b>	<b>K-Ras4B</b>	<b>Benzopireno</b>	<b>Benzopireno</b>
Gln	Polar	61	K-Ras4B	* Acetamida	* Acetamida
Ala	Apolar	66	K-Ras4B	* Carbono secundario	* Yodofenilo
<b>Met</b>	<b>Apolar</b>	<b>67</b>	<b>K-Ras4B</b>	<b>Carbono secundario</b>	<b>Carbono secundario</b>
Gln	Polar	70	K-Ras4B	* Clorofenilo	* Yodofenilo
Tyr	Polar	71	K-Ras4B	* Clorofenilo	* Yodofenilo
Thr	Polar	74	K-Ras4B	* Clorofenilo	* Yodofenilo
Gly	Polar	75	K-Ras4B	* Clorofenilo	* Yodofenilo
Lys	Básico	178	K-Ras4B	* Benzopireno	* Benzopireno
Ser	Polar	181	K-Ras4B	* Benzopireno	* Benzopireno
Ser	Polar	60	PDE6δ	* Amina secundaria	* Amina secundaria
Glu	Ácido	62	PDE6δ	* Clorofenilo	* Yodofenilo
<b>Gln</b>	<b>Polar</b>	<b>106</b>	<b>PDE6δ</b>	<b>Amina secundaria y acetamida</b>	<b>Amina secundaria y acetamida</b>
Ser	Polar	107	PDE6δ	* Amina secundaria y acetamida	* Acetamida
Leu	Apolar	108	PDE6δ	* Carbono secundario	* Carbono secundario
Ile	Apolar	109	PDE6δ	* Amina secundaria y acetamida	* Amina secundaria y acetamida

(\* Este símbolo indica proximidad entre los aminoácidos y los grupos funcionales del compuesto, en el mapa 2D, esto sugiere posible interacción, no detectada por los parámetros de referencia). Las interacciones importantes que son detectadas por los parámetros de referencia se marcan con **negritas**.

Para corroborar que se tuviesen los mismos resultados cuando la proteína K-Ras4B presentara una mutación, se realizó el mismo análisis de *docking* molecular sobre la interfaz modificada del complejo molecular K-Ras4B/PDE6δ. En donde, de forma *in silico* se produjeron dos de las mutaciones más comunes en la proteína K-Ras4B, las mutaciones G12C y

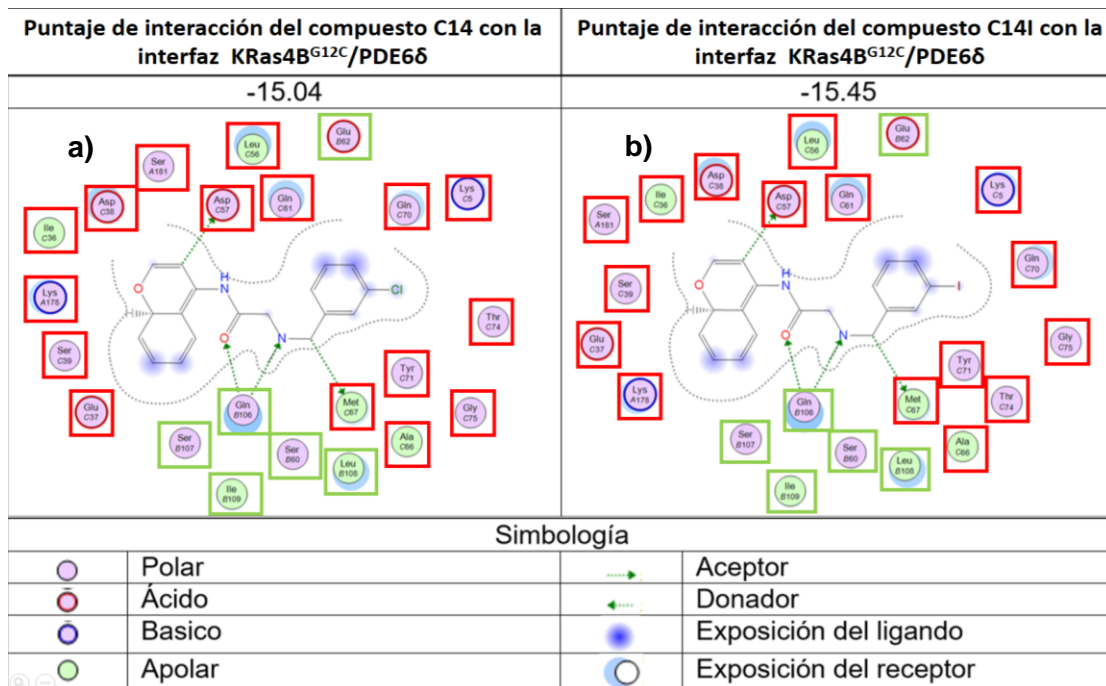


G12D, de esta forma se generaron las interfaces K-Ras4B<sup>G12C</sup>/PDE6 $\delta$  y K-Ras4B<sup>G12D</sup>/PDE6 $\delta$  respectivamente.



**Figura 23. Interacción *in silico* de los compuestos C14 y C14I con la interfaz del complejo K-Ras4B<sup>G12C</sup>/PDE6 $\delta$**  Acoplamiento molecular de los compuestos C14 (en azul) y C14I (en rosa) con la interfaz entre la proteína K-Ras4B con la mutación G12C (proteína en rojo) y la proteína PDE6 $\delta$  (proteína en verde). Se observó un traslape de las poses de los dos compuestos, ambas estructuras en la interfaz del complejo molecular. Las mínimas diferencias se observan principalmente en los átomos de los halógenos presentes en los compuestos C14 y C14I, cloros en verde y yodo en rojo, respectivamente.

Se realizaron los mismos análisis de acoplamiento molecular para cada una de las mutantes (Figuras 23 y 25) y encontramos que se presentan patrones de interacción y puntajes muy similares a los obtenidos con el complejo que contiene K-Ras4B WT (interfaz K-Ras4B<sup>WT</sup>/PDE6 $\delta$ ) para ambos compuestos el C14 y el C14I.



**Figura 24. Mapas de interacción del complejo K-Ras4B<sup>G12C</sup>/PDE6 $\delta$  con los compuestos C14 y C14I.** **a).** Representación 2D de las interacciones del compuesto C14 con aminoácidos de las proteínas K-Ras4B<sup>G12C</sup> (recuadros en rojo) y PDE6 $\delta$  (recuadros en verde). **b).** Representación 2D del mapa de interacción del compuesto C14I con aminoácidos de las proteínas K-Ras4B<sup>G12C</sup> (recuadros en rojo) y PDE6 $\delta$  (recuadros en verde). Presentan las mismas interacciones, sin embargo, se observan diferencias en las posiciones de los aminoácidos.

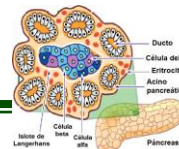


Tabla 5. Aminoácidos de K-Ras4B<sup>G12C</sup> y PDE6δ en interacción con C14 y C14I

AMINOÁCIDO	PROPIEDAD	POSICIÓN	PROTEÍNA	GRUPO FUNCIONAL C14	GRUPO FUNCIONAL C14I
Lys	Básico	5	K-Ras4B	* Clorofenilo	* Yodofenilo
Ile	Apolar	36	K-Ras4B	* Benzopireno	* Benzopireno
Glu	Ácido	37	K-Ras4B	* Benzopireno	* Benzopireno
Asp	Ácido	38	K-Ras4B	* Benzopireno	* Benzopireno
Ser	Polar	39	K-Ras4B	* Benzopireno	* Benzopireno
Leu	Apolar	56	K-Ras4B	* Acetamida	* Acetamida
<b>Asp</b>	<b>Ácido</b>	<b>57</b>	<b>K-Ras4B</b>	<b>Benzopireno</b>	<b>Benzopireno</b>
Gln	Polar	61	K-Ras4B	* Acetamida	* Acetamida
Ala	Apolar	66	K-Ras4B	* Clorofenilo	* Carbono secundario
<b>Met</b>	<b>Apolar</b>	<b>67</b>	<b>K-Ras4B</b>	<b>Carbono secundario</b>	<b>Carbono secundario</b>
Gln	Polar	70	K-Ras4B	* Clorofenilo	* Yodofenilo
Tyr	Polar	71	K-Ras4B	* Clorofenilo	* Yodofenilo
Thr	Polar	74	K-Ras4B	* Clorofenilo	* Yodofenilo
Gly	Polar	75	K-Ras4B	* Clorofenilo	* Yodofenilo
Lys	Básico	178	K-Ras4B	* Benzopireno	* Benzopireno
Ser	Polar	181	K-Ras4B	* Benzopireno	* Benzopireno
Ser	Polar	60	PDE6δ	* Amina secundaria	* Amina secundaria
Glu	Ácido	62	PDE6δ	* Clorofenilo	* Yodofenilo
<b>Gln</b>	<b>Polar</b>	<b>106</b>	<b>PDE6δ</b>	<b>Amina secundaria y acetamida</b>	<b>Amina secundaria y acetamida</b>
Ser	Polar	107	PDE6δ	* Acetamida	* Acetamida
Leu	Apolar	108	PDE6δ	* Carbono secundario	* Carbono secundario
Ile	Apolar	109	PDE6δ	* Amina secundaria y acetamida	* Amina secundaria y acetamida

(\* Este símbolo indica proximidad entre los aminoácidos y grupos funcionales del compuesto en el mapa 2D, esto sugiere una posible interacción, no detectada por los parámetros de referencia). Las interacciones importantes detectadas por los parámetros de referencia se marcan con **negritas**.

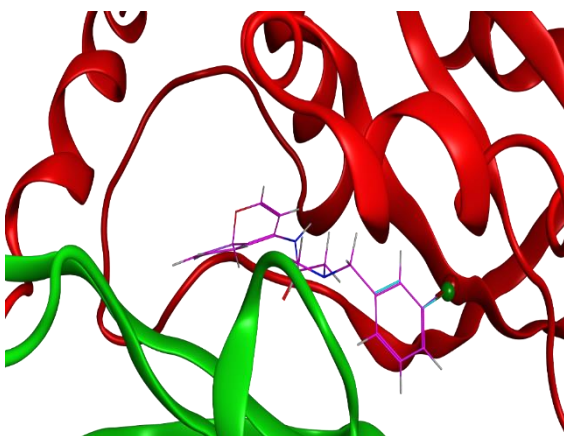
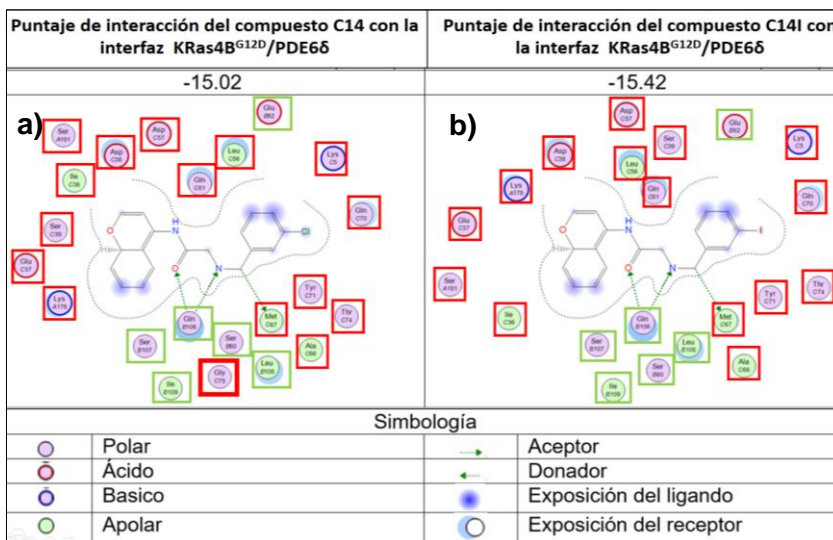
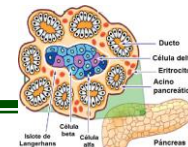


Figura 25. Modelo *in silico* de la interacción del complejo K-Ras4B<sup>G12D</sup>/PDE6δ con los compuestos C14 y C14I. Acoplamiento molecular *in silico* de los compuestos C14 y C14I sobre la interfaz del complejo molecular K-Ras4B<sup>G12D</sup>/PDE6δ (Dharmaiah et al., 2016). La proteína K-Ras4B mutada en G12C se representa en rojo y la proteína PDE6δ en verde. Las mejores poses de los compuestos C14 (azul) y C14I (rosa) presentan un traslape casi idéntico. Se observan diferencias en los átomos de los halógenos, cloro (en verde) y yodo (en rojo) que corresponden al compuesto C14 y C14I, respectivamente.



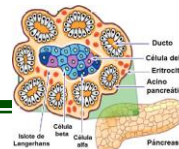


**Figura 26. Mapas de interacción del complejo K-Ras4B<sup>G12D</sup>/PDE6δ con los compuestos C14 y C14I.**  
**a).** Representación 2D de las interacciones del compuesto C14 con aminoácidos de las proteínas K-Ras4B<sup>G12D</sup> (recuadros en rojo) y PDE6δ (recuadros en verde). Se observa una interacción adicional del compuesto C14 con la Gly 71 de K-Ras4B<sup>G12D</sup> (resaltado en recuadro rojo). **b).** Representación 2D del mapa de interacción del compuesto C14I con aminoácidos de las proteínas K-Ras4B<sup>G12D</sup> (recuadros en rojo) y PDE6δ (recuadros en verde).

Para determinar que el compuesto C14I aumenta su puntaje de interacción con las interfaces mutadas, de forma similar a su mejoría en la interacción con la interfaz no mutadas o WT, se compararon los puntajes de interacción obtenidos del *docking* de los compuestos C14 y C14I, con cada uno de los diferentes complejos de K-Ras4B/PDE6δ; donde K-Ras4B es normal (K-Ras4B<sup>WT</sup>/PDE6δ) o presenta la mutación G12C (K-Ras4B<sup>G12C</sup>/PDE6δ) o G12D (K-Ras4B<sup>G12D</sup>/PDE6δ). Después de comparar estos resultados, se hizo evidente que, en todos los casos, las interacciones del compuesto C14I fueron ligeramente mejores, que los puntajes de interacción obtenidos con el compuesto C14.

La mejoría del puntaje de interacción del compuesto C14I fue de 0.4 kcal/mol, en comparación al compuesto C14. Con este resultado se apoyaba la idea de que el compuesto C14I podría tener mejoría en su actividad citotóxica.

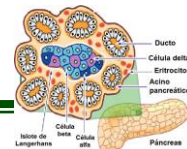
Por otro lado, para ver si el compuesto C14I tenía un mejor puntaje de interacción con la proteína mutada K-Ras4B<sup>G12C</sup> o K-Ras4B<sup>G12D</sup>, que cuando la proteína es normal K-Ras4B<sup>WT</sup>; se compararon los resultados y puntajes de interacción del *docking* molecular. La comparación se hizo de los puntajes



obtenidos de la interacción del compuesto C14I con cada una de las interfaces (interfaz K-Ras4B<sup>WT</sup>/PDE6 $\delta$ , interfaz K-Ras4B<sup>G12C</sup>/PDE6 $\delta$ , interfaz K-Ras4B<sup>G12D</sup>/PDE6 $\delta$ ). Los resultados fueron contrarios a lo que esperábamos, el compuesto C14I presentó una mejor interacción con la interfaz K-Ras4B<sup>WT</sup>/PDE6 $\delta$ , que con la interfaz K-Ras4B<sup>G12C</sup>/PDE6 $\delta$ . Sin embargo, la mejoría fue de 0.03 kcal/mol, por lo cual es poco probable que esta leve diferencia de interacción tenga un impacto notable en la actividad biológica del compuesto. Una evidencia de esto es, el comportamiento del compuesto C14 que al igual que el compuesto C14I, presentó un mejor puntaje de interacción con la interfaz K-Ras4B<sup>WT</sup>/PDE6 $\delta$  que con la interfaz K-Ras4B<sup>G12C</sup>/PDE6 $\delta$ , sin embargo, los resultados de citotoxicidad *in vitro* sobre la línea celular MIA PaCa-2 que presenta la mutación G12C en K-RAS son mejores que en la línea celular hTERT-HPNE sin mutación en K-RAS (WT). Esto puede explicarse porque la estimación de los puntajes de interacción calculados *in silico*, no simulan todas las condiciones del microambiente celular en donde se da la interacción (Lampidis *et al.*, 2006), o porque los sistemas sobre los cuales está actuando el compuesto responden de manera diferente a la inhibición de señalización de K-Ras, como en el caso de las células K-Ras dependientes, que son más sensibles a esta inhibición (Singh *et al.*, 2009).

**Tabla 6. Aminoácidos de K-Ras4B<sup>G12D</sup> y PDE6 $\delta$  en interacción con C14 y C14I**

AMINOÁCIDO	PROPIEDAD	POSICIÓN	PROTEÍNA	GRUPO FUNCIONAL C14	GRUPO FUNCIONAL C14I
Lys	Básico	5	K-Ras4B	*Clorofenilo	* Yodofenilo
Ile	Apolar	36	K-Ras4B	* Benzopireno	* Benzopireno
Glu	Ácido	37	K-Ras4B	* Benzopireno	* Benzopireno
Asp	Ácido	38	K-Ras4B	* Benzopireno	* Benzopireno
Ser	Polar	39	K-Ras4B	* Benzopireno	* Acetamida
Leu	Apolar	56	K-Ras4B	*Clorofenilo	* Acetamida
<b>Asp</b>	<b>Ácido</b>	<b>57</b>	<b>K-Ras4B</b>	<b>Benzopireno</b>	<b>Acetamida</b>
Gln	Polar	61	K-Ras4B	* Acetamida	* Acetamida
Ala	Apolar	66	K-Ras4B	* Clorofenilo	*Carbono secundario
<b>Met</b>	<b>Apolar</b>	<b>67</b>	<b>K-Ras4B</b>	<b>Carbono secundario</b>	<b>Carbono secundario</b>
Gln	Polar	70	K-Ras4B	* Clorofenilo	* Yodofenilo
Tyr	Polar	71	K-Ras4B	* Clorofenilo	* Yodofenilo
Thr	Polar	74	K-Ras4B	* Clorofenilo	* Yodofenilo
Gly	Polar	75	K-Ras4B	* Amina secundaria	-----



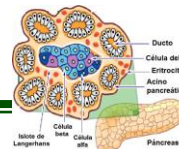
Lys	Básico	178	K-Ras4B	* Benzopireno	* Benzopireno
Ser	Polar	181	K-Ras4B	* Benzopireno	* Benzopireno
Ser	Polar	60	PDE6δ	* Amina secundaria	* Amina secundaria
Glu	Ácido	62	PDE6δ	* Clorofenilo	*Yodofenilo
<b>Gln</b>	<b>Polar</b>	<b>106</b>	<b>PDE6δ</b>	<b>Amina secundaria y acetamida</b>	<b>Amina secundaria y acetamida</b>
Ser	Polar	107	PDE6δ	* Acetamida	* Benzopireno
Leu	Apolar	108	PDE6δ	* Carbono secundario	* Carbono secundario
Ile	Apolar	109	PDE6δ	* Amina secundaria y acetamida	* Amina secundaria y acetamida

(\* Este símbolo indica proximidad entre los aminoácidos y grupos funcionales del compuesto, en el mapa 2D, esto sugiere una posible interacción, no detectada por los parámetros de referencia). Las interacciones importantes detectadas por los parámetros de referencia se marcan con **negritas**.

## 9.2 DETERMINACIÓN DEL IC<sub>50</sub> DE LOS COMPUESTOS C14 y C14I

Una vez que se demostró por los ensayos *in silico*, que el compuesto C14I tenía puntajes de interacción mejores que el compuesto cabeza de serie C14, se quiso probar si esta mejoría de la interacción del compuesto C14I con su blanco molecular, tenía un impacto positivo en su actividad citotóxica. Para demostrarlo se realizaron ensayos de viabilidad con MTT. Se diseñó un experimento para determinar la curva de dosis respuesta, empleando concentraciones desde 0  $\mu$ M hasta 200  $\mu$ M. Las curvas de dosis respuesta se evaluaron a las 24, 48 y 72 horas de incubación con el tratamiento. De esta forma los datos fueron graficados y analizados, para determinar la mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC<sub>50</sub>).

Se obtuvieron los IC<sub>50</sub> a las 24, 48 y 72 h en dos líneas celulares, una línea celular de páncreas no tumorigénica con K-RAS<sup>WT</sup> la línea celular hTERT-HPNE y otra línea celular de cáncer de páncreas K-Ras dependiente que presenta la mutación K-RAS<sup>G12C</sup>; la línea celular MIA PaCa-2. En la Tabla 7 se presentan los valores de los IC<sub>50</sub> obtenidos a las 24, 48 y 72h de incubación con el compuesto C14I y se comparan con los datos obtenidos con el compuesto cabeza de serie C14. La tabla rosa contiene los IC<sub>50</sub> obtenidos con las células K-Ras dependientes (MIA PaCa-2). De forma general se observa que los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos con el compuesto C14I son concentraciones casi a la mitad de las requeridas por el compuesto líder C14. Este fenómeno

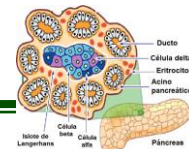


es más evidente al comparar los valores de  $IC_{50}$  a las 24h de tratamiento en las células MIA PaCa-2; en donde vemos que, el valor del  $IC_{50}$  obtenido con el compuesto C14I es 92  $\mu\text{M}$ , mientras que el  $IC_{50}$  del compuesto C14 es casi el doble 165  $\mu\text{M}$ . Por otro lado, cuando se analizan los valores de  $IC_{50}$  obtenidos con el compuesto C14I en la línea celular de páncreas no tumorigénica (hTERT-HPNE). Se observa que también disminuyen. Sin embargo, las concentraciones del compuesto C14I que inhiben al cincuenta por ciento de las células tumorigénicas es menor que la concentración requerida para dañar a las células no tumorigénicas. Sugiriendo una mayor tolerancia del efecto citotóxico de este compuesto en las células no cancerígenas. En el análisis de las curvas dosis respuesta se hizo evidente la disminución del  $IC_{50}$  del compuesto C14I en la línea celular MIA PaCa-2, con respecto al tiempo. Esto implica que la cantidad del compuesto C14I requerida para afectar la viabilidad de estas células, es menor cuando aumenta el periodo de exposición al compuesto. De forma opuesta, al comparar la disminución de los valores de  $IC_{50}$  en la línea hTERT-HPNE con respecto al tiempo, se ve que la disminución de la viabilidad fue más gradual, sugiriendo una mayor tolerancia al compuesto C14I.

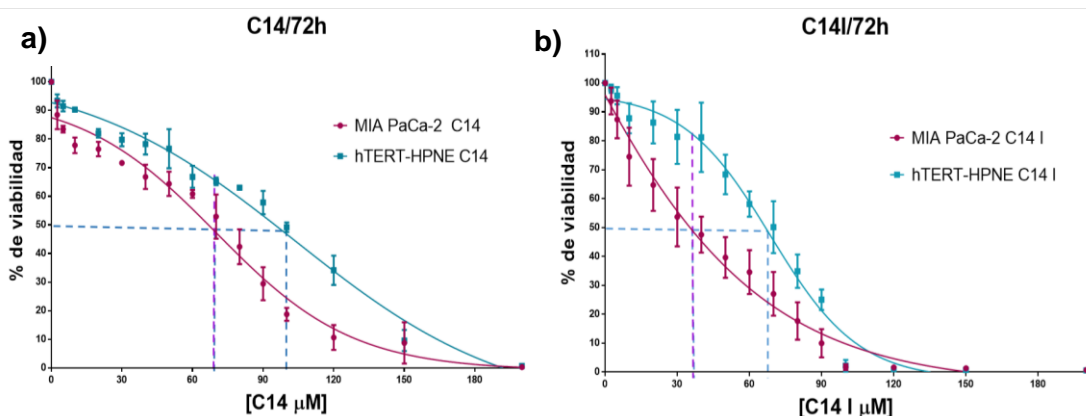
**Tabla 7.  $IC_{50}$  calculados para la línea celular MIA PaCa-2 y hTERT-HPNE**

$IC_{50}$ / MIA PaCa-2 (KRAS <sup>G12C</sup> )			$IC_{50}$ / hTERT-HPNE (KRAS <sup>WT</sup> )		
Compuesto	C14	C14I	Compuesto	C14	C14I
24 h	165 $\mu\text{M}$	92 $\mu\text{M}$	24 h	176 $\mu\text{M}$	106 $\mu\text{M}$
48 h	112 $\mu\text{M}$	80 $\mu\text{M}$	48 h	122 $\mu\text{M}$	79 $\mu\text{M}$
72 h	71 $\mu\text{M}$	47 $\mu\text{M}$	72 h	94 $\mu\text{M}$	71 $\mu\text{M}$

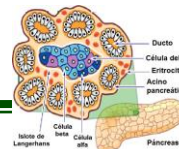
En la Figura 27, se observan las curvas de dosis respuesta, de las líneas MIA PaCa-2 y hTERT-HPNE obtenidas a las 72 h. En la gráfica de la Figura 27a) se muestra el efecto citotóxico del compuesto C14, en rosa se muestra la disminución del porcentaje de viabilidad de las células MIA PaCa-2, a concentraciones crecientes del compuesto que van de 0  $\mu\text{M}$  hasta 200  $\mu\text{M}$ , en azul se muestra el porcentaje de viabilidad de las células hTERT-HPNE. En esta gráfica es evidente que el compuesto C14 tiene un efecto citotóxico mayor



en la línea celular de cáncer de páncreas K-Ras dependiente (MIA PaCa-2), sin embargo, el efecto que tiene sobre la línea celular no tumorigénicas hTERT-HPNE sigue la misma pendiente, describiendo líneas muy cercanas y casi paralelas, sugiriendo que el efecto citotóxico tiene la misma tendencia en ambas líneas celulares. En la gráfica de la Figura 27b) se muestra el efecto de dosis respuesta obtenido con el compuesto C14I durante 72 h, en rosa se observa que el compuesto C14I reduce la viabilidad de las células de cáncer de páncreas K-Ras dependiente, en azul se observa el daño citotóxico del mismo compuesto en la línea celular de páncreas no tumorigénicas, hTERT-HPNE. En esta gráfica es evidente que el compuesto C14I reduce la viabilidad de las células tumorigénicas desde las concentraciones más bajas, mientras que la línea celular no tumorigénicas, es afectada de forma significativa hasta concentraciones mayores a 50  $\mu\text{M}$ . Estos resultados sugieren que el efecto citotóxico del compuesto C14I es selectivo para la línea celular de cáncer de páncreas K-Ras dependiente, y tiene un reducido efecto citotóxico sobre las células no tumorigénicas. Con lo anterior se puede decir que la selectividad aumentó al cambiar cloro por yodo.

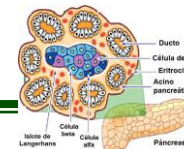


**Figura 27. Curvas de dosis respuesta de las líneas celulares MIA PaCa-2 y hTERT-HPNE con los compuestos C14 y C14I a las 72 h.** Se determinó el efecto del compuesto C14 y C14I en la viabilidad de células MIA PaCa-2 y hTERT-HPNE durante 72 h. Gráfico **a)** muestra el porcentaje de viabilidad de las células MIA PaCa-2 (en rosa) y hTERT-HPNE (en azul) después de estar expuestas por 72 h a diferentes concentraciones de del compuesto C14, y la gráfica **b)** muestra el porcentaje de viabilidad de las células MIA PaCa-2 y hTERT-HPNE después de estar expuestas por 72 h a diferentes concentraciones del compuesto C14I. Las líneas punteadas en rosa muestran el IC<sub>50</sub> que se tiene para la línea celular tumorigénica MIA PaCa-2 y se interpola con la línea hTERT-HPNE. Las líneas punteadas en azul muestra el IC<sub>50</sub> obtenido en la línea celular hTERT-HPNE. En la figura b se observa que el IC<sub>50</sub> de MIA PaCa-2 afecta apenas un 20% de la línea celular no tumorigénica.

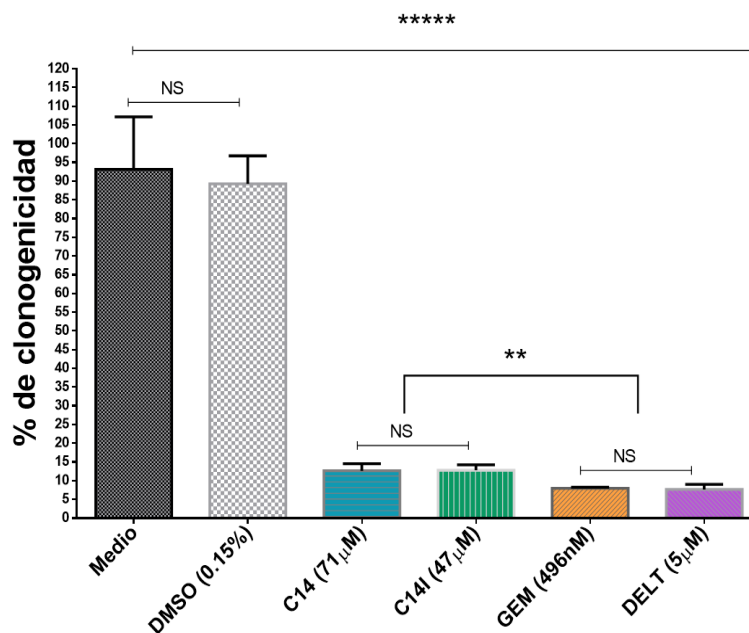


### 9.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DEL COMPUESTO C14I

Una vez confirmado que el compuesto C14I tiene actividad citotóxica mejorada sobre la línea de células tumorogénica K-Ras dependientes MIA PaCa-2, era necesario determinar si este compuesto tenía un efecto antiproliferativo en estas células, donde su proliferación está aumentada como consecuencia de la señalización oncogénica de K-Ras. Para determinar esto se realizaron ensayos clonogénicos, en donde fueron sembradas 300 células por pozo. Las 300 células fueron cultivadas con el compuesto C14I por 10 días; del mismo modo se probó el efecto del compuesto C14, ya que es el compuesto líder; y del compuesto deltarasin, que está dirigido a reducir el anclaje de K-Ras4B a la membrana plasmática, al igual que el compuesto C14I; el compuesto gemcitabine también fue probado, ya que es la terapia de elección contra cáncer de páncreas (Koizumi *et al.*, 2005). En la Figura 28 se puede comparar la capacidad clonogénica de las células MIA PaCa-2 después de ser tratadas con alguno de los compuestos. Primero se determinó la capacidad clonogénica máxima, que se obtuvo de las células que fueron cultivadas sin tratamiento, este valor sirvió de referencia para determinar cómo se encontraban afectados los procesos de proliferación con cada uno de los compuestos. Los resultados indican que el tratamiento con el compuesto C14I reduce en un 85% la capacidad clonogénica máxima de las células MIA PaCa-2, de forma similar al efecto obtenido con el compuesto líder C14, sin embargo, aunque ambos compuestos reducen la capacidad clonogénica en un 85%, es importante aclarar que la concentración del compuesto C14I para obtener este resultado fue la concentración de su IC<sub>50</sub> (47  $\mu$ M) casi la mitad de la concentración usada con el compuesto C14 (71  $\mu$ M). Tomando en cuenta que el compuesto C14I tiene especificidad citotóxica por las células tumorogénicas K-Ras dependientes, y causa menor daño en las células no tumorogénicas, no se vuelve relevante que deltarasin y gemcitabine afecten la capacidad clonogénica de las células MIA PaCa-2 un 5% más que los compuestos C14 y C14I, pues por el contrario, deltarasin y gemcitabine son compuestos que no



son específicos y han sido reportados por tener una alta toxicidad (Samulits *et al.*, 2015; Koizumi *et al.*, 2005). Por lo anterior nosotros sugerimos que los compuestos C14 y C14I pueden ser considerados como una mejor alternativa con potencial terapéutico contra el cáncer pancreático.

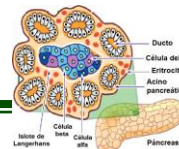


**Figura 28. El efecto anti proliferativo del compuesto C14I en la línea celular MIA PaCa-2, es similar al obtenido con gemcitabine.** La gráfica muestra el porcentaje de clonogenicidad, para determinar si los compuestos probados tienen actividad antiproliferativa. Se observa que el compuesto C14 y C14I tienen un efecto anti proliferativo similar (de un 80%), sin embargo, el mismo efecto se obtiene con una menor concentración del compuesto C14I. Los compuestos deltarasin y gemcitabine reducen un 5% más la capacidad antiproliferativa en esta línea celular, sin embargo, son altamente tóxicos. Como controles se tiene la capacidad clonogénica total obtenida de las células que fueron cultivadas únicamente con medio y se observa que el vehículo (DMSO) no afecta de forma significativa la capacidad proliferativa.

#### 9.4 DETERMINACIÓN DE MUERTE POR APOPTOSIS INDUCIDA POR EL COMPUESTO C14I

Una de las pruebas preclínicas para determinar que un compuesto puede ser usado para el tratamiento de cáncer es determinar que induzca muerte por apoptosis (Su, Yang, Xu, Chen & Yu, 2015; Ricci & Zong, 2006). Para determinar esto; se realizaron ensayos de citometría de flujo como fue descrito en la sección de materiales y métodos.

Las células fueron previamente incubadas por 24 horas con la concentración correspondiente al IC<sub>50</sub> del compuesto C14I, después del tratamiento las

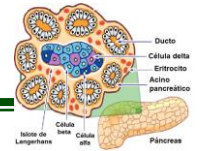


células fueron fijadas y marcadas con apoxina V y yoduro de propidio. De esta forma el marcaje con apoxina V determinó las células que exponen fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, y el marcaje de las células con yoduro de propidio, indica la que las células perdieron la permeabilidad de su membrana plasmática. Los resultados de la tinción fueron interpretados como: apoptosis temprana, cuando las células se tiñen con apoxina V (cuadrante inferior derecho); apoptosis tardía, cuando las células presentan un doble marcaje es decir son positivos para apoxina V y yoduro de propidio (cuadrante superior derecho); o necrosis cuando las células que solo se tiñen con yoduro de propidio ya que perdieron la permeabilidad celular (cuadrante superior izquierdo) (Wlodkowic , Skommer & Darzynkiewicz, 2013).

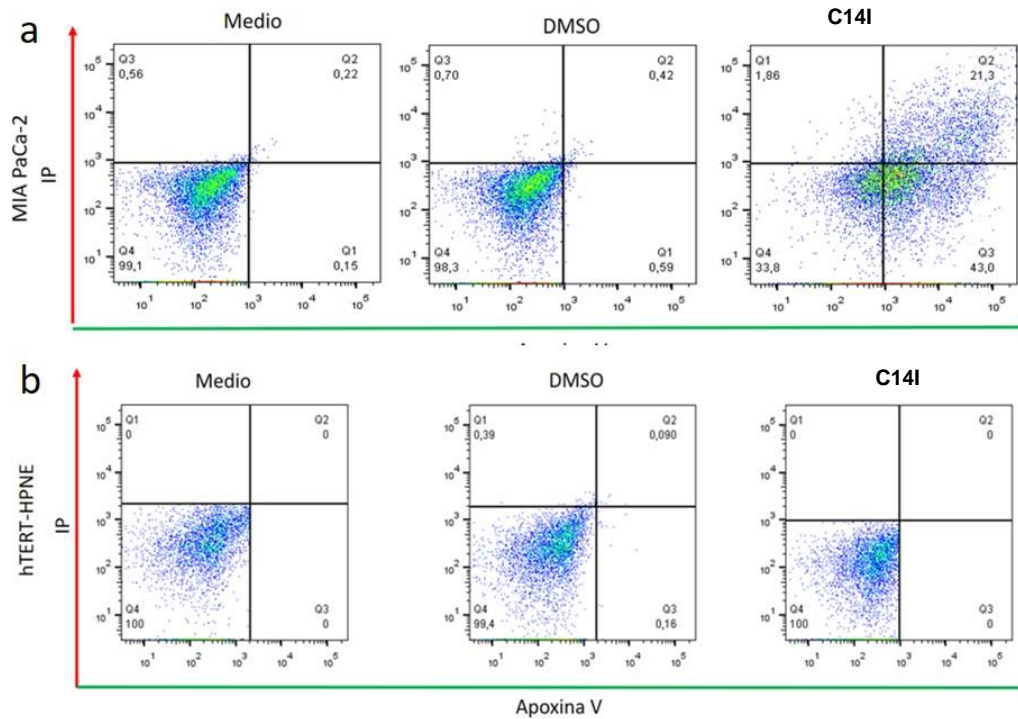
Se analizaron los resultados obtenidos por citometría de flujo, y se determinó la inducción de muerte por apoptosis en las células MIA PaCa-2 y hTERT-HPNE, bajo diferentes condiciones: tratadas con el compuesto C14I, tratadas con el vehículo (DMSO) y cultivadas sólo con medio. La Figura 29 a) muestra la inducción de apoptosis por el compuesto C14I sobre las células de cáncer de páncreas MIA PaCa-2, se observa que el 65% de la población de células de cáncer de páncreas MIA PaCa-2 presentan una muerte por apoptosis. Cuando se hace la subclasificación en apoptosis temprana o tardía, encontramos que un 43% se encuentran en apoptosis temprana, y el 22% restante se encuentra en apoptosis tardía.

Por otro lado, la Figura 29 b) muestra los resultados obtenidos con la línea celular no tumorigénica hTERT-HPNE cuando es tratada con el compuesto C14I por 24 h. Se observa que el compuesto C14I no induce muerte celular por apoptosis en estas células a las 24 h post tratamiento. Esto puede explicarse tomando en cuenta que el  $IC_{50}$  del compuesto C14I calculado para la línea celular MIA PaCa-2 es menor, que el  $IC_{50}$  obtenido para la línea celular hTERT-HPNE, tomando esto en cuenta, es posible que la misma concentración que induce apoptosis en la línea celular tumorigénica K-Ras dependiente MIA PaCa-2, es perfectamente tolerada por las células no





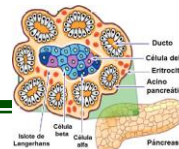
tumorigénicas. Este es un buen resultado, que apoya la selectividad citotóxica del compuesto C14I por las células K-Ras dependientes.



**Figura 29. El compuesto C14I induce muerte por apoptosis desde las 24h en las células MIA PaCa-2.** Las células fueron incubadas con 92  $\mu$ M del compuesto C14I por 24 horas y la intensidad de fluorescencia se midió por citometría de flujo utilizando el kit de Apoptosis/Necrosis (ab176749, abcam) bajo las instrucciones del fabricante. La intensidad de fluorescencia de la Apoxina V se determinó a una longitud de (Ex / Em= 490/525 nm) indicando las células en apoptosis, la necrosis se detectó usando el indicador yoduro de propidio (Ex / Em= 550/650 nm) y las células vivas se detectaron con citocalceína violeta (Ex / Em= 405/450 nm), que se une a las células metabólicamente activas. a) apoptosis inducida por el compuesto C14I en la línea celular MIA PaCa-2 b) apoptosis inducida por el compuesto C14I en la línea celular hTERT-HPNE.

## 9.5 DETERMINACIÓN DEL IMPACTO DEL COMPUESTO C14I SOBRE EL ESTADO DE ACTIVACIÓN DE LOS PRINCIPALES EFECTORES DE K-Ras, QUE SON ERK<sup>P</sup> Y AKT<sup>P</sup>

Como una cadena de eventos desafortunados la activación constitutiva de K-Ras, induce una señalización oncogénica, manteniendo la activación de sus efectores aumentada. Una forma indirecta de analizar que el mecanismo de acción del compuesto C14I es reducir la cantidad de K-Ras activo anclado a la membrana plasmática, fue evaluando si el compuesto reducía el grado de



fosforilación de dos efectores de K-Ras, ERK y AKT, los cuales tienen un papel principal en los procesos oncogénicos.

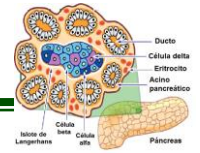
Para determinar los niveles de ERK<sup>P</sup> y AKT<sup>P</sup> activo, se realizaron ensayos tipo western blot en los que se detectó la forma activa o fosforilada de ERK y AKT. Se analizaron los niveles de activación de ERK y AKT en células de cáncer de páncreas MIA PaCa-2 bajo diferentes condiciones (Figura 30 a). Para determinar la máxima activación de ERK y AKT se corrieron los extractos de células cultivadas de forma normal o con DMSO. También se evaluó el efecto de gemcitabine, que es la terapia de elección para tratar el cáncer de páncreas.

Se encontró que los niveles de activación de ERK<sup>P</sup> y AKT<sup>P</sup> no se vieron afectados bajo el tratamiento con gemcitabine, esto puede explicarse porque el mecanismo de acción de gemcitabine no está implicado en inhibir la señalización de K-Ras o sus efectores, más bien es un análogo de nucleósidos que se intercala en el material genético.

Otro compuesto que fue analizado fue deltarasin. Esto debido a que es un compuesto que interfiere con el anclaje de K-Ras4B a la membrana plasmática y por lo tanto disminuye los niveles de activación de sus efectores. Los resultados obtenidos con deltarasin en la línea celular (MIA PaCa-2) muestran una clara reducción en un 50%, de los niveles de fosforilación de ERK y AKT.

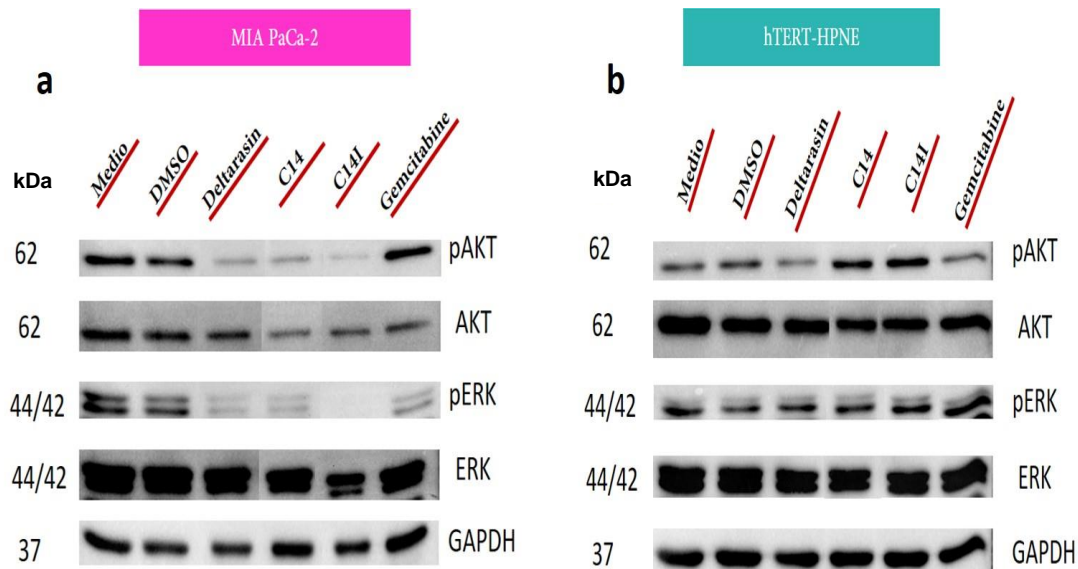
Debido a que el compuesto C14I es un análogo del compuesto C14, se sugiere que tienen un mecanismo de acción similar, el cual teóricamente es estabilizar la formación del complejo K-Ras4B/PDE6 $\delta$ , evitando la liberación K-Ras4B a la membrana plasmática.

Con esto en mente se esperaba que los resultados obtenidos con estos compuestos siguieran un comportamiento similar a deltarasin, al observar nuestros resultados encontramos que ambos compuestos reducen la activación de ERK y AKT, encontrándose una reducción mayor al 50% activación de estos efectores con el compuesto C14I.

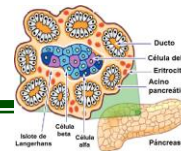


Como los resultados anteriores, sugieren que el compuesto C14I tiene un mejor efecto citotóxico en la línea celular MIA Paca-2 K-Ras dependiente.

Por último, ya que las concentraciones del compuesto C14I que afectan a esta línea celular tumorigénica (MIA PaCa-2) tienen un bajo efecto citotóxico sobre las células no tumorigénicas hTERT-HPNE, se analizaron los niveles de activación de ERK y AKT en células hTERT-HPNE después de ser tratadas bajo las mismas condiciones y concentraciones con las que se trató a las células MIA PaCa-2. Los resultados fueron mejor de lo esperado, ya que se encontró que los niveles de activación de ERK y AKT no se ven afectados cuando la línea celular no tumorigénica hTERT-HPNE es tratada con los compuestos C14 y C14I. En contraste, los resultados con deltarasin mostraron una ligera reducción en los niveles de activación de AKT, con base en estos resultados sugerimos que nuestros compuestos son más selectivos que deltarasin.

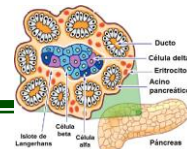


**Figura 30. Reducción de la activación de ERK y AKT en las células MIA PaCa-2 tratadas con C14I.** Western blot de extractos celulares de la línea celular MIA PaCa-2 y hTERT\_HPNE para determinar los niveles de activación de ERK y AKT después de ser tratados con diferentes compuestos a una concentración que afecta a la mitad de la población de células MIA PaCa-2. a) Los extractos celulares de MIA PaCa-2 presentan niveles de activación de ERK y AKT disminuidos después de ser tratados con el compuesto deltarasin, C14 y C14I en comparación a los controles (medio y vehículo) b) en los extractos celulares de hTERT-HPNE no se ve el efecto en la reducción de los efectores con C14 ni C14I, pero sí una ligera reducción de la activación de AKT con deltarasin



## 10. DISCUSIÓN

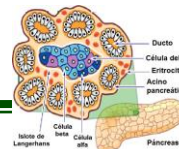
La búsqueda de compuestos para el tratamiento de cáncer de páncreas, específicos y con un reducido efecto citotóxico, continúa (Liu, Wang & Li, 2019). Pues a pesar de que diversas estrategias para inhibir la señalización oncogénica de K-Ras han sido planteadas, ninguna de las terapias propuestas ha llegado a ser probada en fases clínicas, ya que no cumplen con la selectividad de afectar específicamente a las células tumorales, y en cambio resultan ser altamente tóxicas para todo el organismo. Por lo antes mencionado, nuestro grupo de trabajo incursionó en este campo proponiendo la obtención de compuestos cuyo mecanismo de acción fuera reducir de forma específica la señalización mediada por K-Ras oncogénico. Partiendo de una premisa similar a la que desarrolló Zimmermann y colaboradores en el 2013, pero mediante una estrategia más novedosa y específica. De forma general, la estrategia del grupo de Zimmermann consistía en la obtención de un compuesto que se uniera a la cavidad hidrofóbica de PDE6 $\delta$ , de tal forma que se impide la unión del farnesilo de K-Ras4B en la cavidad de esta proteína que funciona como chaperona en el transporte y anclaje de K-Ras4B a la membrana plasmática, así, al reducir el anclaje de K-Ras4B a la membrana plasmática, también se reduce la señalización oncogénica de K-Ras4B. El compuesto obtenido por este grupo de investigadores fue deltarasin, un compuesto que al interferir con la función de PDE6 $\delta$ , afecta otros procesos celulares dependientes de esta proteína. En contraste, la estrategia terapéutica propuesta por nuestro grupo de trabajo consiste en la obtención de compuestos que funcionen como grapas moleculares; es decir, que estabilicen la interacción entre las proteínas del complejo K-Ras4B/PDE6 $\delta$ . Por lo cual, se espera que el impacto biológico de la estabilización de este complejo reduzca el anclaje de K-Ras4B a la membrana plasmática, en una forma más específica, y por ende disminuya la señalización de K-Ras implicada en el mantenimiento y progresión de cáncer de páncreas (Casique *et al.*, 2018).



Uno de los primeros compuestos evaluados por nuestro grupo de estudio fue el compuesto C14; este compuesto se encontró a través de análisis *in silico*, por sus altos puntajes de interacción con la interfaz del complejo K-Ras4B/PDE6δ (Casique *et al.*, 2016). Algunas de las características del compuesto C14 fueron probadas en el trabajo de tesis de la M. en C. Lorena Gorgonio, entre éstas el efecto citotóxico, donde se observó mayor efecto en la línea celular MIA PaCa-2, K-Ras dependiente, y un efecto reducido en la línea celular no tumorigénica hTERT-HPNE, sugiriendo especificidad del compuesto (Gordonio, 2016), otros resultados obtenidos por la M. en C. Paola Briseño demostraron que en modelos de xenoinjerto murino se reducía en un 80% el tamaño de los tumores de origen pancreático, estos y otros resultados llevaron a nuestro grupo de investigación a continuar con el estudio de este compuesto por su potencial antineoplásico.

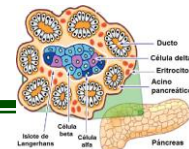
Dado que dentro de las pruebas preclínicas que se sugieren para caracterizar nuevos fármacos, se encuentran estudios de farmacocinética y farmacodinámica del compuesto (Brodniewics & Gryniewicz, 2010; Honek, 2017), nuestro grupo de trabajo propuso que para estudiar estos procesos podría ser útil el marcaje del compuesto C14 con un elemento trazable, de tal forma que se pudiese determinar su biodistribución, sus blancos moleculares, etc.

Revisando algunos artículos encontramos el uso del radioisótopo de yodo<sup>131</sup> para marcaje de algunos fármacos con el fin de estudiar su biodistribución, e incluso su uso con fines terapéuticos (Lambrecht, Durkan, Yildirim & Acar, 2006; Jeon *et al.*, 2015). No obstante, era necesario encontrar una forma de marcar al compuesto C14 con yodo sin hacer cambios significativos en su estructura, por consiguiente, se propuso hacer una sustitución de halógenos; con esta estrategia se planteaba sustituir el átomo de cloro, presente en la estructura original del compuesto C14, por yodo para generar al compuesto C14I. Esta idea fue sustentada con artículos que sugieren que la obtención de análogos por sustitución de halógenos da como resultado compuestos que



mantienen sus blancos terapéuticos e incluso mejoran la interacción y afinidad con su blanco molecular (Ghorab, Alsaid, Al-Ansary, Abdel-Latif & Abou El, 2016).

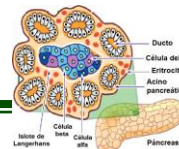
Con base en lo descrito en el párrafo anterior, se obtuvo el compuesto C14I, un análogo del compuesto C14 que conservó el farmacóforo y la mayoría de las características estructurales, con su compuesto líder “el compuesto C14”. Así, la única diferencia entre ambos compuestos es conferida por el átomo de yodo; e implica una mayor nube electrónica, y una menor electronegatividad. No obstante, es preciso señalar que algunos estudios reportan que hay una pérdida de afinidad de los análogos hacia su blanco molecular, en una forma directamente proporcional al mayor tamaño del halógeno presente en el análogo (Zaldani, Melo, Moreira, de Azevedo & Leite, 2010; Lampidis *et al.*, 2006). Con esto en mente, se corría el riesgo de que el compuesto C14I perdiera afinidad por su blanco molecular, pues el yodo es el halógeno de mayor tamaño. Sin embargo, después de que realizamos análisis *in silico* se demostró que el compuesto C14I tenía incluso mejores puntajes de interacción que el compuesto cabeza de serie C14, pero dado que los ensayos *in silico* presentan cierto grado de incertidumbre (Lampidis *et al.*, 2006), se evaluaron experimentalmente otras características que verificaran la mejoría en la interacción del compuesto C14I con su blanco molecular en estudios *in vitro* e *in vivo*. Por esta razón se inició la caracterización del compuesto C14I haciendo la comparación con el compuesto cabeza de serie C14. Primero se confirmó que la mejoría del puntaje de interacción obtenida *in silico*, correlacionaba con una mejoría en el efecto citotóxico del compuesto C14I; este fenómeno fue más evidente en la línea celular de cáncer de páncreas MIA PaCa-2, sugiriendo una mayor selectividad del compuesto C14I por esta línea celular tumorigénica que presenta la mutación G12C en el gen K-RAS. Por consiguiente, para determinar si la mutación podía explicar el aumento de dicha selectividad, como consecuencia de una mejor interacción entre el compuesto y la proteína mutada, se recurrió a realizar análisis *in silico*, en donde forma virtual se hizo el cambio de la glicina en la posición 12 por una



cisteína en la proteína K-Ras4B; así se generó la interfaz K-Ras4B<sup>G12C</sup>/PDE6δ, correspondiente a la mutación G12C del gen K-RAS presente en la línea celular MIA PaCa-2. Una vez obtenidas las interfaces, se realizaron ensayos de *docking* molecular y se comparó por puntaje, la interacción del compuesto C14I; con ambas interfaces (la interfaz K-Ras4B<sup>WT</sup>/PDE6δ y la interfaz K-Ras4B<sup>G12C</sup>/PDE6δ), sin embargo, los resultados *in silico* no pudieron explicar el fenómeno de selectividad citotóxica, ya que no mostraron mejoría significativa de la afinidad, en función de la proteína mutada.

Como la selectividad citotóxica del compuesto C14I por las células MIA PaCa-2 no se pudo explicar por un aumento en la afinidad del compuesto por la interfaz K-Ras4B<sup>G12C</sup>/PDE6δ, se buscaron otras explicaciones a este fenómeno. Primero, dado que el *docking* está basado en la interacción exclusiva receptor ligando, es posible que este fenómeno de selectividad esté implicado cambio en la polaridad de los compuestos que influyan en el paso de los compuestos a través de la membrana o por la interacción con otras proteínas; otra forma de explicar la selectividad del compuesto C14I fue partiendo de su mecanismo de acción, el cual tiene como principio reducir la señalización dependiente de K-Ras (Singh *et al.*, 2009). Tomando en cuenta esto, se puede explicar la selectividad del compuesto en función de los niveles de dependencia de la señalización de K-Ras en las células. De esta forma la concentración del compuesto C14I que afecta la viabilidad de células K-Ras dependientes; en donde los procesos de proliferación celular, viabilidad y supervivencia son principalmente dirigidos por la continua señalización de K-Ras (Singh *et al.*, 2009), tiene menor efecto en células que no dependen de la señalización de K-Ras. Es decir, en estas células no dependientes de K-Ras, los procesos de proliferación celular, viabilidad y supervivencia son regulados por otras vías de señalización (Karnoub & Weinberg, 2008; Newlaczyl, Coulson & Prior, 2017).

Es importante resaltar que en nuestros resultados el análogo C14I aumentó su especificidad citotóxica, por la línea MIA PaCa-2 K-Ras dependiente, en

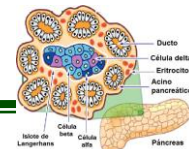


comparación al compuesto C14. Esto concuerda con los resultados de un estudio en el que para inhibir de forma selectiva a las células con un mayor grado de dependencia a la glicolisis “células hipóxicas”, generaron análogos de la D-glucosa por sustitución de halógenos y estos análogos que aumentaron la afinidad por su blanco molecular (la enzima hexocinasa 1), y en consecuencia afectaron de forma preferente a las células hipóxicas cuyo metabolismo es más dependiente de la glicólisis, de esta forma los análogos resultaron más selectivos (Lampidis *et al.*, 2006). Esto sugiere que el aumento en la selectividad del compuesto C14I, al igual que los análogos de la D-glucosa; están en función del aumento de la afinidad por su blanco molecular y como consecuencia se observa un mayor efecto en las células que presentan mayor dependencia a este blanco molecular. En nuestro caso, se observa que al mejorar los puntajes de interacción del compuesto C14I por su blanco molecular K-Ras4B/PDE6 $\delta$ , se aumenta la especificidad de acción citotóxica sobre las células dependientes de señalización oncogénica de K-Ras (Singh *et al.*, 2009; Lampidis *et al.*, 2006).

Tomando en cuenta que al disminuir la señalización de K-Ras también se disminuyen los procesos de proliferación, progresión del ciclo celular y sobrevivencia. Pues como se muestra en la Figura 10, estos procesos se encuentran regulados por los efectores situados río abajo de las proteínas Ras (Gurung & Bhattacharjee, 2015; Newlaczyl *et al.*, 2014).

Aunque de forma normal K-Ras puede activar a diferentes efectores, dependiendo del contexto celular y el tipo de célula, existe una preferencia por algunos de ellos, tal es el caso de las células oncogénicas dependientes de K-Ras, donde se ha demostrado que los dos principales efectores activados por el oncogén K-RAS, regula procesos de proliferación y anti-apoptosis, mediante las vías de las MAPK (RAF/MEK/ERK) y PI3K/AKT (Spiegel *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2018). Con base en esto, se esperaba que nuestros compuestos disminuyeran la capacidad clonogénica en las células de cáncer de páncreas K-Ras dependientes (MIA PaCa-2), como consecuencia de reducir la

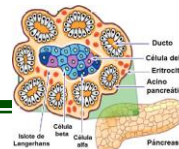




señalización de las MAPK dependiente de K-Ras. Los resultados obtenidos con el compuesto C14I fue una reducción del 85% de la capacidad clonogénica de estas células, de igual forma el compuesto cabeza de serie mostró la misma reducción, pero con una mayor concentración del compuesto. Por otra parte, deltarasin y gemcitabine (Koizumi *et al.*, 2005) redujeron 5% más la capacidad clonogénica que nuestros compuestos. No obstante, tanto gemcitabine como deltarasin son compuestos inespecíficos, con una alta toxicidad en líneas celulares no tumorogénica, y aunque gemcitabine sigue siendo la terapia de primera elección, está reportado que las células de cáncer desarrollan resistencia a esta terapia (Samulits *et al.*, 2015).

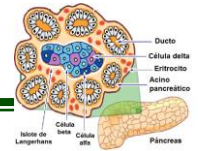
Además el 5% de la capacidad clonogénica que no puede ser reducida por el compuesto C14I, puede ser justificada por la evidente selectividad citotóxica del compuesto C14I por las células MIA PaCa-2, es por ello que no se descarta el estudio de nuestros compuestos, como una terapia contra cáncer de páncreas, pues tienen un menor efecto citotóxico en la línea celular no tumorogénica, lo que implicaría un menor daño generalizado (O'Bryan, 2019). Cabe aclarar que para sustentar esto hacen falta más estudios que confirmen que no hay daño citotóxico en otras líneas celulares no tumorogénicas.

Tomando en cuenta que la capacidad clonogénica también se afecta por la inducción de muerte en las células, se quiso determinar si las células de cáncer de páncreas K-Ras dependientes MIA PACA-2, eran llevadas a la inducción de muerte celular después de ser tratadas con el compuesto C14I. Esto debido a que teóricamente, el compuesto C14I tiene como finalidad reducir el anclaje de K-Ras4B a la membrana plasmática y con esto, reducir la señalización dependiente de K-Ras. Era factible suponer que, al reducir la señalización oncogénica de K-Ras, se tendría como consecuencia una desregulación de la compleja red de señalización en la cual se encuentra implicado K-Ras, pues está descrito que puede regular procesos pro- y anti-apoptóticos dependiendo del contexto celular (Hueber & Evan, 1998).



Particularmente se ha reportado que las células transformadas con actividad oncogénica de K-Ras presentan una señalización favorecida de las vías anti-apoptóticas PI3K/AKT, Rac y NF- $\kappa$ B. Por consiguiente, es lógico pensar que al inhibirse la señalización de las vías anti-apoptóticas, la señalización de otros efectores pro-apoptóticos pueden ser activados, como son los efectores Nore 1 y RASSF1 (Cox & Der, 2003). Con esto en mente, podemos sugerir que el compuesto C14I puede inducir apoptosis como consecuencia de disminuir la señalización dependiente de K-Ras, a su vez este fenómeno ya se ha visto en modelos de privación de la señalización oncogénica de K-Ras. Primero en los modelos transgénicos, en los que al dejar de inducir la expresión de K-Ras oncogénico, se inducía la apoptosis en neumocitos (Fisher *et al.*, 2001), o en otro ejemplo, donde la respuesta a tratamientos como deltarasin dirigidos a inhibir el anclaje de K-Ras a la membrana plasmática (Han *et al.*, 2018) inducen apoptosis en las células como consecuencia de la inhibir la señalización oncogénica de K-Ras.

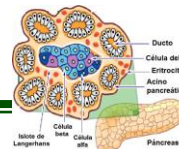
A su vez, es necesario demostrar que un compuesto induzca muerte celular por apoptosis, para calificarse como adecuado, pues se ha reportado que la inducción de otros tipos de muerte como necrosis, inducen daño celular, procesos de inflamación y pueden favorecer los procesos de metástasis (Su, Yang, Xu, Chen & Yu, 2015; Ricci & Zong, 2006). Con nuestros resultados de citometría de flujo, determinamos que el compuesto C14I induce muerte por apoptosis en un 60% de la población de células MIA PaCa-2, y aunque ya se sabía que el compuesto C14 también induce una muerte por la vía de apoptosis, nuestros resultados indican que el compuesto C14I aumenta en 20% la inducción de apoptosis en la línea celular MIA PaCa-2, y con una menor concentración, por el contrario, cuando se probó esta misma concentración del compuesto C14I, sobre las células no tumorogénicas hTERT-HPNE, no se detectó inducción de apoptosis. En efecto, estos resultados siguen apoyando la idea de que el compuesto C14I es mejor y más selectivo que el compuesto C14 (Briseño, 2017; Gorgonio, 2016).



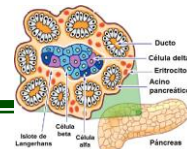
Por último, a pesar de que las evidencias *in silico* mostraban que el compuesto C14I tiene el mismo blanco molecular que C14, una forma indirecta que nos permite sugerir que estos compuestos reducen el anclaje de K-Ras4B a la membrana plasmática. Fue evaluando los niveles de activación de ERK y AKT, dos de los principales efectores de K-Ras oncogénico. (Eser, Schnieke, Schneider & Saur, 2014). Se tomó como referencia la activación de ERK y AKT en condiciones normales, y después de ser tratados con deltarasin, que mediante un mecanismo de acción diferente al propuesto por nuestros compuestos, comparte el objetivo final, que implica reducir el anclaje de K-Ras4B a la membrana plasmática y por ende la activación de sus efectores (Zimmermann *et al.*, 2013), de esta forma partiendo de que nuestros compuestos y deltarasin reducen el anclaje de K-Ras a la membrana plasmática, se esperaban resultados similares (Casique *et al.*, 2018).

En nuestros resultados de activación de los efectores de K-Ras, se determinó que el compuesto C14 reduce los niveles de activación de ERK y AKT igual que deltarasin, mientras que el compuesto C14I reduce más los niveles de activación de ambos efectores en la línea celular K-Ras dependiente MIA PaCa-2. En contraste, no se encontró reducción en la activación de estos efectores en la línea celular no tumorigénica hTERT-HPNE cuando fue tratada con la misma concentración del compuesto C14I que redujo los niveles de activación de las células MIA PaCa-2, a diferencia de las células hTERT-HPNE, que al ser tratadas con deltarasin presentaron una ligera reducción en la activación de AKT. Con estos resultados nosotros sugerimos que nuestros compuestos disminuyen el anclaje de K-Ras4B a la membrana plasmática con una mayor especificidad que deltarasin, y se sugiere que la especificidad es dada por tener como blanco molecular al complejo molecular K-Ras4B/PDE6 $\delta$  y no sólo interferir con la actividad de PDE6 $\delta$  y sus múltiples funciones (O'Bryan, 2019; Chandra *et al.*, 2011).

En resumen, con este trabajo se logró caracterizar de forma *in silico* e *in vitro* al compuesto C14I y como era esperado presentó un comportamiento similar



al compuesto C14, que fue previamente reportado por nuestro grupo de investigación (Gorgonio, 2016). No obstante falta realizar la caracterización a nivel de xenoinjerto murino, lo que nos daría más pruebas de que el compuesto C14I puede ser utilizado como una herramienta molecular, que permita estudiar otras propiedades farmacológicas del compuesto; como biodistribución y sus blancos moleculares. Por otro lado, la notable mejoría en la actividad citotóxica del compuesto C14I, con respecto al compuesto C14; sugiere que C14I podría ser estudiado no sólo como una herramienta para determinar la biodistribución del compuesto cabeza de serie C14, ya que si cumple con otras características de estabilidad y bioseguridad, podría continuarse su estudio como un nuevo compuesto contra el cáncer de páncreas. Esto resulta interesante, ya que en pocos estudios se reporta la obtención de análogos yodados, esto porque se cree que las características del yodo les dan inestabilidad a las estructuras de los compuestos. Cabe señalar que para que el compuesto C14I funcione como un trazador, debe ser marcado con un radioisótopo de yodo. Otro punto interesante surge después de que, en otro estudio de nuestro grupo de trabajo, se observó que el marcaje del compuesto C19 con el radioisótopo 131 de yodo ( $I^{131}$ ), potenciaba su efectividad citotóxica. Con base en estos resultados nuestro grupo de trabajo tiene en mente que el compuesto C14I marcado con yodo 131, pueda ser empleado no sólo para determinar biodistribución, sino para que sea evaluado su potencial como un radiofármaco. Aunque esto suena muy prometedor hacen falta más estudios, que permitan comprobar que su uso sería seguro y efectivo. Esto mantiene a nuestro grupo de trabajo enfocado en la mejora continua del compuesto C14I, de tal forma que se asegure que pase todas las fases preclínicas y logre un efecto terapéutico en la fase clínica. Nuestro objetivo es obtener una terapia más específica y menos tóxica, que la terapia actual contra cáncer de páncreas.



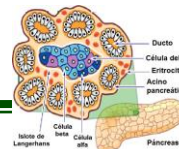
## 11. CONCLUSIONES

Como resultado de una sustitución de un halógeno en el compuesto C14, se obtuvo el compuesto C14I, el cual fue en un principio propuesto como un análogo que tuviese funciones como una herramienta molecular para continuar los estudios de biodistribución del compuesto líder C14. Sin embargo, al evaluar sus características funcionales, se encontró que este análogo presentó mejoras en la actividad citotóxica sobre una línea celular tumorigénica (MIA PaCa-2) y aumento la selectividad por inhibir los procesos dependientes de la señalización de K-Ras, en comparación al compuesto líder C14.

De forma particular se encontró que:

- a. El cambio de halógeno en la estructura del compuesto C14I aumentó su puntaje de interacción con su blanco molecular *in silico* y también mostró una mejor actividad *in vitro* que el compuesto C14.
- b. El compuesto C14I mejoró sus propiedades citotóxicas y aumento la selectividad por las células de cáncer MIA PaCa-2.
- c. Se redujo el IC<sub>50</sub> con el compuesto C14I y presentó un efecto antiproliferativo en el mismo orden de magnitud que el tratamiento de referencia (gemcitabine).
- d. Se determinó que el IC<sub>50</sub> del compuesto C14I induce un 60% de muerte por apoptosis en las células de cáncer de páncreas MIA PaCa-2, y esta misma concentración tiene un efecto mínimo en las células no tumorigénicas hTERT-HPNE.
- e. El compuesto C14I disminuye los niveles de activación de dos de los principales efectores de K-Ras oncogénico en una forma similar a deltarasin.

Todo esto nos lleva a concluir de forma general: que se mejoraron las propiedades del compuesto líder C14, como consecuencia de la sustitución de un halógeno.

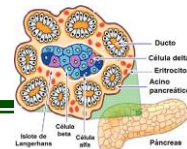


## 12. PERSPECTIVAS

a. Las características químicas y estructurales del compuesto C14I, fueron similares a las de compuesto C14, lo que permite sugerir su utilidad como herramienta molecular, para continuar los estudios de farmacocinética y farmacodinamia del compuesto líder C14.

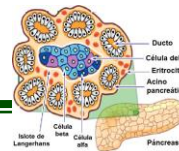
b. De esta forma, se propone el marcaje del compuesto C14I con un radioisótopo de yodo ( $I^{131}$ ); para generar el compuesto C14I<sup>131</sup> (marcado radiactivamente con yodo 131), el cual pueda ser usado como una herramienta molecular para determinar la farmacocinética y farmacodinámica del compuesto cabeza de serie C14.

c. Por otro lado, las mejores propiedades citotóxicas y de selectividad del análogo C14I por células de cáncer de páncreas K-Ras dependientes MIA PaCa-2, sugieren que se continúe estudiando sus propiedades antitumorales, incluso se espera que una vez marcado con el radioisótopo  $I^{131}$  (el compuesto C14I<sup>131</sup>) pueda ser evaluado como un radiofármaco de uso terapéutico.



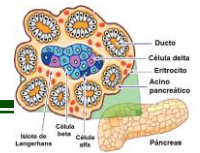
### 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Adrienne Cox, C. D. (2003). **The dark side of RAS: regulation of apoptosis.** *Ongene*, 22(56):8999-9006.
2. Appels, N., Beijnen, J., & Schellens, J. (2005). **Development of farnesyl transferase inhibitors: a review.** *The Oncologist*, 10(8):565-878.
3. Argent, B., Rakonczay, Z. J., Fearn, A., Hegyi, P., Boros, I., & Gray, M. (2006). **Characterization of H<sup>+</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporters in CFPAC-1 human pancreatic duct cells.** *World Journal Gastroenterology*, 12(6):885-895.
4. Barsov, E. V. (2011). **Immortalization of human and rhesus macaque primary antigen-specific t cells by retrovirally transduced telomerase reverse transcriptase.** *Current Protocols Immunologies*, Chapter 7, Unit 7- Vol 21B,23-41.
5. Basturk, O. e. (2015). **A revised classification system and recommendations from the baltimore consensus meeting for neoplastic precursor lesions in the pancreas.** *Journal.Surgical Pathologies.*, 39(12):1730-41.
6. Bockman, D. E. (1993). **Anatomy of the pancreas.** *The Pancreas: Biology Pathobiology, and Disease*, 1-8.
7. Bournet, B., Buscail, C., Muscari, F., Cordelier, P., & Buscail, L. (2016). **Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: hopes and realities.** *European Journal of Cancer*, 54:75-83.
8. Briseño Diaz , P. (2017). **Evaluación in vitro de la eficacia de los análogos del compuesto contra el complejo molecular k-ras/pde6δ en celulas de cáncer pancreático.** Ciudad de México: *CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL.*
9. Brodniewics, T., & Gryniewicz, G. (2010). **Preclinical Drug Development.** *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*,67(6): 579-586.
10. Casique Aguirre, D. (2016). **Identificación y evaluación in silico, in vitro e in vivo de pequeñas moléculas que estabilizan el complejo molecular KRas4B-PDEδ.** Ciudad de México: *CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL.*
11. Casique-Aguirre, D., Briseño-Díaz, P., García-Gutiérrez, H., G.-D. L., A., R.-D., I., V., Thompson-Bonilla M. R., A. V. (2018). **KRas4B-PDEδ stabilization by small molecules obtained by virtual screening affects the Ras signaling in pancreatic.** *Biomedicina Molecular Edited by CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL*, 19.
12. Cazzanelli, G., Pereira, F., Alves, S., Francisco, R., Azevedo, L., Dias Carvalho, P., & Sousa, M. J. (2018). **The yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model for understanding RAS proteins and their role in human tumorigenesis.** *Cells*, 7(2):14.

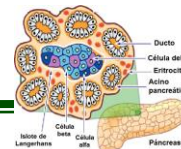


- 13.** Chandra, A., Grecco, H., Pisupati, V., Perera, D., Cassidy, L., Skolidis, F., . . . Bastiaens, P. (2011). **The GDI-like solubilizing factor pde $\delta$  sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins.** *National Cell Biology*, 14(2): 148-58.
- 14.** Chuang, H.-C., Huang, P.-H., Kulpa, S. K., & Chen, C.-S. (2017). **Pharmacological strategies to target oncogenic KRAS signaling in pancreatic cancer.** *Pharmacological Research*, 117: 370-376.
- 15.** Deer, E. L.-H. (2010). **Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines.** *Pancreas*, 39(4): 425-435.
- 16.** Dharmaiah, S., Bindu, L., Tran, T. H., Gillette, W. K., Frank, P. H., Ghirlando, R., & Simanshu, D. (2016). **Structural basis of recognition of farnesylated and methylated KRAS4b by PDE $\delta$ .** *PNAS*, E6766-E6775.
- 17.** Dobelbower, R. (1990). **Gastrointestinal Cancer.** Berlin: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-83657-2
- 18.** Elaine Lai Han Leung, L. X. (2003). **Inhibition of KRAS-dependent lung cancer cell growth by deltarasin: blockage of autophagy increases its cytotoxicity.** *Cell Death and Disease*, 9(2):216.
- 19.** Eser, S., Schnieke, A., Schneider, G., & Saur, D. (2014). **Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer.** *British Journal of Cancer*, 111 (5): 817-822.
- 20.** Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, **Cáncer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11** [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 29 February 2016.
- 21.** Fisher GH1, W. S. (2001 ). **Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes.** *Genes Development*, 15(24):3249-62.
- 22.** Ghorab, M., Alsaid , M., Al-Ansary, G., Abdel -Latif, G., & Abou El , D. (2016). **Analogue based drug design, synthesis, molecular docking and anticancer evaluation of novel chromene sulfonamide hybrids as aromatase inhibitors and apoptosis enhancers.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 124:946-958.
- 23.** Gorgonio Eusebio, L. (2016). **Evaluación in vitro del efecto antineoplásico de nuevos compuestos dirigidos contra el complejo molecular kras/pde $\delta$  en líneas celulares de cáncer pancreático.** Ciudad de México: CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL.
- 24.** Gurung, B. A., & Bhattacharjee, A. (2015). **Significance of ras signaling in cancer and strategies for its control.** *Oncology & Hematology Review*, 11(2): 147-52.





- 25.** Hackeng, W. M., Hruban, R. H., Offerhaus, G. J., & Brosens, L. A. (2016). **Surgical and molecular pathology of pancreatic neoplasms.** *Diagnostic Pathology*, 11(1): 47.
- 26.** Hegyi, P., Maléth, J., Venglovecz, V., & Rakonczay, Z. (2011). **Pancreatic ductal bicarbonate secretion: challenge of the acinar acid load.** *Frontiers in Physiology*, 2: 36.
- 27.** Henis, Y., Hancock, J., & Prior, I. (2009). **Ras acylation, compartmentalization and signaling nanoclusters (Review).** *Molecular Membranes Biology*, 1: 80-92.
- 28.** Hezel, M. D., Richard, F., Dunne, M. D., & Aram, F. (2015). **Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 29(4), 595-608.
- 29.** Hill, M. (1 de Agosto de 2018). **Embryology endocrine - pancreas development.** Obtenido de Embryology Endocrine - Pancreas Development: [https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Endocrine\\_Pancreas\\_Development](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Endocrine_Pancreas_Development)
- 30.** Honek, J. (2017). **Preclinical research in drug development.** *Medical Writing*, 26 (4):8-11.
- 31.** Jennings, R. E., Berry, A. A., Strutt, J. P., Gerrard, D. T., & Hanley, N. A. (2015). **Human pancreas development.** *Development*, 142(18), 3126-3137.
- 32.** Jeon, J., Young Ma, S., Seong Choi Dae, Su Jang, B., Ae Kang, J., Ree Nam, Y., Hyun Park, S. (2015). **Radiosynthesis of <sup>123</sup>I-labeled hesperetin for biodistribution study of orally administered hesperetin.** *Journal Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 306:437-443.
- 33.** Jinesh, G. G., Sambandam, V., Vijayaraghavan, S., Balaji, K., & Mukherjee, S. (2017). **Molecular genetics and cellular events of K-Ras-driven tumorigenesis.** *Oncogene*, 37(7): 839.
- 34.** Kanda, M. e. (2012). **Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intra epithelial neoplasia.** *Gastroenterology*, 142(9): 730-733.
- 35.** Karnoub, A., & Weinberg, R. (2008). **Ras oncogenes: split personalities.** *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 9: 517-531.
- 36.** Koizumi, K., Tanno, S., Nakano, Y., Habiro, A., Izawa, T., Mizukami, Y., Kohgo, Y. (2005). **Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is necessary for gemcitabine-induced cytotoxicity in human pancreatic cancer cells.** *Anticancer Research*, 25: 3347-3354.
- 37.** Koorstra, J. B., Hustinx, S. R., Offerhaus, G. J., & Maitra, A. (2008). **Pancreatic carcinogenesis.** *Pancreatology*, 8(2): 110-125.
- 38.** Lampidis, T., Kurtoglu, M., Maher, J., Liu, H., Krishan, A., Sheft, V., Priebe, W. (2006). **Efficacy of 2-halogen substituted D-glucose analogs in blocking**



**glycolysis and killing "hipoxic tumor cells".** *Cancer Chemother Pharmacol*, 58: 725-734.

**39.** Lee, K., Nguyen, C., Ulrich, A., Pour, P., & Ouellette, M. (2003). **Immortalization with telomerase of the Nestin-positive cells of the human pancreas.** *Biochemistry Biophysical Research Communicate*, 301(4):1038-44.

**40.** Lee, M., & Muallem, S. (2008). **Physiology of duct cell secretion.** *In Pancreas: An integrated textbook of basic science, medicine, and surgery*, 78-90.

**41.** Leung, P. S., & Ip, S. P. (2006). **Pancreatic acinar cell: its role in acute pancreatitis.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(7): 1024-1030.

**42.** Lipinski, C., Lombardo, F., Dominy, B., & Feeney, P. (2001). **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.** *Advance Drug Deliver Revista*, 46 (3):3-26.

**43.** Liu, P., Wang, Y., & Li, X. (2019). **Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy.** *Acta Pharmaceutica Sinica B*.

**44.** Loc, W. S., Smith, J. P., Matters, G., Kester, M., & Adair, J. H. (2014). **Novel strategies for managing pancreatic cancer.** *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(40), 14717–14725. Obtenido de <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i40.14717>

**45.** Longnecker, D. (2014). **Anatomy and histology of the pancreas.** *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. doi:10.3998/panc.2014.3

**46.** Lu, S., Jang, H., Nussinov, R., & Zhang, J. (2016). **The structural basis of oncogenic mutations G12, G13 and Q61 in small GTPase K-Ras4B.** *Scientific Reports*, 6: 21949.

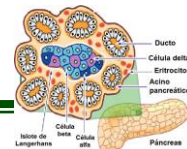
**47.** Makohon-Moore, A., & Iacobuzio-Donahue, C. A. (2016). **Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective.** *Nature Reviews Cancer*, 16(9): 553.

**48.** Matrisian, L., Aizenberg, R., & Rosenzweig, A. (2012). **The alarming rise of pancreatic cancer in the United States: why we need to stem the tide today.** *Pancreatic Cancer Action Network*. Obtenido de [http://www.pancan.org/section\\_research/reports/pdf/incidence\\_report\\_2012.pdf](http://www.pancan.org/section_research/reports/pdf/incidence_report_2012.pdf).

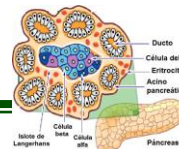
**49.** Mei Hu, C., Chih Tien, S., Kun Hsieh, P., Ming Jeng, Y., Chu Chang, M., Ting Chang, Y., Hwa Lee, W. (2019). **High glucose triggers nucleotide imbalance through o-glcNacylation of key enzymes and induces KRAS mutation in pancreatic cells.** *Cell Metabolism*, 29: 1334–1349.

**50.** Michel Ducreux, T. S.-L.-P. (2019). **Systemic treatment of pancreatic cancer revisited.** *Seminary Oncology*, 46(1): 28-38.

**51.** Miura, F., Takada, T., Amano, H., Yoshida, M., Furui, S., & Takeshita, K. (2006). **Diagnosis of pancreatic cancer.** *Taylor & Francis*, 8: 337-342.



- 52.** Newlaczyl, A. U., Coulson, J. M., & Prior, I. A. (2017). **Quantification of spatiotemporal patterns of Ras isoform expression during development.** *Nature*, 127.
- 53.** Newlaczyl, A. U., Hood, F. E., Coulson, J. M., & Prior, I. A. (2014). **Decoding RAS isoform and codon-specific signalling.** *Biochemical Society Transactions*, 742-746.
- 54.** Nussinov, R., Tsai, C.-J., Chakrabarti, M., & Jang, H. (2016). **A new view of ras isoforms in cancers.** *Cancer Research*, 76(1):18-23.
- 55.** O'Bryan, J. (2019). **Pharmacological targeting of RAS: recent success with direct inhibitors.** *Pharmacol Research*, 503-511.
- 56.** Pandol, S. J. (2010). **Pancreatic embryology and developmen.** En P. S.J., *The Exocrine Pancreas*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54135/>
- 57.** Quinlan, M. P., Quatela, S. E., Philips, M. R., & Settleman, J. (2008). **Activated Kras, but not Hras or Nras, may initiate tumors of endodermal origin via stem cell expansion.** *Molecular and Cellular Biology*, 28(8): 2659-2674.
- 58.** Rawlaa, p., Sunkarab, T., & Guduputi, V. (2019). **Epidemiology of pancreatic cancer: global trends,etiology and risk factors.** *World Journal Of Oncology*, 10(1): 10-27.
- 59.** Ricci , M., & Zong, W.-X. (2006). **Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways.** *Oncologist*, 11 (4): 342-357.
- 60.** Rishi, A., Goggins, M., Wood, L. D., & Hruban, R. H. (Feb, 2015). **Pathological and molecular evaluation of pancreatic neoplasms.** *In Seminars in Oncology*, 42(1): 28-39.
- 61.** Samulitis, B., Pond, K., Pond, E., Cree, A., Patel , H., Wisner, L., Landowski, T. (2015). **Gemcitabine resistant pancreatic cancer cell lines acquire an invasive phenotype with collateral hypersensitivity to histone deacetylase inhibitors.** *Cancer Biology & Therapy* , 16(1): 43-51.
- 62.** Simanshu, D. K., Bindu, L., Tran, T. H., Gillette, W. K., Frank, P. H., & Ghirlando, R. (2016). **Structural basis of recognition of farnesylated and methylated KRAS4b by PDEδ.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(44): E67.
- 63.** Singh , A., Greninger, P., Rhodes, D., Koopman, L., Violette, S., Bardeesy, N., & Settleman , J. (2009). **A gene expression signature associated with “K-Ras addiction” reveals regulators of EMT and tuor cell survival.** *Cancer Cell*, 15 (6): 489-500.
- 64.** Sousa Cavalcante, L., & Monteiro, G. (2014). **Gemcitabine: Metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer.** *European Journal of Pharmacology*, 74: 8–16.



65. Stephen, A. G., Esposito, D., Bagni, R. K., & McCormick, F. (2014). **Dragging ras back in the ring.** *Cancer cell*, 25(3): 272-281.
66. Spiegel, J. C. (2014). **Small-molecule modulation of Ras signaling.** *National Chemistry Biology*, 10: 613-622.
67. Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q. (2015). **Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis.** *Molecular Cancer*, 14-48.
68. Thorel, F., Népote, V., Avril, I., Kohno, K., Desgraz, R., Chera, S., & Herrera, P. L. (2012). **Conversion of adult pancreatic  $\alpha$ -cells to  $\beta$ -cells after extreme  $\beta$ -cell loss.** *Nature*, 464(7292): 1149.
69. Waters, A., & Der, C. (2018). **KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8 (9).
70. Wlodkowic , D., Skommer, J., & Darzynkiewicz, Z. (2013). **Flow cytometry-based apoptosis detection.** *Methods Molecular Biologies* , 559.
71. Wolfgang, C. L., Herman, J. M., Laheru, D. A., Klein, A. P., Erdek, M. A., Fishman, E. K., & Hruban, R. H. (2013). **Recent progress in pancreatic cancer.** *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63(5): 318-348.
72. Yurt Lambrecht, F., Durkan , K., Yildirim, Y., & Acar, C. (2006). **Labeling of Acetaminophen with I-131 and Biodistribution in Rats.** *Chemistry Pharmacology Bull.*, 54(2): 245-247.
73. Zaldini Hernandez, M., Melo T. Cavalcanti, S., M. Moreira , D. R., de Azevedo Junior, W. F., & Lima Leite, A. C. (2010). **Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design.** *Current Drug Targets*, 11: 303-314.
74. Zhang, H., Constantine, R., Frederick, J., & Baehr, W. (2012). **The prenyl-binding protein PrBP/ $\delta$ : a chaperone participating in intracellular trafficking.** *Vision Research.*, 75: 19-25.
75. Zhou, Y., Prakash, P., Liang, H., Cho, K. J., Gorfe, A. A., & Hancock, J. F. (2017). **Lipid-sorting specificity encoded in K-Ras membrane anchor regulates signal output.** *Cell*, 239-251.
76. Zimmermann, G., Papke, B., Ismail, S., Vartak, N., Chandra, A., Hoffmann, M., & Hahn, A. (2013). **Small molecule inhibition of the KRAS–PDEd interaction impairs oncogenic KRAS signalling.** *Nature*, 638-642.

