



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

UNIDAD ZACATENCO

**Departamento de
Biomedicina Molecular**

Estudio de la especificidad y de las propiedades terapéuticas
del compuesto C19 en modelos pre-clínicos de cáncer
colorrectal.

T E S I S

Que presenta

M. en C. Pedro Cruz Nova

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOMEDICINA MOLECULAR**

Director de la tesis:

Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía

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 del
Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía

y en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos (LANIDER) (Proyecto AS-001), bajo la asesoría de la Dra. Blanca Elí Ocampo García.

Con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Beca otorgada para estudios de doctorado No. 455446.

Y del Instituto de seguridad y servicios sociales de los trabajadores del estado (ISSSTE) con el proyecto “Identificación de nuevas alternativas farmacológicas para el tratamiento del cáncer pancreático y su evaluación preclínica” No. 002.2015.

“La pérdida no es más que cambio y el cambio es un placer de la naturaleza”.

–Marco Aurelio.

Tutor:

Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía

Dpto. Biomedicina molecular

CINVESTAV-IPN

Comité:

Asesores internos del Dpto. de Biomedicina Molecular, Cinvestav I.P.N.

- ◆ Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda
- ◆ Dra. Rosaura Hernández Rivas
- ◆ Dra. Ma. Teresa Estrada García

Asesores externos:

- ◆ Dra. Blanca Elí Ocampo García

Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.

- ◆ Dra. María del Rocío Thomson Bonilla

Laboratorio de Medicina Genómica, Hospital Regional 1° de Octubre, ISSSTE

- ◆ Dr. Arturo Rojo Domínguez

Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa.

Contenido

Lista de abreviaciones:	8
Lista de figuras:	10
Lista de tablas:.....	14
Resumen.	15
Abstract:	17
1.- Marco teórico:.....	19
1.1.- Relevancia del cáncer colorrectal.....	19
1.2.- Terapia contra el cáncer colorrectal.	21
1.3.- Desarrollo del cáncer colorrectal.	22
1.3.1.- Desarrollo a nivel molecular.	23
1.4 Progresión del cáncer colorrectal.	24
1.4.1.- Promoción de la proliferación.	25
1.4.2.- Metabolismo aberrante.....	28
1.5.- Efecto de las mutaciones en RAS	29
1.5.1.- Mutaciones de KRAS y su papel en el cáncer colorrectal.....	31
1.5.2.- Modificaciones postraduccionales de KRAS.....	32
1.5.3.- Transporte de KRAS	33
2.- Antecedentes.....	37
3.- Justificación:	40
4.- Hipótesis:.....	40
5.- Objetivo general:	41
6.- Objetivos particulares	41
7.- Materiales y métodos:.....	42
7.1 Simulaciones <i>in silico</i> : <i>Docking</i>	42
7.2. Simulación de dinámica molecular.	42
7.3. Cálculo de las energías libres de unión.	44
7.4. Líneas celulares.	44
7.5. Evaluación de la viabilidad celular y cálculo de IC ₅₀	45
7.6. Ensayo clonogénico.	46
7.7. Determinación del tipo de muerte celular por citometría de flujo.....	46
7.8. Ensayo de activación de RAS.	47
7.9. Simulación docking <i>in silico</i> I-C19.	48
7.10. Marcaje del compuesto I-C19 con ¹³¹ I por intercambio isotópico.	48

7.11. Purificación por extracción en fase sólida del compuesto I-C19 marcado con ¹³¹ I.	49
7.12. Segunda purificación del compuesto ¹³¹ I-C19 mediante HPLC de fase reversa...	49
7.13. Determinación de la pureza radioquímica por HPLC.	49
7.14. Captación e internalización.	50
7.15. Citotoxicidad del compuesto [¹³¹ I] I-C19 en líneas celulares de cáncer colorrectal.	50
7.16. Inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-H2AX γ	51
7.17. Dosis de radiación absorbida en el núcleo de las células de cáncer.	51
7.18. Modelo xenográfico: Inyección subcutánea y pruebas pre-clínicas.	52
7.19. Modelo murino de cáncer colorrectal <i>in situ</i> .	52
7.20. Western Blot.	53
7.21. Inmunohistoquímica.	54
7.22. Ensayo de TUNEL.	54
7.23. Ensayo de genotoxicidad.	55
7.24. Biodistribución.	55
7.25. Modelo biocinético y estimación de la dosis absorbida de radiación.	56
8.- Resultados.	57
8.1.- C19 se une y estabiliza al complejo KRAS4b-PDE δ .	57
8.2.- C19 presenta actividad citotóxica específica en células de cáncer colorrectal KRAS4b-dependientes.	61
8.3. C19 induce apoptosis.	63
8.4.- El tratamiento con C19 reduce la señalización dependiente de KRAS.	66
8.5.- El tratamiento con C19 inhibe el crecimiento tumoral de células LoVo xenotransplantadas.	68
8.6.- C19 reduce la fosforilación de Akt y Erk <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	71
8.7.- Simulación docking <i>in silico</i> del análogo yodado del compuesto C19: I-C19.	72
8.8.- Estudios de citotoxicidad <i>in vitro</i> del análogo yodado I-C19.	75
8.9.- Captación celular y dosis absorbida de radiación del compuesto [¹³¹ I]I-C19.	77
8.10.- Ensayo γ -H2AX: detección del rompimiento de la doble cadena del DNA.	79
8.11.- Pull down GTP-RAS y arreglo de fosfo-cinasas.	82
8.12.- I-C19 inhibe el crecimiento tumoral <i>in vivo</i> .	85
8.13.- Biodistribución.	89
8.14.- Ensayo de micronúcleos.	91
9.- Discusión.	93
10.- Conclusión.	104

11.- Perspectivas.....	104
Referencias	105

Lista de abreviaciones:

KRAS: Kirsten Rat Sarcoma

PDEδ: Fosfodiesterasa 6δ

MMGBSA: Modelo Generalizado de Aproximación y Accesibilidad de Solventes

Erk: Extracellular Signal-Regulated Kinase

Akt: Protein Kinase B

ADN: Ácido Desoxiribonucleico

5-FU: 5-fluorouracilo

FOLFOX: Fluorouracil, Leucovorin y Oxaliplatin

FOLFIRI: Fluorouracilo, Leucovorin e Irinotecan

FDA: Food and Drug Administration

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

RTKs: Receptors Tyrosine-Kinases

FAP: Poliposis Adenomatosa Familiar

HNPCC: Cáncer Colorrectal Hereditario Sin Poliposis

APC: Adenomatosis Poliposis Coli

WNT: Wingless and Int-1

MYC: Myelocytomatosis

CIN: Inestabilidad Cromosómica

NRAS: Neuroblastoma Rat Sarcoma Oncogene Homolog

HRAS: Harvey Rat Sarcoma Oncogene Homolog

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinases

RAF: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

TCA: Ciclo de los Ácidos Tricarboxilicos

GOT1: Transaminasa 1 Glutámico-Oxaloacético

KEAP1: Proteína Asociada a ECH tipo Kelch 1

GDP: Guanosin Difosfato

GTP: Guanosin Trifosfato

GAP: Proteína Activadora de la GTPasa
YAP1: Proteína 1 Asociada a Yes
PI3K: Phosphoinositol 3 kinase
FTasa: Farnesiltransferasa
RCE1: Enzima Convertidora de RAS
ICMT1: Isoprenilcistein Carboximetiltransferasa 1
HVR: Región Hipervariable
ARL2: ADP Ribosylation Factor Like GTPase 2
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
PARP: poli-(ADP-ribosa)-polimerasa
c-PARP: poli-(ADP-ribosa)-polimerasa escindida
PI: Ioduro de Propidio
PCNA: Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
ns: nanosegundos
AOM: Azoximetano
DSS: Dextrán Sulfato Sódico
CP: Ciclofosfamida

Lista de figuras:

Figura 1.- Los gráficos de pastel presentan la distribución de casos y muertes de los 10 tipos de cáncer más comunes en 2018 para ambos sexos (GLOBOCAN 2018).

Figura 2.- Modelo actual para la función de APC en la señalización de WNT. **A.** APC funcional ayuda a atacar y fosforilar a β -Catenina para su destrucción. **B.** La pérdida de APC conduce a la acumulación de β -Catenina y con esto, a la transcripción de sus genes de respuesta a WNT (Nasser & Mark, 2008).

Figura 3.- El efecto de RAS en la proliferación. Modificado de Pylayeva-Gupta et al, 2011.

Figura 4.- **A.** Dominio catalítico de RAS. El lóbulo efector se representa en verde y el lóbulo alostérico en gris. Los residuos que no son idénticos en las tres isoformas están en rojo y se encuentran completamente en el lóbulo alostérico. Los residuos 12, 13 y 61 se muestran en amarillo y GppNHp está en naranja. **B.** El interruptor alostérico muestra algunos de los residuos involucrados. El estado alostérico en el que el interruptor II está desordenado se encuentra en amarillo (código PDB 2RGE). **C.** Sitio activo en el complejo RAS/RAS-GAP (Código PDB 1WQ1). Los residuos de GAP se muestran en amarillo con el dedo de arginina en la barra. Los residuos de RAS están en verde, incluido el GTP con sus grupos fosfato en naranja. **D.** Sitio activo para la hidrólisis intrínseca en RAS. La proteína sin mutaciones se muestra en amarillo (código PDB 3K8Y), la mutación G12V en magenta (código PDB 3OIW), G12D en cian (código PDB 1AGP) y Q61L en verde (código PDB 3OIU) (Prior et al. 2012).

Figura 5.- Modificaciones postraduccionales de KRAS (Chen et al. 2019).

Figura 6.- Estructura del complejo KRAS4b-PDE δ en dos formas cristalizadas diferentes. **A.** Diagrama de Ribbon de KRAS4b-FMe (farnesilado y metilado) unido a GDP en complejo con PDE δ en la forma cristal I. **B.** Diagrama de Ribbon de KRAS4b-FMe unido a GDP en complejo con PDE δ en la forma cristal II. La PDE δ , dominio de GTPasa, y la HVR de KRAS4b se muestran en verde, cian y rojo, respectivamente. La cadena del farnesilo se muestra como esferas y de color amarillo. Los átomos de carbono y oxígeno del grupo carboximetil son de color magenta y rojo, respectivamente. El GDP se muestra como bastones y de color amarillo (carbono) y rojo (oxígeno) (Dharmaia et al, 2016).

Figura 7.- Interacción de los ligandos que estabilizan el complejo molecular KRAS4b-PDE δ *in silico*. La superficie de interacción interproteína marcada con color gris se utilizó para el acoplamiento del docking, esta región es la que presenta mayor contacto entre la GTPasa KRAS4b (rosa y amarillo) y PDE δ (azul). Los compuestos D14 (negro) y C22 (agua) fueron identificados en los mismos sitios de interacción interproteína (Tomado de Casique & Briseño et al, 2018). (Molecular Operating Environment MOE, 2014.09).

Figura 8.- El compuesto C19 se une y estabiliza al cristal del complejo KRAS4b-PDE δ . **A** Conformación más probable durante el tiempo de simulación en equilibrio. Superposición estructural de KRAS4b cristalizado (en rojo) en complejo con PDE δ

(en verde) interaccionando con C19 (en azul). **B** Interacciones de C19 en el complejo KRAS4b-PDEδ. Los aminoácidos que interactúan con C19 están resaltados.

Figura 9.- Conformación número 1 del complejo KRAS4b-PDEδ-C19. **A**. Primera conformación del complejo KRAS4b-PDEδ-C19 donde se puede observar que el compuesto C19 está extendido, interactuando con ambas proteínas por la formación de seis enlaces con PDEδ y cinco con KRAS4b. **B**. Interacciones del complejo proteína-ligando con C19 en la primera conformación de la simulación DM.

Figura 10.- C19 inhibe el crecimiento de células de cáncer colorrectal humano, principalmente de células dependientes de KRAS **A**. Las líneas celulares de cáncer colorrectal HCT116, LoVo y la línea celular de colon normal CCD-18Co fueron tratadas con las concentraciones indicadas de C19 por 72 h. Los valores de IC₅₀ de las células HCT116, LoVo y CCD-18Co fueron 103.03, 22.7 y 60.8 μM, respectivamente. **B**. El tratamiento con C19 a la concentración de 10 μM reduce significativamente la viabilidad de la línea celular LoVo. *p<0.01. **C**. Las células fueron tratadas con el vehículo (DMSO), el IC₅₀ de C19 y el IC₈₅ de 5-Fu en el ensayo clonogénico y teñidas con cristal violeta. Se muestra la placa representativa de tres experimentos independientes. **D**. Cuantificación de la tinción de cristal violeta de las células presentadas en (C). n= 3; ***p < 0.0001.

Figura 11.- C19 induce muerte celular por apoptosis en células de cáncer colorrectal. **A**. Las células fueron tratadas con el IC₅₀ de C19 por 24, 48 y 72 h y los lisados celulares fueron analizados para PARP escindida y β-actina como control de carga. Se muestran los blots representativos de tres experimentos independientes. **B**. Análisis densitométrico de c-PARP normalizado con los niveles de PARP total en las células HCT116 y LoVo tratadas con C19 por 72 h. Las barras de error representan el SEM. *p < 0.01 **C**. Análisis de anexina V y PI de las células HCT116 y LoVo tratadas con la concentración IC₅₀ de C19 o vehículo solo por 72 h. El tratamiento con C19 incrementa significativamente los porcentajes de células de cáncer LoVo en apoptosis temprana (anexina V+ PI-) y tardía (anexina V+ PI+).

Figura 12.- C19 promueve la muerte celular por apoptosis en un pequeño porcentaje de células de la línea celular de colon normal e incrementa la fosforilación de Erk y Akt. **A**. Marcaje con anexina V y PI de la línea celular normal CCD-18Co tratada con 22.7 μM de C19 o con el vehículo solo por 72 h. El tratamiento con C19 incrementa poco el número de células en apoptosis temprana (anexina V+ PI-) y tardía (anexina V+ PI+). **B**. Perfil de proteínas fosforiladas de células CCD-18Co tratadas con el vehículo (panel superior) y con C19 a una concentración de 22.7 μM (panel inferior) por 24 h. Lisados totales de células, de la línea celular de colon normal. Después del tratamiento fueron incubadas en membranas del kit de proteínas fosforiladas Phospho-MAPK como se describe en los métodos. **C**. Cuantificación de la intensidad de los pixeles de la señal en duplicado de cada membrana. Los datos son representados como porcentaje del control positivo (set a 100%).

Figura 13.- Efecto del tratamiento de C19 en la activación de RAS y la fosforilación de proteínas de la vía MAPK. **A**. Imagen representativa de western blot de las líneas celulares HCT116 y LoVo tratadas con el vehículo y con C19 (n=3). La extracción

de proteína total se puso a interactuar con perlas RAF-RBD. La membrana fue incubada con el anticuerpo anti pan-RAS, para confirmar el pull down de RAS activo. Los extractos totales fueron probados con los anticuerpos como se indica y se muestra el análisis densitométrico en unidades arbitrarias. * $p < 0.01$ (panel inferior). **B, C** Perfil de proteínas fosforiladas de HCT116 (**B**) y de LoVo (**C**) tratadas con el vehículo (panel superior) y con la concentración de IC₅₀ de C19 (panel inferior) por 24 h. Después del tratamiento, los lisados totales de las líneas celulares de cáncer se incubaron con las membranas del kit de proteínas fosforiladas humanas Phospho-MAPK descrito en los métodos. Se muestra la cuantificación de las intensidades de los pixeles de las señales por duplicado de una membrana. Los datos se muestran como porcentaje del control (set a 100%).

Figura 14.- El tratamiento con C19 reduce el crecimiento tumoral *in vivo*. **A.** El tratamiento con C19 vía intraperitoneal (i.p.) a 15 mg/kg y 30 mg/kg (n = 6) diario, durante 12 días, reduce el crecimiento tumoral en un modelo xenográfico de cáncer colorrectal después de la inyección de células LoVo. Se muestra el porcentaje de la media de los cambios en el volumen relativo final del tumor al volumen inicial. Las barras de error representan el SEM. **B.** Distribución del volumen tumoral después de 12 días de tratamiento con el vehículo o con C19. n = 6 ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$ (panel superior). Observación general de los tumores al final del experimento (panel inferior) (**C**) Peso de los ratones medido diariamente durante el tratamiento. C19 en ambas concentraciones probadas, no disminuyó el peso de los ratones comparado con el tratamiento con vehículo. Los datos representan la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

Figura 15.- El tratamiento con C19 inhibe la proliferación celular *in vivo*. **A.** Los tejidos tumorales de los modelos xenográficos fueron evaluados por inmunohistoquímica para Ki67 (como marcador de proliferación). **B.** El gráfico muestra las intensidades de las señales de las células positivas calculado con el software Image Pro Plus. n = 3 * $p < 0.05$. **C.** Los lisados de los tumores fueron analizados por western blot para los niveles de expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). El análisis densitométrico se realizó con Image Lab 4.0.

Figura 16.- Tinción de TUNEL de los tumores xenográficos. **A.** Las células apoptóticas y los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). **B.** Las unidades relativas de fluorescencia (RFU) de células apoptóticas (verde) se calcularon con el software Image Pro Plus. n = 4 * $p < 0.01$. Las barras de error representan el SEM. Barra de escala = 50 μ M.

Figura 17.- C19 inhibe la fosforilación de Erk y Akt *in vitro* e *in vivo*. **A.** Los lisados de las líneas celulares HCT116 y LoVo y (**B**) de los tumores fueron analizados por western blot para los niveles de fosforilación de Erk (p-Erk) y Akt (p-Akt). Erk total, Akt total y β -actina se utilizaron como control de carga. Se muestran los blots representativos de tres experimentos independientes.

Figura 18.- **A.** Conformación más frecuente de I-C19 (azul) en el complejo KRAS4b-PDE δ (rojo-verde) durante la simulación MD. **B.** I-C19 presenta dos interacciones con PDE δ y seis con KRAS4b.

Figura 19.- Curva dosis-respuesta del compuesto I-C19 en la línea celular CCD-18Co de miofibroplastos de colon sano.

Figura 20.- **A.** Las líneas celulares de cáncer colorrectal HCT116, **B.** LoVo y **C.** SW620 fueron tratadas con las concentraciones indicadas de I-C19 por 72 h. **D.** El tratamiento con ^{131}I -C19 a una concentración de 1.8 μM reduce significativamente la viabilidad de las tres líneas celulares de cáncer colorrectal en comparación con I-C19 sin marcaje radiactivo. **E.** Experimentos de captación con ^{131}I -C19. Después de la incubación por 1 y 3 h, la captación de ^{131}I -C19 por células de cáncer se incrementó significativamente. $n=3$; **** $p < 0.0001$.

Figura 21.- Cromatograma de radio-HPLC de fase reversa del radiofármaco ^{131}I -C19. Esquema general de I-C19 marcado con ^{131}I (superior derecha).

Figura 22.- **A.** Imágenes representativas de microscopía confocal, mostrando los focos de γ -H2AX en el núcleo (DAPI) de células de cáncer colorrectal tratadas con el vehículo, IC_{50} de I-C19 y ^{131}I -C19 (un décimo de la concentración del IC_{50} para cada línea celular) por tres horas. **B.** Focos relativos de γ -H2AX de células de cáncer tratadas con I-C19, ^{131}I -C19, y células control. Los datos están representados como la media \pm SEM de tres experimentos independientes * $p < 0.1$, **** $p < 0.0001$.

Figura 23.- **A.** Ensayo de pull down RAS-GTP en tres líneas celulares de cáncer colorrectal tratadas con el vehículo y con el IC_{50} de I-C19 por 24 h. Ras total y β -actina se utilizaron como control de carga (blots cortados). Arreglo de cinasas fosforiladas de los extractos de proteína total de las líneas celulares de cáncer colorrectal **B.** HCT116, **C.** LoVo y **D.** SW620 tratadas con el IC_{50} de I-C19 por 24 h. Densidad de los píxeles (% sobre el control).

Figura 24.- **A.** Efecto del tratamiento con I-C19 en el crecimiento tumoral en ratones tratados con AOM/DSS. Porcentaje de adenocarcinomas colorrectales en los ratones. Los ratones fueron tratados con C19 (30 mg/kg) o I-C19 (30 mg/kg) vía intraperitoneal todos los días por 12 días. **B.** Porcentaje del peso de los ratones tratados con AOM/DSS, medido cada día durante el tratamiento. **C.** Imágenes representativas del marcaje de IHQ para CEA y Ki67 en los tejidos colorrectales.

Figura 25.- **A.** I-C19 fue administrado todos los días durante 12 días a una concentración de 30 mg/kg. El volumen tumoral fue medido diario y se estimó con la fórmula ($V = \frac{1}{2} \times D \times d^2$), *** $p < 0.001$. **B.** Imágenes representativas del volumen tumoral después de la disección. **C.** Porcentaje del peso corporal de los ratones medido cada día durante el tratamiento. **D.** Imágenes representativas del marcaje de IMQ para CEA, Ki67 y casapasa 3 escindida en los tejidos tumorales xenográficos. **E.** Los gráficos muestran el porcentaje de tejido neoplásico positivo a la tinción, * $p < 0.1$.

Figura 26.- Distribución en los órganos expresado como %ID/g de tejido a la 1, 3 y 24 h pos-inyección (^{131}I -C19). El perfil de distribución de los órganos muestra que la captación de ^{131}I -C19 en hígado, riñones y tumor, indica la funcionalidad y especificidad.

Figura 27.- **A.** Imágenes representativas de células de médula ósea de ratones después de 24 h de una inyección única de 15 mg/kg de 5-FU y 30 mg/kg de C19 e I-C19. Las flechas muestran los eritrocitos policromáticos (PCEs), micronúcleos de eritrocitos policromáticos (MNPCE) y eritrocitos normocromático (NCE). **B.** Valores del conteo de micronúcleos de células de medula ósea. Se presentan los datos como media \pm SEM de cuatro experimentos independientes **** $p < 0.0001$, no-significativo (n.s.).

Figura 28.- Representación esquemática del efecto de C19 en la activación y señalización de KRAS4b oncogénico. C19 reduce significativamente la proliferación celular por la inhibición de las vías de Erk y p38, e induce la apoptosis por la inhibición de la activación de Akt.

Lista de tablas:

Tabla 1. Características del compuesto C19.

Tabla 2.- Resultados de la simulación de DM del sitio más probable del compuesto C19 en el complejo KRAS4b-PDE δ .

Tabla 3.- Energía libre de unión de los componentes de los complejos proteína-ligando (en unidades de kcal/mol).

Tabla 4.- Componentes de la energía libre de unión de los complejos proteína-ligando (kcal/mol).

Tabla 5.- Dosis de radiación absorbida producida por Bq/célula de ^{131}I -C19 en el núcleo de las células de cáncer HCT116, LoVo y SW620.

Tabla 6.- Modelo biocinético y dosis absorbida de radiación producida por MBq de ^{131}I -C19 a órganos específicos y tumor (administración intraperitoneal).

Resumen.

El cáncer colorrectal es el tercer tipo de cáncer más común en el mundo; en México hay una tendencia al alza en la tasa de mortalidad por cáncer colorrectal en las últimas tres décadas. En el 40% de todos los casos de cáncer colorrectal, ocurren mutaciones activadoras en el gen KRAS. Las mutaciones activadoras de KRAS están involucradas en el desarrollo, progresión y metástasis del cáncer colorrectal. La fosfodiesterasa 6δ o PDEδ es una chaperona citoplasmática de KRAS4b, lo que permite el incremento de su localización en la membrana plasmática y posterior activación. La desregulación de PDEδ previene la redistribución y por lo tanto la activación de KRAS4b. El complejo molecular KRAS4b-PDEδ se ha reportado como un nuevo blanco para el diseño de estrategias en el tratamiento del cáncer colorrectal. En este trabajo descubrimos que la molécula C19 ((2S)-N-(2,5-diclorofenil)-2-[(3,4-dimetoxifenil) metilamino]-propanamida) y su análogo yodado, llamado I-C19, se unen y estabilizan el complejo KRAS4b-PDEδ. Para explorar la estabilidad proteína-ligando, se utilizó el ensayo de *docking*, simulación de dinámica molecular acoplada a mecanismos moleculares y el modelo generalizado de aproximación y accesibilidad de solventes (MMGBSA).

C19 e I-C19 mostraron citotoxicidad en líneas celulares de cáncer colorrectal como HCT116, LoVo y SW620, observándose un mayor efecto en las líneas celulares LoVo y SW620, dependientes de la señalización de KRAS4b. Por consiguiente, ambos compuestos disminuyeron significativamente la activación de KRAS y por lo tanto sus vías de señalización, como las vías de Erk (proliferación) y Akt (anti-

apoptosis). Se demostró el potencial terapéutico *in vivo* de las moléculas C19 e I-C19 en modelos murinos (ratones C57BL/6 y Nu/Nu para modelos de cáncer colorrectal AOM/DSS y xenoinjerto, respectivamente). Además, la dosis absorbida de radiación producida por el compuesto radiomarcado [¹³¹I] ¹³¹I-C19, promueve un daño significativo al ADN después de tres horas de tratamiento. También se obtuvo el perfil biocinético *in vivo* y se comprobó que la dosis de radiación absorbida en el tumor fue significativamente mayor que en los órganos sanos.

En conjunto, los datos presentados en esta investigación respaldan la evaluación clínica futura de los compuestos C19 e I-C19 como moléculas potenciales para el tratamiento del cáncer colorrectal con KRAS mutado. Además, proponemos a I-C19 como una nueva molécula con dos funcionalidades en un solo fármaco: la inhibición de la señalización de KRAS4b y actividad radioterapéutica contra tumores colorrectales.

Abstract:

Colorectal cancer is the third most common cancer worldwide; in Mexico, there has been an upward trend in mortality rates from colorectal cancer over the past three decades. In 40% of all cases, KRAS4b-activating mutations occur. The PDE δ or phosphodiesterase 6 δ is a cytoplasmic chaperone for KRAS4b, thus increasing its plasma membrane localization and activation. PDE δ downregulation prevents redistribution and activation of KRAS4b. Thus, targeting the KRAS4b-PDE δ complex is a treatment strategy for colorectal cancer. The molecule C19 and its iodinated analog called I-C19 bind and stabilize the KRAS4b-PDE δ complex.

Using docking and molecular dynamics simulations coupled to molecular mechanics, the generalized born model and solvent accessibility (MMGBSA) approach to explore protein-ligand stability, we found that both the compound ((2S)-N-(2,5-diclorofenil)-2-[(3,4-dimetoxifenil)metilamino]-propanamida), termed C19, and its iodinated analog ((2S)-N-(2,5-diiodofenil)-2-[(3,4-dimetoxifenil)metilamino]-propanamida), termed I-C19, bound and stabilized the KRAS4b-PDE δ complex. Subsequently, we investigated whether both compounds decrease KRAS4b activation and its effectors. Moreover, we propose the I-C19 as a novel molecule with two functionalities in a single probe: the inhibition of KRAS4b signaling and radiotherapeutic activity against colorectal tumors.

C19 and I-C19 showed high cytotoxicity in the colorectal cancer cell lines HCT, LoVo and SW620, with a stronger effect in KRAS-dependent cells (LoVo and SW620). The *in vivo* therapeutic potential of C19 and I-C19 in mouse (C57BL/6 and Nu/Nu mice for AOM/DSS and xenograft model respectively) colorectal cancer model was demonstrated. Furthermore, the radiation-absorbed dose produced by radiolabeled ¹³¹I-C19 to the colon cancer cell nucleus and the damage to DNA. The *in vivo* biokinetic profile was obtained. The radiation absorbed dose to the tumor was estimated.

Collectively, the data presented in this research supports future clinical evaluation of C19 and I-C19 as potential molecules for treatment of KRAS4b-mutant colorectal cancer.

1.- Marco teórico:

1.1.- Relevancia del cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal es uno de los tipos de cáncer más prevalentes a nivel mundial. En el año 2018, se presentaron alrededor de 1.8 millones de nuevos casos de cáncer colorrectal y 881,000 muertes; representando alrededor de 1 de cada 10 casos de cáncer y 1 de cada 10 muertes por dicha enfermedad en todo el mundo (figura 1). Las tasas de incidencia de cáncer colorrectal son aproximadamente 3 veces más altas en países desarrollados que en países en vías de desarrollo; sin embargo, presenta una letalidad promedio más alta en entornos con índices de desarrollo humano más bajo (Bray et al, 2018).

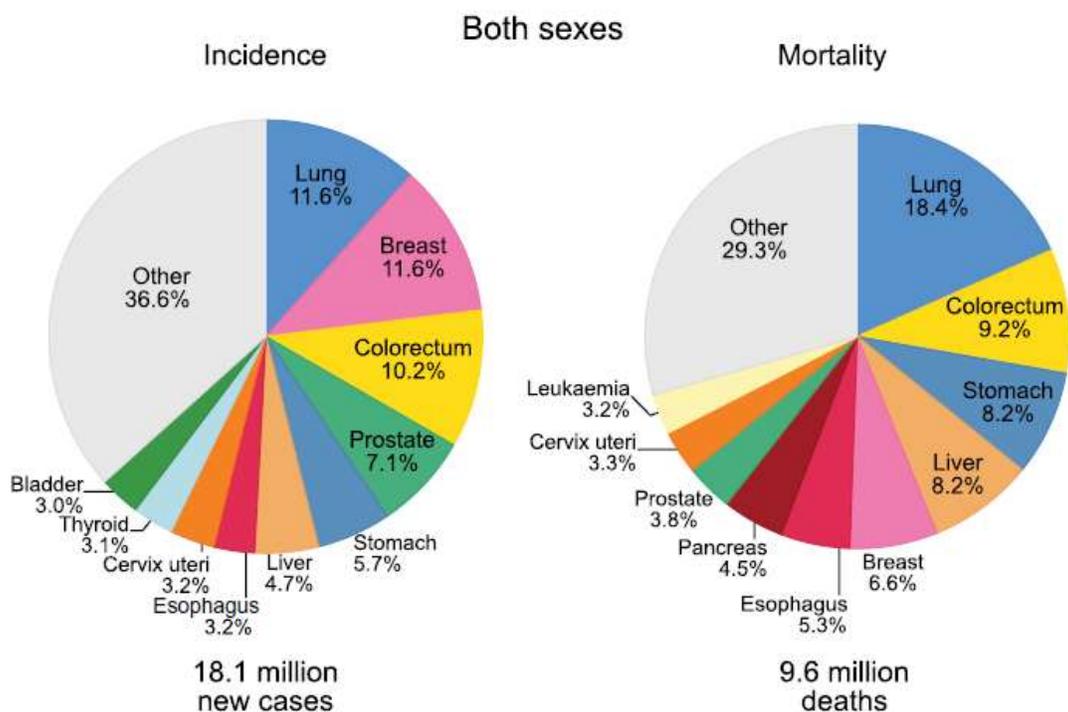


Figura 1.- Los gráficos de pastel representan la distribución de morbi-mortalidad de los 10 tipos de cáncer más comunes reportados en 2018 para ambos sexos (GLOBOCAN 2018).

México es uno de los países con índices de desarrollo humano bajos, las tendencias del cáncer colorrectal no son distintas a lo que se ha reportado a nivel mundial; del año 2000 al 2012 se presentaron en nuestro país, un total de 45,487 muertes por cáncer colorrectal, 22,316 (49.1%) fueron mujeres y 23,171 (50.9%) hombres (Sánchez-Barriga, 2017). Durante estos 12 años, la tasa de mortalidad ajustada por cáncer colorrectal se incrementó de 3.9 a 4.8 por cada 100,000 habitantes de manera proporcional a la edad. Ya que en el grupo de edad de los 10 a los 44 años, murieron 1,900 (4.2%) individuos por esta neoplasia, mientras que en el grupo de los 70 a 74 años de edad, la mortalidad alcanzó su nivel más alto, con 5,738 (12.6%) pacientes. Encontrándose que la tasa de mortalidad más alta se observó en el grupo de pacientes mayores a 81 años. Las regiones socioeconómicas con la mortalidad más alta en la República Mexicana por cáncer colorrectal fueron: la región cinco conformada por los estados de Baja California Norte y Sur, Chihuahua, Sonora y Tamaulipas y la región siete representada por la Ciudad de México. En el año 2000 y 2006, las regiones cinco y siete presentaron una tasa de mortalidad debido a este tipo de cáncer de 3.7 y 4.2, respectivamente (Sánchez-Barriga, 2017).

En suma, el cáncer colorrectal presenta una alta frecuencia tanto en México, como a nivel mundial, lo que refleja la importancia en la búsqueda de nuevas estrategias para su diagnóstico y tratamiento.

1.2.- Terapia contra el cáncer colorrectal.

Los pacientes con cáncer colorrectal a menudo son tratados con quimioterapia convencional citotóxica y otras terapias dirigidas que se han desarrollado recientemente. La quimioterapia citotóxica típicamente consiste en el uso de análogos de pirimidinas como 5-fluorouracilo (5-FU), el cual inhibe a la enzima sintasa de timidilato requerida para la síntesis de nucleótidos. Otros fármacos citotóxicos comúnmente utilizados para el tratamiento del cáncer colorrectal incluyen el irinotecan, un inhibidor de la topoisomerasa I, así como el fármaco de platino oxaliplatin y el pro-fármaco oral capecitabine (metabolizado en fluorouracilo). Los tratamientos de línea frontal involucran combinaciones de estos agentes, como Folfox (fluorouracil, leucovorin y oxaliplatin) y Folfiri (fluorouracilo, leucovorin e irinotecan), los cuales han mostrado una respuesta y sobrevida mejorada en comparación con los fármacos aplicados de manera independiente. Por otra parte, la terapia dirigida (tratamientos que tienen el objetivo de inhibir procesos en las células de cáncer relacionados con la sobrevida y proliferación) ha sido colocada en la línea frontal del tratamiento del cáncer colorrectal recientemente. Muchos fármacos han sido aprobados por la administración de fármacos y alimentos (FDA) de los Estados Unidos (EU) para el tratamiento del cáncer colorrectal, incluyendo los anticuerpos anti-factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) bevacizumab, los cuales suprimen la angiogénesis en el tumor, así como los anticuerpos anti-EGFR como el cetuximab y panitumumab, y recientemente el inhibidor multikinásas regorafenib, el cual tiene como objetivo afectar la función de los RTKs involucrados en la señalización angiogénica y mitogénica.

En los últimos años, la utilización de la terapia dirigida se ha incrementado; por ejemplo, se estima que por lo menos 44% de todos los pacientes con cáncer colorrectal tratados en EU recibieron anticuerpos anti-EGFR en 2008 (Sánchez-Barriga, 2017).

1.3.- Desarrollo del cáncer colorrectal.

Una gran cantidad de evidencias apoyan la idea de que los cambios genéticos acumulativos promueven el desarrollo de una neoplasia. Este proceso de varios pasos es muy bien ilustrado por el cáncer colorrectal, que típicamente se desarrolla a lo largo de décadas y parece ser que requiere de muchos eventos genéticos para completarse. Aun así, la herencia de un solo gen alterado puede resultar en una marcada predisposición al desarrollo del cáncer colorrectal en dos síndromes distintos, la poliposis adenomatosa familiar (FAP) y el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC) (Kinzler-Vogstein, 1996). Sin embargo, los pacientes que desarrollan cáncer colorrectal, presentan además otro tipo de factores de riesgo, como el sobrepeso u obesidad, tabaquismo, alcoholismo, envejecimiento, antecedentes familiares, etc. (American Cancer Society).

Sin embargo, la gran mayoría de los casos de cáncer colorrectal (~75%) son adenocarcinomas esporádicos, que surgen de mutaciones en las células epiteliales que recubren la pared del intestino y las cuáles están en renovación continua. La mayoría de los pólipos siguen siendo benignos, pero a lo largo de los años, algunos de ellos se vuelven progresivamente displásicos, acumulan mutaciones y progresan a carcinoma y, en última instancia, a una metástasis (Phelps et al, 2009).

1.3.1.- Desarrollo a nivel molecular.

La pérdida de la función del gen adenomatosis poliposis coli (APC) es el evento molecular inicial que conduce a la formación de los adenomas. En efecto, las mutaciones de línea germinal en el gen de APC han sido identificados como la causa del FAP; el gen APC está mutado en más del 80% de los casos de cáncer esporádico; dicha mutación impide que APC se exprese. Este gen pertenece a la vía de señalización de WNT donde interactúa con otras proteínas como AXINAS y GSK3 β para formar un complejo que promueve el secuestro y degradación de la proteína β -catenina. Las mutaciones activadoras en el gen de la β -catenina solo se han observado en alrededor del 10% de todos los casos de cáncer colorrectal. Cuando es activado, β -catenina interactúa en el núcleo con el complejo transcripcional TCF/LEF para inducir la expresión de genes que promueven la proliferación celular como MYC y ciclina D1. Algunas alteraciones genéticas y epigenéticas (KRAS, P53, etc.) siguen a este conjunto de cambios moleculares para mantener el proceso de transformación hasta las etapas de progresión y metástasis de este tipo de cáncer (Walther et al, 2008).

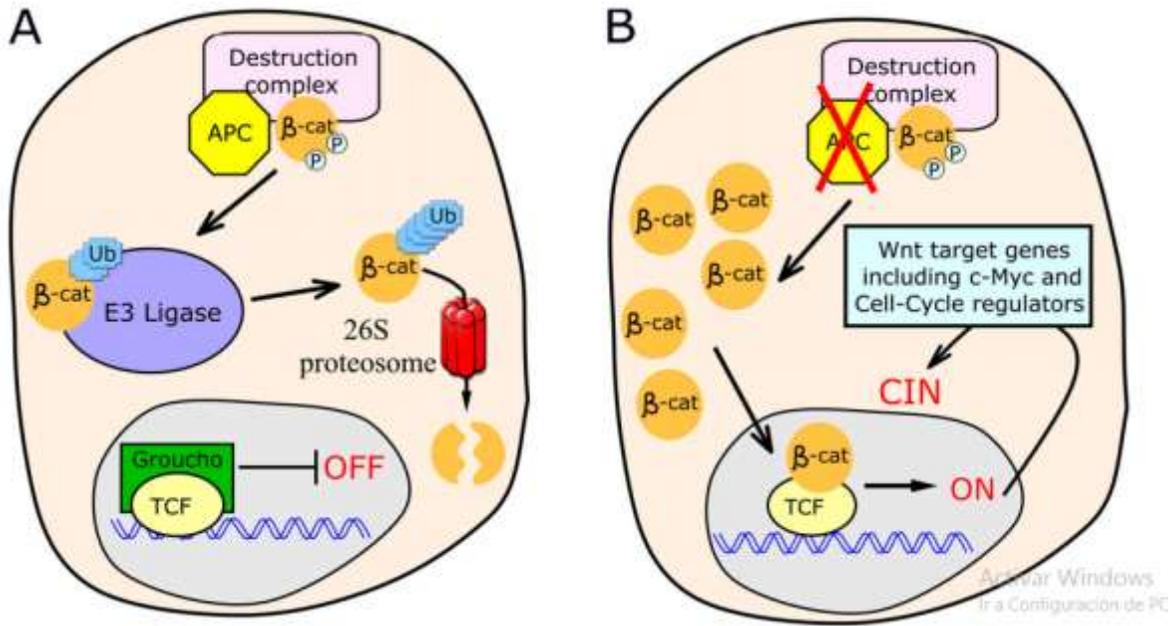


Figura 2.- Modelo actual para la función de APC en la señalización de WNT. **A.** APC funcional ayuda a atacar y fosforilar a β -Catenina para su destrucción. **B.** La pérdida de APC conduce a la acumulación de β -Catenina y con esto, a la transcripción de sus genes de respuesta a WNT (Nasser & Mark, 2008).

1.4 Progresión del cáncer colorrectal.

Las mutaciones en el gen APC ocurren tempranamente, durante el desarrollo de pólipos. Las mutaciones en el gen KRAS surgen durante la etapa adenomatosa, y las mutaciones de P53 y las deleciones en el cromosoma 18q ocurren simultáneamente con la transición a la malignidad. Esta ruta se caracteriza por pérdidas alélicas en los cromosomas 5q (APC), 7p (P53) y 18q (DCC/SMAD4) y, por lo tanto, se denomina como la ruta de la inestabilidad cromosómica (CIN). Una de las piedras angulares de la vía CIN, es el modelo representado por la FAP y también es aplicable a la carcinogénesis colorrectal esporádica (Takayama et al, 2006).

Como ya lo comenté, uno de los genes de mayor importancia en el desarrollo y progresión de cáncer colorrectal esporádico es el gen KRAS, en particular, la isoforma KRAS4b. Las mutaciones de RAS son eventos genéticos que ocurren de manera temprana en la progresión tumoral. La pérdida de la función de supresores de tumores como la proteína P53 o APC junto con la activación de RAS resulta en la formación potenciada del tumor y su progresión, lo cual es consistente con la necesidad de alteraciones genéticas que cooperen con RAS mutante para la completa transformación celular (Cox et al, 2014).

La incidencia de los genes de RAS mutados varía de manera importante entre los diferentes tipos de tumores. La incidencia más alta se encuentra en los tumores del páncreas exocrino, donde más del 80% de los tumores albergan mutaciones en el gen KRAS. En el cáncer colorrectal, la incidencia también es considerable con la mitad de los tumores con mutaciones en el gen KRAS (Karnoub-Weinberg, 2008).

La frecuencia y distribución de las mutaciones del gen RAS no son uniformes. En general, se han detectado mutaciones en RAS en el 9-30% de todas las muestras tumorales secuenciadas. KRAS es también la isoforma predominantemente mutada en el cáncer colorrectal con el 86% de los casos, mientras que las mutaciones de NRAS se encuentran en tan solo el 14% de los casos (Cox et al, 2014).

1.4.1.- Promoción de la proliferación.

La expansión continua de las células cancerosas comienza con el deterioro de los mecanismos que obligan a las células a responder apropiadamente a los factores mitogénicos y anti-mitogénicos que están presentes en el medio extracelular. Como

las proteínas RAS son factores inmediatos del estímulo mitogénico, no es sorpresa que la activación constitutiva de RAS induzca la proliferación de las células. En efecto, después de la identificación de las proteínas RAS, algunos estudios pioneros revelaron que la sobreexpresión de HRAS, una isoforma de RAS, es suficiente para promover el ciclo celular en células arrestadas en la fase G₀, en ausencia de factores de crecimiento. En el lado opuesto del balance proliferativo, RAS oncogénico puede directamente interferir con las señales anti-proliferativas por la inhibición de la señalización de TGF β . Posteriormente, las señales proliferativas generadas por RAS oncogénico culminan en la sobrerregulación de muchos factores de transcripción que son requeridos para entrar al ciclo celular y la proliferación, incluyendo FOS, SFR, JUN, ELK1, ATF2 y NF- κ B. Como consecuencia, estos factores promueven la expresión de las ciclinas G1 y D1 por la activación de las vías RAF-MAPK, PI3K-AKT-mTOR, RHO RAC1, etc. Además, RAS oncogénico puede promover la progresión del ciclo celular por la desregulación de vías de señalización de crecimiento a través de la supresión de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKIs) como p27 y p21 (Figura 2) (Pylayeva-Gupta et al, 2011).

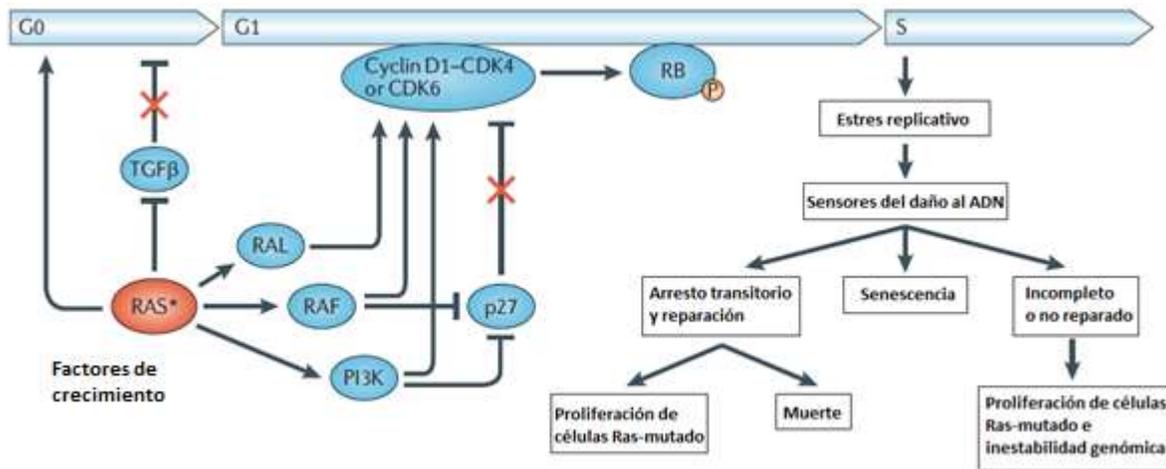


Figura 3.- El efecto de RAS en la proliferación. Modificado de Pylayeva-Gupta et al, 2011.

En efecto, una de las vías principales para la promoción de la proliferación por medio de la mutación de RAS es la vía de las MAPK. La vía de RAS-RAF-MEK-ERK es una cascada de señalización conservada en la evolución, que transmite señales de receptores de la superficie celular, que promueven la proliferación y programas de sobrevivencia. En condiciones fisiológicas, la señalización de ERK está controlada por *loops* de retroalimentación a múltiples niveles, los cuales son esenciales para mantener regulado el crecimiento celular y la homeostasis. RAS activo recluta a RAF a la membrana y promueve la dimerización y activación de RAF. RAF activado fosforila y activa a la cinasa MEK, que a su vez fosforila y activa a la cinasa de ERK. ERK activado fosforila a numerosos sustratos, incluidas otras cinasas y factores de transcripción, los cuales ejecutan programas relacionados con la progresión del ciclo celular, diferenciación, traducción de proteínas y evasión de la muerte celular (Poulikos et al, 2014).

1.4.2.- Metabolismo aberrante.

La alteración en la regulación del metabolismo es una de las características más importantes del cáncer, y la señalización de RAS apoya el inicio, mantenimiento y progresión del cáncer, a través de la activación alterada de las vías metabólicas. La señalización de RAS promueve el metabolismo oncogénico por la coordinación de numerosos procesos metabólicos incluyendo lípidos, nucleótidos y vías glicolíticas. Específicamente, la señalización de RAS apoya la necesidad bioenergética celular y potencia la captación de glucosa a través de la inducción del transportador de glucosa GLUT1, promoviendo la supervivencia en condiciones de pocos nutrientes e incrementando el metabolismo glicolítico. Esta glucosa se desvía del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y apoya el metabolismo glicolítico, glicosilación de proteínas y el metabolismo de nucleótidos a través de la vía de las pentosas fosfato. Las células también activan de manera aberrante el metabolismo de la glutamina y la vía biosintética de la fosfoserina a través de la regulación positiva de enzimas biosintéticas en estas vías. KRAS redirecciona la utilización de la glutamina para apoyar el balance *redox* celular a través de la regulación transcripcional de la enzima GOT1 (transaminasa 1 glutámico-oxaloacético) y crea dependencia al metabolismo de la glutamina. La co-mutación de KRAS con la pérdida de KEAP1 (proteína asociada a ECH tipo Kelch 1) también extiende el fenotipo glicolítico, dependencia de la glutamina y sensibilidad a los inhibidores de la glutaminasa. La señalización de RAS actúa como apoyo a la biosíntesis de nucleótidos vía la activación de MYC. RAS activa la señalización de MAPK (proteínas cinasas

activadas por mitógenos), las cuales inducen MYC y conducen al metabolismo de nucleótidos a través de la vía de las pentosas fosfato (Xiuxing et al, 2019).

Como se ha mencionado, RAS es una de las proteínas más importantes en el desarrollo y progresión del cáncer colorrectal, a través de la señalización aberrante de la proliferación, metabolismo celular, entre otras. Para ostentar dicha situación, RAS funciona como un *switch* o interruptor molecular, apagándose y prendiéndose por medio de su unión al GDP y GTP respectivamente.

1.5.- Efecto de las mutaciones en RAS

La activación de RAS en respuesta a la carga de GTP implica grandes cambios conformacionales en los interruptores I (unión a GDP) y II (unión a GTP), así como la reorientación con respecto a la membrana, que promueven la unión de las proteínas efectoras. El dominio catalítico de las proteínas RAS consta de dos lóbulos con una interfaz que incluye el interruptor II en el lóbulo N-terminal (residuos 1-86) y la hélice 3 en el lóbulo C-terminal (residuos 87-171). El primero puede considerarse como el lóbulo efector, ya que contiene todos los componentes de RAS que interactúan con los efectores. El segundo es el lóbulo alostérico que interactúa con la membrana y contiene todas las diferencias específicas de las isoformas fuera de la región hipervariable (HVR). Dada la lenta tasa de hidrólisis intrínseca medida *in vitro* para RAS, la desactivación de la señal depende críticamente del aumento de la actividad de GTPasa por la Proteína Activadora de la GTPasa (GAP) o por otro mecanismo como el interruptor alostérico recientemente identificado, asociado con la vía de RAS/RAF/MEK/ERK (Figura 4). En el último caso, un desplazamiento en la hélice 3/*loop7* fuera del interruptor II está asociado

con una transición del desorden al orden, que lleva el residuo catalítico Q61 al sitio activo tras la unión de un grupo ácido, muy probablemente un componente de membrana, en un sitio alostérico remoto. La capacidad deteriorada de las mutantes de RAS para hidrolizar GTP, ya sea intrínsecamente o en respuesta a GAP, es responsable de la naturaleza oncogénica de las mutaciones en los residuos G12, G13 y Q61 en el sitio activo (Prior et al, 2012).

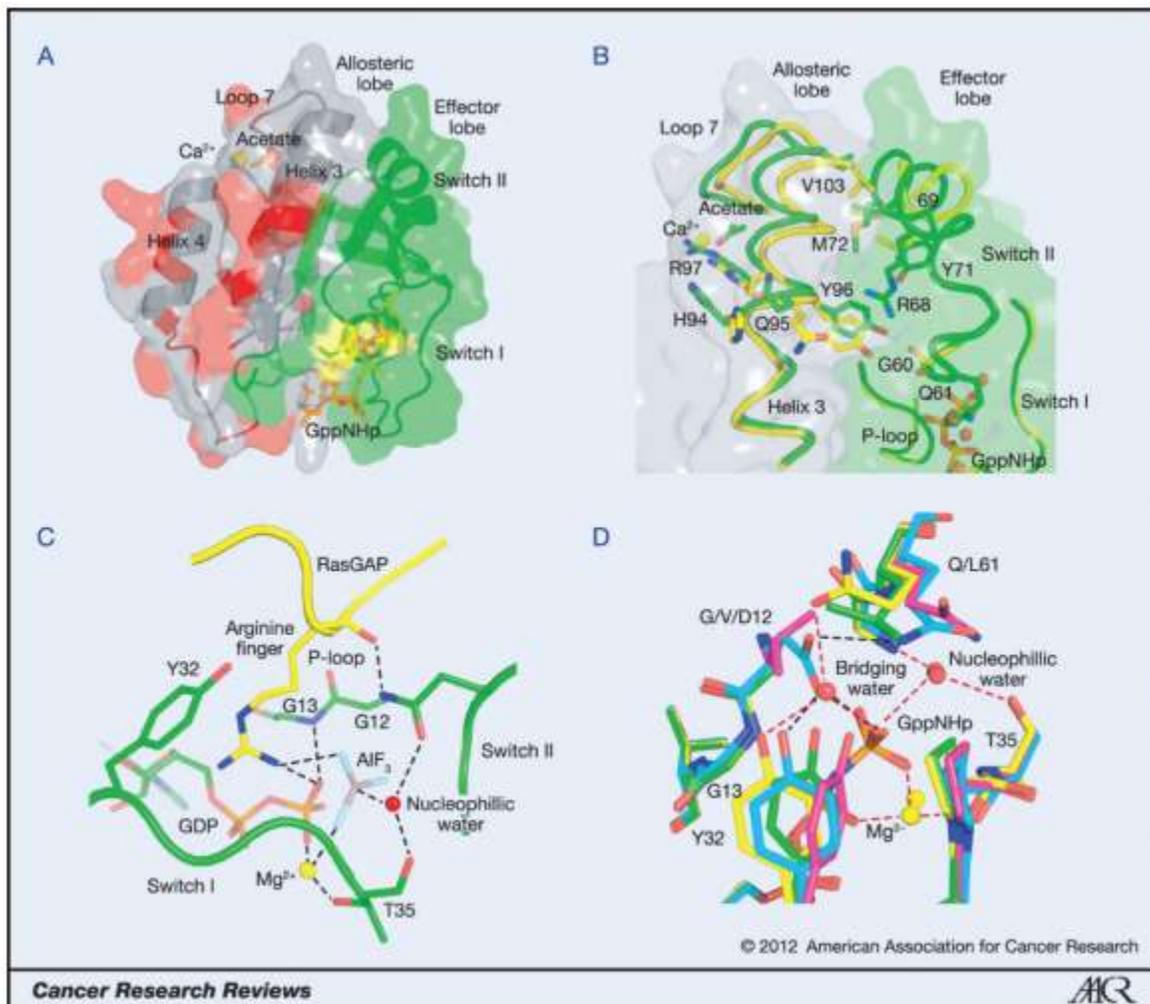


Figura 4.- **A**. Dominio catalítico de RAS. El lóbulo efector se representa en verde y el lóbulo alostérico en gris. Los residuos que no son idénticos en las tres isoformas

están en rojo y se encuentran completamente en el lóbulo alostérico. Los residuos 12, 13 y 61 se muestran en amarillo y GppNHp está en naranja. **B.** El interruptor alostérico muestra algunos de los residuos involucrados. El estado alostérico en el que el interruptor II está desordenado se observa en amarillo (código PDB 2RGE). **C.** Sitio activo en el complejo RAS/RAS-GAP (Código PDB 1WQ1). Los residuos de GAP se muestran en amarillo con el dedo de arginina en la barra. Los residuos de RAS están en verde, incluido el GTP con sus grupos fosfato en naranja. **D.** Sitio activo para la hidrólisis intrínseca en RAS. La proteína sin mutaciones se muestra en amarillo (código PDB 3K8Y), la mutación G12V en magenta (código PDB 3OIW), G12D en cian (código PDB 1AGP) y Q61L en verde (código PDB 3OIU) (Prior et al. 2012).

1.5.1.- Mutaciones de KRAS y su papel en el cáncer colorrectal.

La gran mayoría de las mutaciones de KRAS se encuentran en los codones 12 y 13, y el resto en los codones 61, 146 y otros residuos. Si bien las mutaciones de los codones 12 y 13 de KRAS no interfieren con su capacidad de asociarse con GAP, alteran la posición de un residuo de glutamato catalítico en el codón 61. Esto da como resultado una actividad reducida de GTPasa de KRAS y una tasa disminuida de hidrólisis de GTP de 3 a 9 veces en comparación con KRAS no mutada (WT). Mediante el uso de líneas celulares de cáncer colorrectal knock-out y knockin isogénicas con KRAS WT o con KRAS mutado, se ha demostrado en estudios recientes que estas mutaciones juegan un papel importante en la supervivencia de las células tumorales y la progresión tumoral. Las consecuencias funcionales de las mutaciones de KRAS incluyen el aumento de la proliferación celular, la supresión de la apoptosis, el metabolismo celular alterado y los cambios en el microambiente tumoral. Por ejemplo, KRAS unido a GTP permite la regulación positiva de factores de crecimiento y factores de transcripción conocidos por promover la progresión del ciclo celular, como c-JUN y c-FOS. Un estudio reciente identificó al coactivador transcripcional de la proteína 1 asociada a Yes (YAP1) como un mediador clave del

efecto oncogénico de KRAS. Desde un punto de vista terapéutico, la supresión de la apoptosis es probablemente una de las consecuencias más importantes de las mutaciones de KRAS. KRAS activado puede inhibir la cascada de señalización apoptótica a través de su efector PI3K, que a su vez activa Akt, una potente quinasa pro-supervivencia que inhibe la apoptosis a través de varios mecanismos, como la fosforilación y la posterior inactivación de la proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2 BAD, y la fosforilación del iniciador de la cascada apoptótica caspasa-9 (Knickelbein-Zhang, 2015).

En efecto, la señalización de las proteínas RAS mutadas, en específico la isoforma KRAS, promueven la señalización aberrante en el cáncer colorrectal, lo que a su vez origina la proliferación celular sostenida. Sin embargo, la proteína KRAS es funcionalmente inactiva después de ser traducida (Ye et al, 2019).

1.5.2.- Modificaciones postraduccionales de KRAS

KRAS es modificada postraduccionalmente y estas PTMs hacen que esta proteína que inicialmente es hidrofílica (inactiva) se convierta en una proteína lipofílica. KRAS es sujeta a múltiples modificaciones postraduccionales, incluyendo prenilación, proteólisis, carboximetilación, etc (Figura 5). Primero, la enzima citosólica, farnesiltransferasa (FTasa), modifica la cisteína terminal de KRAS en el retículo endoplásmico. La enzima convertidora de RAS (RCE1), escinde los últimos tres aminoácidos de KRAS. Con ayuda de otra enzima del retículo endoplásmico llamada isoprenilcistein carboximetiltransferasa 1 (ICMT1), el grupo carboxi de la cisteína terminal es modificada. Como resultado, KRAS puede ser anclada tanto a endomembranas, como a la membrana plasmática (Chen et al, 2019).

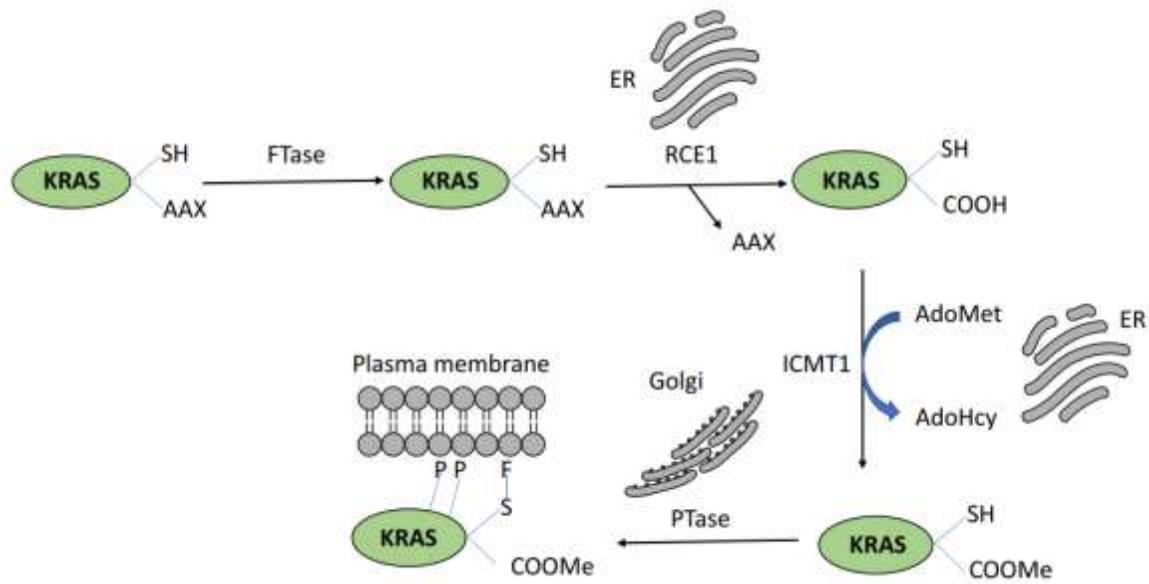


Figura 5.- Modificaciones postraduccionales de KRAS (Chen et al. 2019).

1.5.3.- Transporte de KRAS

Las modificaciones lipídicas de la familia RAS de las proteínas de unión a GTP, son esenciales para su función en un amplio rango de procesos de transducción de señales. Las proteínas de la familia RAS, como KRAS, contienen residuos polibásicos en su HVR, en vez de sus residuos palmitoilados. Para KRAS, la membrana cargada negativamente sirve para favorecer termodinámicamente la estructura de anclaje provocando su acumulación. Los factores de unión a prenil citoplásmico han sido propuestos como asistentes en el tráfico intracelular de KRAS (Chandra et al, 2011).

La subunidad delta de la fosfodiesterasa cíclica de GMP específica de células de bastón, PDE6 δ (de aquí en adelante llamada PDE δ), juega un papel clave para mantener la distribución dinámica de KRAS en la célula. PDE δ se une y solubiliza

KRAS farnesilado, mejorando significativamente su difusión en el citoplasma. Una vez en el área perinuclear, el factor de liberación Arl2 descarga KRAS farnesilado del *pocket* de unión a prenil de PDEδ. Este mecanismo da como resultado un enriquecimiento de KRAS en el área perinuclear y permite una captura efectiva de KRAS farnesilada en el endosoma de reciclaje, que restaura la localización de KRAS en la membrana plasmática mediante transporte vesicular (Martin-Gago 2017). Dharmaiah y colaboradores en el 2016 reportaron la estructura del complejo KRAS4b-PDEδ completamente procesado. Sus estudios de unión mostraron que el grupo carboximetil presente en la cisteína farnesilada 185 (C185) tiene un papel muy importante en la interacción entre KRAS4b-PDEδ. La unión débil observada en ausencia del grupo metilo es probablemente causada por el efecto de repulsión de carga del grupo ácido carboxílico y la disminución de la hidrofobicidad del C185 farnesilado. La importancia del grupo metilo en la unión de KRAS4b a PDEδ destaca la posible importancia reguladora de esta modificación en el tráfico de KRAS4b a las membranas celulares. Por lo tanto, las moléculas de KRAS4b que no están completamente procesadas (no farnesiladas o metiladas) no se unirán a PDEδ y no serán transportadas a la membrana plasmática. Por consiguiente, en el cristal del complejo KRAS4b-Far-PDEδ se aprecian dos formas cristalinas diferentes denominadas I y II. En la forma I, la unidad asimétrica contiene dos moléculas del complejo KRAS4b-PDEδ, con PDEδ interactuando con los últimos cinco aminoácidos localizados arriba del C185 farnesilado y metilado de KRAS4b (Figura 6A). En la forma cristalina II, la unidad asimétrica contiene solo una molécula del complejo KRAS4b-PDEδ, donde se puede observar la densidad electrónica de toda la HVR de KRAS4b. En esta forma cristal, la hélice C-terminal está extendida e

incluye residuos de la HVR arriba de la lisina 180 (K180), incluyendo seis residuos de lisina (175-180) presentes en la región polibásica (Figura 6B). A diferencia de la forma cristalina I, en la forma II, solo tres residuos terminales de KRAS4b ubicados río arriba de C185 metilado y farnesilado están involucrados en la formación del complejo. Mientras que, en la forma cristalina II, la mayoría de los residuos presentes en la HVR que no participan en la formación del complejo forman una estructura secundaria helicoidal (Dharmaiaha et al, 2016).

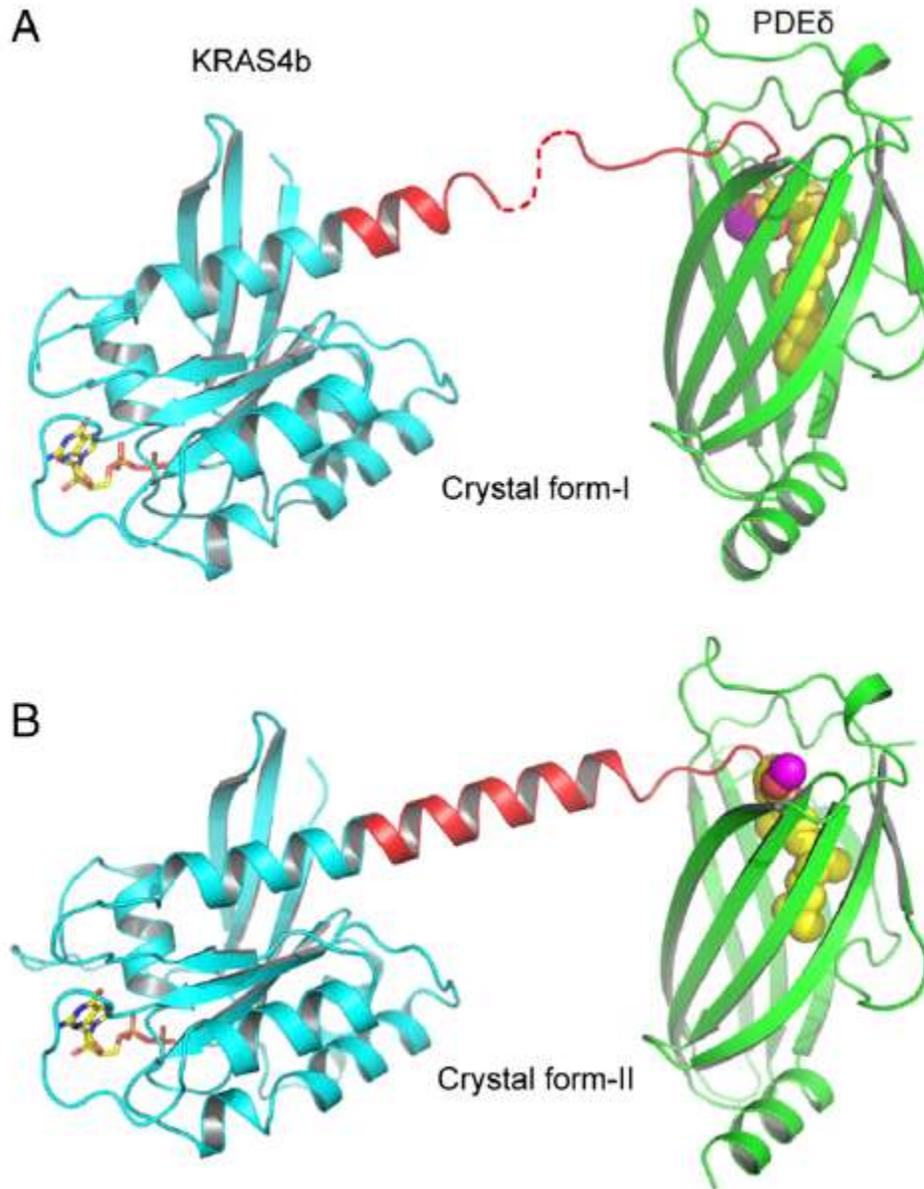


Figura 6.- Estructura del complejo KRAS4b-PDE δ en dos formas cristalizadas diferentes. **A.** Diagrama de listón de KRAS4b-FMe (farnesilado y metilado) unido a GDP en complejo con PDE δ en la forma cristal I. **B.** Diagrama de listón de KRAS4b-FMe unido a GDP en complejo con PDE δ en la forma cristal II. La PDE δ , dominio de GTPasa, y la HVR de KRAS4b se muestran en verde, cian y rojo, respectivamente. La cadena del farnesilo se muestra como esferas y de color amarillo. Los átomos de carbono y oxígeno del grupo carboximetil son de color magenta y rojo, respectivamente. El GDP se muestra como bastones y de color amarillo (carbono) y rojo (oxígeno) (Dharmaia et al, 2016).

2.- Antecedentes.

El producto del oncogén KRAS es considerado como uno de los principales objetivos terapéuticos en el descubrimiento de nuevos fármacos anticancerígenos. Sin embargo, la interferencia directa con la señalización de KRAS aún no ha conducido a un fármaco útil en la clínica. La interferencia entre la unión de PDE δ a KRAS a través de moléculas pequeñas ha proporcionado una nueva oportunidad para inhibir la señalización oncogénica de KRAS al alterar su localización en endomembranas. En el 2013 el grupo de Zimmermann, al realizar un cribado bioquímico identificaron inhibidores de la interacción KRAS-PDE δ que selectivamente se unen al sitio de unión a grupos prenilo de PDE δ con afinidad nanomolar, inhibiendo de esta forma la señalización de RAS oncogénico y suprimiendo *in vitro* e *in vivo* la proliferación de células de adenocarcinoma ductal pancreático humano, las cuales son dependientes de la señalización de KRAS (Zimmermann et al, 2013). Sin embargo, dichas moléculas inhiben la función de la PDE δ , la cual es esencial no solo en el transporte de KRAS, si no de muchas otras proteínas preniladas, lo que hace tóxicas a estas moléculas pequeñas, en células que no dependen de KRAS e inclusive en células sanas.

Casique-Aguirre y colaboradores en el 2018 propusieron una nueva estrategia para la inhibición de la señalización de KRAS4b en el cáncer pancreático. Esta estrategia puede prevenir que KRAS4b sea liberado en la membrana plasmática, e inhibir su señalización. La ventaja de esta estrategia es que moléculas pequeñas reconocen específicamente al complejo heterodimérico KRAS4b-PDE δ y lo estabilizan, sin afectar otras moléculas que son reguladas por PDE δ . El principal objetivo de los

autores fue encontrar moléculas pequeñas dirigidas a los residuos de la interfaz entre KRAS4b y PDE δ , a través de un cribado virtual para promover la unión estable entre las moléculas objetivo y evaluar su impacto en la señalización de KRAS4b *in vitro* e *in vivo*. Los autores reportaron dos moléculas con alta afinidad por el complejo KRAS4b-PDE δ llamadas D14 y C22 (Figura 7). Por consiguiente, dichos compuestos fueron probados en líneas celulares de cáncer pancreático; en dichas células, D14 y C22 disminuyen la viabilidad de células dependientes de la señalización de KRAS4b, provocando una muerte celular por apoptosis al bloquear la activación de KRAS4b, así como sus vías de señalización. Por consiguiente, disminuyen de forma significativa el crecimiento tumoral, en un modelo murino de cáncer pancreático (Casique-Aguirre et al, 2018).

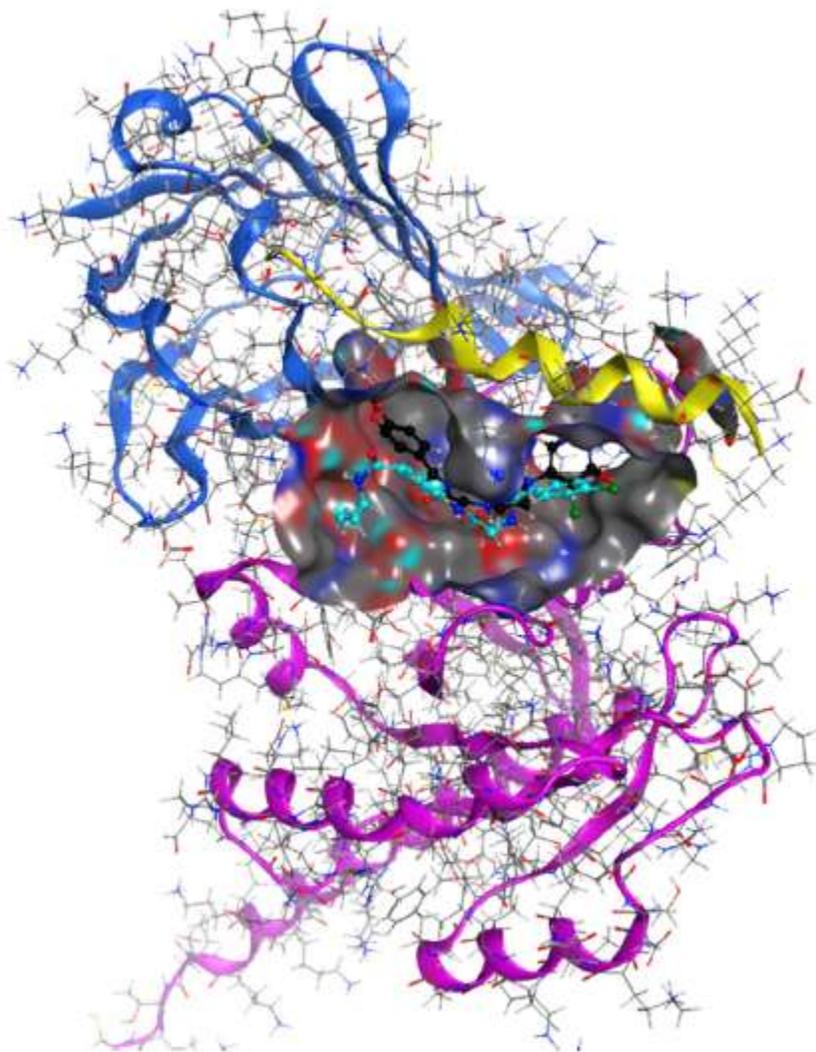


Figura 7.- Interacción de los ligandos que estabilizan el complejo molecular KRAS4b-PDEδ *in silico*. La superficie de interacción interproteína marcada con color gris se utilizó para el acoplamiento del *docking*, esta región es la que presenta mayor contacto entre la GTPasa KRAS4b (rosa y amarillo) y PDEδ (azul). Los compuestos D14 (negro) y C22 (agua) fueron identificados en los mismos sitios de interacción interproteínas (Casique-Aguirre et al, 2018) (*Molecular Operating Environment* MOE, 2014.09).

Durante mi trabajo de maestría, y empleando la misma estrategia que Casique-Aguirre et al, 2018, se identificó una molécula pequeña denominada C19, la cual estabiliza el complejo molecular KRAS4b-PDEδ en el cáncer colorrectal. De un cribado de 5 compuestos probados en células de cáncer colorrectal dependientes

de KRAS4b, el compuesto C19 fue seleccionado, ya que presentó actividad citotóxica en células de cáncer colorrectal a una concentración menor en comparación con los otros cuatro compuestos probados (Cruz Nova, 2016).

3.- Justificación:

Las mutaciones de KRAS se observan en aproximadamente un tercio de los cánceres humanos y específicamente en 40 a 60% de los casos de cáncer colorrectal. Las opciones de tratamiento con quimioterapia para pacientes con cáncer colorrectal siguen siendo limitadas. Además, la mutación de KRAS se ha denominado como un biomarcador negativo de respuesta al tratamiento. El compuesto C19 mostró actividad citotóxica sobre células de cáncer colorrectal con KRAS mutado, sin embargo, aún se desconoce la especificidad a nivel molecular, así como su potencial terapéutico a nivel pre-clínico.

4.- Hipótesis:

El compuesto C19, así como sus variantes I-C19 y [¹³¹I]-C19, presentan actividad anti-neoplásica específica en modelos pre-clínicos de cáncer colorrectal KRAS-dependiente.

5.- Objetivo general:

Evaluar la especificidad del compuesto C19 y sus variantes I-C19 y [¹³¹I]-C19, así como sus propiedades anti-neoplásicas en modelos pre-clínicos de cáncer colorrectal.

6.- Objetivos particulares

1. Determinar la actividad antitumoral de los compuestos C19 e I-C19 en un modelo de xenoinjerto de una línea celular de cáncer colorrectal en ratones Nu/Nu.
2. Analizar el estatus de activación de RAS, así como de sus principales efectores después del tratamiento con los compuestos C19 e I-C19, *in vitro* e *in vivo*.
3. Conocer la biodistribución y farmacocinética del compuesto C19.
4. Investigar el impacto del compuesto C19 e I-C19 en el crecimiento de adenocarcinomas colorrectales asociados a inflamación en ratones C57BL/6.
5. Evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad de los compuestos C19 e I-C19 en eritrocitos inmaduros de medula ósea de ratones BALB/c.

7.- Materiales y métodos:

7.1 Simulaciones *in silico*: Docking.

Se identificó la estructura química del compuesto C19 utilizando la base de datos de ENAMINE 3D *Diversity set* (www.enamine.net) por *docking* en la región de interface del complejo molecular KRAS4b-PDEδ utilizando *AutoDock* 4.2.626 (Morris et al, 2009) y *MOE Dock* (www.chemcomp.com). Los cálculos de acoplamiento se llevaron a cabo utilizando la configuración de parámetros estándar recomendada. Se evaluaron un máximo de 250,000 maneras en las cuales C19 interactúa en el receptor objetivo (contactos cristalográficos entre KRAS4b con PDEδ, del PDB ID 5TAR). Las cuadrículas fueron calculadas utilizando *Autogrid* 4.2.626 con espaciado de 0.375 Å enfocados en la interfaz de las proteínas cristalizadas. El *docking* molecular con MOE 2014.09, se realizó utilizando la función *matcher* para generar las poses iniciales. Los mejores 30 resultados del puntaje London dG se refinaron utilizando la minimización de energía con el campo de fuerza MMFF94x y se volvieron a clasificar usando la puntuación *Afinity dG*.

7.2. Simulación de dinámica molecular.

La simulación de dinámica molecular (MD) del complejo proteína-ligando se realizó con el paquete AMBER 16 (Case et al, 2005) y el campo de fuerza ff14SB (Duan et al, 2003). Las cargas de ligando para los residuos no parametrizados en las proteínas se determinaron con el nivel AM1-BCC y el campo de fuerza general Amber (GAFF) (Wang et al, 2004). Para el complejo proteína-ligando, se aplicó una caja de 15 Å de forma rectangular del modelo de agua TIP3P (Jorgensen et al, 1983)

para solvatar el complejo; y los iones Cl^- y Na^+ se usaron en el modelo para neutralizar las cargas positivas o negativas alrededor del complejo a pH 7, en el sistema proteína-ligando. Antes de la simulación MD, el sistema se minimizó a través de 3000 pasos de minimización de descenso más pronunciado seguido de 3000 pasos de minimización de gradiente conjugado. Luego, el sistema se calentó de 0 a 310 K durante 500 ps de MD con restricciones de posición bajo condiciones del ensamble NVT. Se llevó a cabo una dinámica molecular bajo condiciones del ensamble isobárico isotérmico (NPT) de 500 ps para ajustar la densidad del disolvente seguido de 600 ps de equilibrio de presión constante a 310 K utilizando el algoritmo *SHAKE* (van Gunsteren et al, 1977) en átomos de hidrógeno, así como dinámica de Langevin para el control de la temperatura. El proceso de adquisición de condiciones de equilibrio fue seguido por una simulación MD de 100 ns de longitud, sin restricciones de posición y en condiciones de contorno periódicas, utilizando un ensamble NPT a 310 K. El método de Ewald de malla de partículas se utilizó para describir el término electrostático (Darden et al, 1993). Además, se usó un límite de 10 Å para las interacciones de *Van der Waals*. La temperatura y la presión se conservaron utilizando el algoritmo de acoplamiento débil (Berendsen et al, 1984) con constantes de acoplamiento τ_T y τ_P de 1.0 y 0.2 ps, respectivamente (310 K, 1 atm).

Las coordenadas se guardaron para análisis cada 50 ps. Amber-Tools14 se utilizó para examinar la dependencia del tiempo de la desviación cuadrática media (RMSD), radio de giro (RG) y análisis de agrupamiento para identificar las conformaciones más pobladas durante el tiempo de simulación equilibrado.

7.3. Cálculo de las energías libres de unión.

El cálculo de las energías libres de unión se realizó utilizando el código MMGBSA (Gohlke et al, 2004) (Kollman et al, 2000) (Miller et al, 2012) provisto en el conjunto Amber16 (Case et al, 2005). Se seleccionaron 500 conformaciones instantáneas a intervalos de tiempo de 100 ps de las últimas 50 ns de simulación MD utilizando una concentración de NaCl de 0.1 M y el modelo de disolvente implícito Generalized Born (GB) (Onufriev et al, 2004). La energía libre de unión del sistema proteína-ligando se determinó de la siguiente manera:

$$\Delta G_{\text{unión}} = G_{\text{complejo}} - G_{\text{receptor}} - G_{\text{ligando}}$$

$$\Delta G_{\text{unión}} = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{solvatación}} - T\Delta S$$

ΔE_{MM} representa la energía total del campo de fuerza, que incluye las energías de interacción electrostática (ΔE_{ele}) y van der Waals (ΔE_{vdw}). $\Delta G_{\text{solvatación}}$ es la energía de solvatación tras la formación del complejo. Se estima a partir del modelo implícito GB y los cálculos de área de superficie accesible al solvente (SASA) que producen $\Delta G_{\text{ele, sol}}$ y $\Delta G_{\text{npol, sol}}$. $T\Delta S$ es la contribución entrópica a la energía libre del soluto, que surge de los cambios estructurales que ocurren en los grados de libertad de los solutos libres cuando se forma el complejo proteína-ligando.

7.4. Líneas celulares.

El cultivo de las células se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Todas las líneas celulares fueron adquiridas de ATCC (Manassas, VA). Las líneas celulares de cáncer colorrectal humano HCT116 (ATCC® CCL-247™), LoVo (ATCC® CCL-229™) y SW620 (ATCC® CCL-227™) se cultivaron en medio RPMI-

1640 (ATCC[®] 30-2001[™]), F12K (Kaighn`s Modification of Ham`s F-12 Medium) (ATCC[®] 30-2004[™]) y medio DMEM-F12 (ATCC[®] 30-2006[™]) (ATCC Manassas, VA) respectivamente. La línea celular derivada de miofibroblastos de colon sano CCD-18Co fue cultivada en medio EMEM (Eagle`s Minimum Essential Medium) (ATCC[®] 30-2003[™]). Todos los medios fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (SBF, Biowest) desactivado previamente a 56°C por 30 min, y con 1% de una mezcla de antibiótico (Ampicilina, Estreptomicina) y antimicótico (Anfotericina) (Gibco NY, USA). Las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C, al 5% de CO₂ y humedad saturada. Para realizar cada experimento, las células fueron despegadas de la superficie de las cajas de cultivo con 0.05% de tripsina, centrifugadas a 1500 rpm por 4 min y sembradas nuevamente.

7.5. Evaluación de la viabilidad celular y cálculo de IC₅₀.

Las líneas celulares HCT116, LoVo, SW620 y CCD-18Co fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 1×10^4 células por pozo y crecidas durante 24 h. Posteriormente, las células se trataron con C19 e I-C19 por 72 h en medio completo. Para evaluar la viabilidad, las células se analizaron utilizando el kit CellTiter-Glo (Cat. G7570) (Promega, Madison, WI) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de los compuesto C19 e I-C19 que causaron la muerte al 50% de todas las células durante 72 h (IC₅₀) se determinó por la aplicación de un análisis de ajuste de curvas con el software Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

7.6. Ensayo clonogénico.

Las líneas celulares de cáncer colorrectal fueron sembradas en placas de 6 pozos a una densidad de 300-500 células por pozo y cultivadas toda la noche. Las células HCT116 y LoVo se trataron con una concentración final de 5 y 10 μM de 5-fluorouracil (5-FU; PiSA Laboratories, México), respectivamente, y con la concentración de IC_{50} del compuesto C19 por 72 h. Subsecuentemente, el medio se reemplazó con medio fresco suplementado como se mencionó anteriormente con una duración total de 10 días. Las células fueron fijadas con 4% de paraformaldehído (PFA) a temperatura ambiente por 10 minutos y lavadas con agua destilada. Las células fueron teñidas con 0.1% de cristal violeta en agua por 30 minutos, lavadas con agua, secadas, y fotografiadas. Para la cuantificación, se agregó ácido acético por 5 minutos para extraer el colorante y la absorbancia fue medida fotométricamente a 590 nm utilizando el fluorómetro TECAN Fluorometer Infinite F500 (Tecan Austria GmbH).

7.7. Determinación del tipo de muerte celular por citometría de flujo.

La apoptosis fue detectada utilizando el kit *FITC-Annexin-V/dead cell apoptosis* (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante. Brevemente, las células fueron sembradas a una densidad de 5×10^5 células por pozo en placas de seis pozos y cultivadas con la concentración de IC_{50} de C19 por 72 h. Las células sin tratamiento se utilizaron como control. Las células fueron despegadas con tripsina, lavadas con PBS frío y suspendidas en 1x de Buffer de unión (50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM de CaCl_2 , pH 7.4) a una concentración de 1×10^6 células/mL. Se agregaron 5 μl de solución FITC-Annexin V (25 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1mM EDTA, pH

7.4, 0.1% albumina de suero bovino) y 1 μL de solución de yoduro de propidio (PI) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a cada 100 μL de suspensión celular. Las células fueron gentilmente suspendidas e incubadas a temperatura ambiente en oscuridad por 15 minutos. Posteriormente, se agregaron 400 μL de Buffer de unión frío y se mezcló gentilmente. Las intensidades de fluorescencia fueron examinadas por citometría de flujo utilizando un citómetro FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA) seguido del análisis de los datos utilizando el software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR).

7.8. Ensayo de activación de RAS.

Para conocer si los compuestos C19 e I-C19 presentan actividad específica sobre la activación de KRAS, se analizó el estatus de activación de RAS total. Las células fueron tratadas con el IC_{50} del compuesto C19 e I-C19 por 24h, posteriormente las células se expusieron a 100 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF) por 10 minutos. Subsecuentemente, se lavaron con PBS, se lisaron y se centrifugaron a 4°C por 2 minutos a 10 000 rpm. La cuantificación de proteína total se realizó por medio del Kit *Precision Red Advanced Protein Assay* de Cytoskeleton (Cat. ADV02-A). Se utilizaron 200-500 μg de proteína y se mezclaron con 30 μL de las perlas Raf-RBD, y se incubaron a 4°C por una hora. Posteriormente se centrifugaron a 5000 g por un minuto para recuperar las perlas Raf-RBD. Se removió aproximadamente el 90% del sobrenadante. Se lavaron las perlas con 500 μL de buffer de lavado. De nuevo se centrifugaron las perlas por tres minutos a 5000 g , se removió el sobrenadante y se agregaron 20 μL de buffer de Laemmli 2X a cada tubo, se

suspendieron las perlas y se colocaron en agua a ebullición por dos minutos. Para realizar la detección mediante western blot.

7.9. Simulación docking *in silico* I-C19.

La estructura química original de C19 fue identificada dentro de la base de datos de ENAMINE 3D *Diversity set* (www.enameine.net) por *docking* en la región de interface del complejo molecular KRAS4b-PDE6δ utilizando *AutoDock* 4.2.626 y MOE Dock (www.chemcomp.com). La estructura original de C19 fue modificada por el intercambio de sus dos halógenos para sintetizar I-C19. El cálculo de acoplamiento se llevó a cabo utilizando los parámetros estándar recomendados. Se evaluaron un máximo de 250,000 poses de I-C19 en el receptor objetivo (contactos cristalográficos entre KRAS4b y PDE6δ, del PDB ID 5TAR). Las cuadrículas se evaluaron utilizando Autogrid 4.2.626 con espaciado de 0.0375 Å enfocados en la interfaz cristalográfica de ambas proteínas. El *docking* molecular se realizó con Molecular Operating Environment MOE 2014.09 usando la función *Matcher* para generar las poses iniciales. Los mejores 30 resultados del score London dG fueron refinados usando la minimización de energía con el campo de fuerza MMFF94x y restaurado usando puntuación de afinidad dG. El precursor I-C19 ((2S)-N-(2, 5-diiodophenyl)-2-[(3, 4-dimethoxyphenyl)-methylamine] propanamide) se ordenó a la empresa ENAMINE (Kyiv, Ucrania)

7.10. Marcaje del compuesto I-C19 con ¹³¹I por intercambio isotópico.

La radio-yodación electrofílica del compuesto I-C19 se realizó utilizando cloramina T como agente oxidante. Para preparar [¹³¹I]I-C19, se utilizaron 40 µg del compuesto

I-C19 (70 μmol). Se marcó con 2442 MBq de [^{131}I]NaI (50 μL) y 50 μL de cloramina T (1 mg/ml). Se colocó en vortex por 2 min y se detuvo la reacción con 20 μL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ a una concentración de 15 μM . El producto final, [^{131}I]I-C19, se purificó por extracción en fase sólida (SPE).

7.11. Purificación por extracción en fase sólida del compuesto I-C19 marcado con ^{131}I .

Activación: con una jeringa sin aguja, se agregaron a la columna 5 mL de etanol, 10 mL de solución salina o PBS 1X, y los 10 ml de aire.

El compuesto [^{131}I]I-C19 se pasó por la columna y se lavó con de acetonitrilo al 20%. Finalmente, se eluyó con 1 mL de DMSO.

7.12. Segunda purificación del compuesto ^{131}I -C19 mediante HPLC de fase reversa.

Se utilizó el sistema de HPLC de fase reversa para purificar el compuesto, con una fase estacionaria WAT027324 - $\mu\text{Bondapak}$ Column Reversed-Phase 10 μm Irregular Sílica, 3.9 mm x 300 mm, 1/pkg.

7.13. Determinación de la pureza radioquímica por HPLC.

El análisis por cromatografía de alta resolución se realizó en un sistema Waters 2996 con software Millenium con detectores de radiactividad radio-HPLC γ -Ram Model 3 y detector UV de fotodiodos en línea.

El análisis se realizó utilizando un gradiente lineal con un flujo de 1 mL/min de agua/acetonitrilo conteniendo 0.1% de ácido trifluoroacético de 98/2 a 10/90 en 30 minutos.

7.14. Captación e internalización.

Las líneas celulares de cáncer colorrectal HCT116, LoVo y SW620 se colocaron en placas de cultivo de 48 pozos a una densidad de 1×10^5 células por pozo. Después de 24 h, las células se expusieron a $3 \mu\text{M}$ de [^{131}I] I-C19 a 37°C por 1 y 3 h. Después del tratamiento, se realizaron dos lavados con 1 mL de PBS frío. Para calcular la fracción del compuesto captado, las células en cada pozo se incubaron por 5 min a temperatura ambiente con 0.5 mL de buffer de glicina (50 mM, pH 2.8). Posteriormente fue removido y la radiactividad fue medida en el detector NaI (TI) (NML Inc. USA). Para evaluar la internalización de [^{131}I]I-C19, las células fueron incubadas con 1 mL de NaOH (0.3 M) por 10 min a temperatura ambiente. De nuevo se midió la radiactividad en el detector NaI(TI) (NML Inc. USA). Para cada tratamiento se utilizó un estándar de 200 μL y dicha medición representó el 100% (n=5).

7.15. Citotoxicidad del compuesto [^{131}I] I-C19 en líneas celulares de cáncer colorrectal.

Las líneas celulares HCT116, LoVo, SW620 y CCD-18Co fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 1×10^4 células por pozo y crecidas durante 24 h. Posteriormente, las células fueron tratadas con C19 e I-C19 por 72 h en medio completo. La viabilidad celular se midió utilizando el ensayo de XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide) (Roche, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

7.16. Inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-H2AX γ

Para evaluar el rompimiento de la doble cadena del DNA (DSBs), se utilizó el biomarcador γ H2AX. Las células se sembraron en cubreobjetos. Después de la exposición a I-C19 o [131 I] I-C19 a las concentraciones de 1.8, 6.8 y 8.8 μ M en las líneas celulares LoVo, SW620 y HCT116, respectivamente por 3 h, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se utilizó el anticuerpo anti-fosfo-histona H2A.X (ser139) (1:200; CST, Boston, MA, USA). Posteriormente las células fueron lavadas con PBS 1X e incubadas con el anticuerpo secundario IgG anti-conejo conjugado con Alexa-488 para la visualización de γ H2AX. Posteriormente, las laminillas se teñieron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los sitios donde se localizó γ H2AX se observaron con un microscopio confocal Leica. Para la cuantificación de dichos sitios de γ H2AX, los puntos clara y fácilmente distinguibles se contaron como sitios positivos. Se contaron sitios de al menos 30 células por pozo, y se calculó el promedio de sitios por célula.

7.17. Dosis de radiación absorbida en el núcleo de las células de cáncer.

Para estimar las dosis de radiación absorbida del núcleo de las células HCT116, LoVo y SW620, se utilizó la siguiente ecuación:

$$D_{N \leftarrow Source} = (N_M \times DF_{N \leftarrow M}) + (N_C \times DF_{N \leftarrow C})$$

Donde $D_{N \leftarrow Source}$ representa la dosis media absorbida en el núcleo de regiones fuente (membrana-M- y citoplasma-C-) y N_M y N_C son el número de total de desintegraciones nucleares que ocurren de la membrana y citoplasma,

respectivamente. $DF_{N \leftarrow M}$ y $DF_{N \leftarrow C}$ denotan los factores de dosis específicos para ^{131}I , de las regiones de la membrana y citoplasma al núcleo. Las geometrías del factor de dosis fueron obtenidas de los valores S reportados por Guddu y Budinger en 1997 (HCT116 radio celular= 10 μm , radio nuclear= 5 μm , LoVo y Sw620 radio celular 10 μm , radio nuclear= 6 μm).

7.18. Modelo xenográfico: Inyección subcutánea y pruebas pre-clínicas.

Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el comité institucional de cuidado y uso de animales de Cinvestav (Número de protocolo 0238-17). Los animales fueron alojados en la unidad de producción y experimentación de animales de laboratorio (UPEAL) de Cinvestav (CDMX México). Se utilizaron ratones macho de la cepa Nu/Nu de seis semanas de edad con un peso aproximado de 20 g. 5×10^6 células LoVo fueron suspendidas en 200 μL de PBS e inyectados subcutáneamente en el flanco derecho de los ratones desnudos. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 150 mm^3 , los ratones fueron asignados de manera aleatoria en cuatro grupos: Solo vehículo (10% de DMSO en PBS 1X); C19 (15 mg/kg y 30 mg/kg), I-C19 (30 mg/kg) y 5-Fu (40 mg/kg). Los tratamientos fueron administrados vía intraperitoneal en un volumen final de 300 μL una vez por día por 12 días. El volumen tumoral se calculó con la siguiente fórmula: $mm^3 = dxD^2/2$, siendo d y D los diámetros largo y ancho, respectivamente.

7.19. Modelo murino de cáncer colorrectal *in situ*.

Los ratones fueron tratados como se describió previamente (Thaker, Shaker, Rao, & Ciorba, 2012). Se inyectaron ratones de la cepa C57BL/6 machos de seis

semanas de edad vía intraperitoneal con una dosis única de azoximetano (AOM) (10 mg/kg). Una semana después, los ratones fueron tratados con un curso de dextran sulfato sódico a una concentración de 1.5% en agua de beber estéril por 7 días seguido de agua de beber pura por dos semanas para un total de tres cursos. Posteriormente los ratones se dividieron de manera aleatoria en tres grupos: vehículo (10% de DMSO en 1X de PBS), I-C19 (30 mg/kg) y C19 (30 mg/kg). Para el grupo control, se realizó el mismo procedimiento con solución salina vía intraperitoneal y agua de beber pura en lugar del tratamiento con AOM/DSS.

7.20. Western Blot.

Las muestras de tejido fueron pesadas, congeladas, y trituradas en nitrógeno líquido con un mortero. Las muestras fueron transferidas a un tubo de micro centrifuga y lisadas usando el reactivo de lisis de células de mamífero ProteoJET™. Después de la centrifugación a 20,000 g por 15 minutos y cuantificación de la proteína, la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó utilizando 30 µg de proteína de cada muestra. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Merck Millipore) y bloqueadas por 1 h a temperatura ambiente utilizando PBS con 5% de leche baja en grasa. Los anticuerpos utilizados para el western blot fueron: Erk total (Cell signaling-9102; 1:1,000), pErk (Cell signaling-9101; 1: 1,000), Akt total (Cell signaling-9272; 1: 1,000), pAkt (Cell signaling-4060; 1: 1,500), PARP (Cell signaling-9542; 1:500), PCNA (Zymed 13-390 1:500) y β-actina (GeneTex, 1:500). Los anticuerpos primarios fueron incubados toda la noche a 4°C y posteriormente lavados. Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP especie-específica fueron incubados por 1 h a temperatura ambiente y lavados dos veces. Las

membranas fueron incubadas con el sustrato Super Signal West Femto (Thermo Fisher Scientific) y las señales fueron detectadas utilizando el sistema de imagen ChemiDoc (BIO-RAD Laboratories, Inc.).

7.21. Inmunohistoquímica.

Los cortes de parafina de las muestras de tumor fueron desparafinadas en xileno y rehidratadas en series de alcoholes graduados. Los antígenos fueron expuestos con buffer de citrato de sodio 0.01 M y EDTA-Tris 0.1 M (Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions cat. RE7113, Leica Biosystems). Las muestras fueron incubadas en 0.9% de H₂O₂ por 5 minutos seguido por 1 h de bloqueo en BSA al 1% en PBS. Las laminillas fueron incubadas por 1 h a temperatura ambiente con anti-KI67 (1:100, Clona SP6 CRM325, BIOCARE Medical), lavadas e incubadas con el polímero-HRP MACH1 Universal (Cat. MRH538G BIOCARE Medical) por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron reveladas con el kit Cromógeno Betazoid DAB (Cat. BDB2004H, BIOCARE Medical), contra-teñido con hematoxilina y montado con solución de resina sintética (Entellan .107960 Merck).

7.22. Ensayo de TUNEL.

La apoptosis fue analizada en las muestras de tejido utilizando el ensayo de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick end labeling) con el kit de detección de muerte celular *In situ* (Cat. 11684795910, ROCHE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cortes de parafina de las muestras de tumor de colon fueron desparafinizados en xileno, rehidratadas en series de alcoholes graduados, fijadas en paraformaldehído al 4% por 30 minutos y digeridas con 20

µg/mL de proteinasa K por 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras de tejido fueron teñidas utilizando la mezcla de reacción del TUNEL. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y las muestras fueron analizadas por microscopia confocal utilizando un microscopio Olympus FV300.

7.23. Ensayo de genotoxicidad.

Para la evaluación del efecto genotóxico de los compuestos C19 e I-C19, se realizó el ensayo de micronúcleos con células de médula ósea de acuerdo con el método previamente descrito (Hayashi et al, 1994). Los compuestos fueron administrados una vez, vía intraperitoneal, como solución, a una concentración de 15 mg/kg de 5-fluorouracilo y 30 mg/kg de C19 e I-C19. Las células de la médula ósea fueron obtenidas 24 h después del tratamiento y teñidas con Giemsa-Wright (Diff-Quick; Harleco; Gibbstown, NJ). Dos mil eritrocitos policromáticos fueron contados por animal utilizando un microscopio óptico con un aumento de 100 X para determinar el número de eritrocitos policromáticos micronucleados.

7.24. Biodistribución.

El compuesto [¹³¹I]I-C19 se inyectó vía intraperitoneal en ratones Nu/Nu. Los ratones (n=3) fueron sacrificados post-inyección a 1, 3 y 24 h. Todo el tumor, corazón, pulmones, hígado, páncreas, bazo, riñones y muestras de colon, músculo, hueso, y sangre fueron lavados y guardados en bolsas de plástico pre-pesadas. La actividad fue determinada en un contador de centelleo (Canberra), junto con seis alícuotas de 0.5 mL del estándar diluido, que representan el 100% de la actividad

inyectada. Se utilizó la actividad media para obtener el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g).

7.25. Modelo biocinético y estimación de la dosis absorbida de radiación.

La media del porcentaje de actividad inyectada a 1, 3 y 24 h (%ID, n=3 de cada tiempo), del tumor, corazón, pulmones, hígado, páncreas, bazo, riñones, colon, músculo, hueso y sangre fueron introducidos en el código computacional Olinda/EXM para obtener la curva de actividad vs tiempo ($A_h(t)$), para cada órgano. La integral de cada curva actividad-tiempo representa el número total de desintegraciones (N, MBq.s/MBq) de ^{131}I en las regiones fuente, normalizados por unidad administrada de actividad (MBq).

Las dosis absorbidas depositadas en los órganos seleccionados fueron estimadas basadas en la siguiente ecuación general:

$$D_{\text{blanco} \leftarrow \text{fuente}} = N_{\text{fuente}} * DF_{\text{blanco} \leftarrow \text{fuente}}$$

Donde $D_{\text{blanco} \leftarrow \text{fuente}}$ es la media de la dosis absorbida al órgano blanco de un órgano fuente y $DF_{\text{objetivo} \leftarrow \text{fuente}}$ es el factor de la dosis que considera la fracción de la energía absorbida por cada emisión nuclear del yodo-131 en diferentes geometrías y composiciones químicas de los órganos. Los valores DF del yodo-131 para el modelo de ratón de 25 g se obtuvieron del código Olinda, versión 2.2.

8.- Resultados

8.1.- C19 se une y estabiliza al complejo KRAS4b-PDEδ.

Uno de los compuestos identificados con el mejor *score* de *docking* presentes en la librería de compuestos ENAMINE, fue el C19, el cual, es una molécula orgánica con buenas propiedades farmacológicas, con un peso molecular de 383.3 g/mol, dos donadores de hidrógeno y dos átomos de cloro (Cl) capaces de hacer interacciones Cl- π con residuos aromáticos. También tiene cuatro aceptores de hidrógeno y un LogP de 3.3 (Tabla 1). Es importante resaltar, que el primer ensayo de *docking*, en donde se descubrió al compuesto C19, fue desarrollado en un modelo por homología a partir del cristal de la proteína RHO en complejo con la PDE δ ; posteriormente, en el 2016, fue publicado el cristal del complejo molecular KRAS4b-PDE δ (Dharmaiah et al, 2016), por lo que se procedió a validar la interacción de C19 en el complejo cristalizado. El procedimiento del *docking* se realizó para encontrar compuestos capaces de unirse simultáneamente a KRAS4b y PDE δ , que actuaran como una grapa molecular sobre este complejo. Para analizar todas las interacciones potenciales entre C19 y el complejo KRAS4b-PDE δ , realizamos ensayos de *docking* en toda la región de interfaz del complejo KRAS- PDE δ , donde los aminoácidos de ambas proteínas están muy cercanos (Figura 8A). Los resultados del *docking* fueron analizados por el puntaje de unión, la frecuencia de obtener poses similares; y el tipo de interacciones no vinculadas. La inspección visual de la pose de C19 (en azul) muestra interacciones simultáneas con KRAS4b (en verde) y PDE δ (en rojo) (Figura 8A y Tabla 2).

Tabla 1. Características del compuesto C19.

Comp.	Nombre IUPAC	Peso		Donadores de H	Aceptores de H	LogP	Enlaces rotables	Pureza
		Molecular (g/mol)	Fórmula					
C19	(2S)-N-(2,5-diclorofenil)-2-[(3,4-dimetoxifenil)metilamino]propanamida	383,3	$C_{18}H_{20}Cl_2N_2O_2$	2	4	3.3	7	95.36%

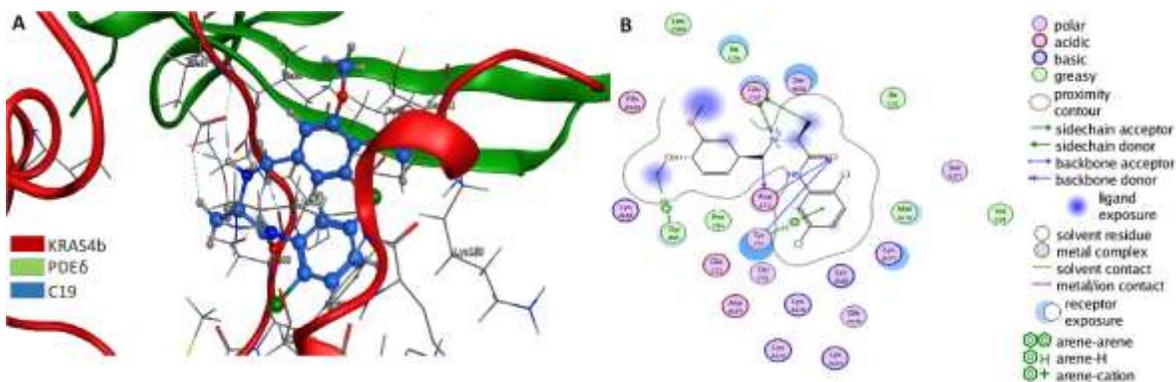


Figura 8.- El compuesto C19 se une y estabiliza al cristal del complejo KRAS4b-PDEδ. **A** Conformación más probable durante el tiempo de simulación en equilibrio. Superposición estructural de KRAS4b cristalizado (en rojo) en complejo con PDEδ (en verde) interaccionando con C19 (en azul). **B** Interacciones de C19 en el complejo KRAS4b-PDEδ. Los aminoácidos que interactúan con C19 están resaltados.

En la conformación más probable obtenida en el tiempo de simulación (50ns), la metilamina de C19 tuvo cinco interacciones con el ácido glutámico 37 de KRAS4b vía electrostática e interacciones de puentes de hidrógeno con una distancia entre 3.19 y 2.81 Å. El compuesto C19 también estableció puentes de hidrógeno e

interacciones π - π con la tirosina 32, así como interacciones con el ácido aspártico 33 de KRAS4b. Además, C19 forma puentes de hidrógeno e interacciones π - π con el triptófano 90 de PDE δ con una distancia de 4.71 Å (Figura 8B, Tabla 2). En la primera conformación de la simulación de dinámica molecular (DM), C19 forma seis interacciones con PDE δ y cinco con KRAS4b (Figura 9A). Por consiguiente, en la primera conformación de la simulación de DM, C19 mantiene fuertes interacciones con el ácido glutámico 106 de PDE δ vía interacciones de puentes de hidrógeno y con la serina 15 de KRAS4b (Figura 9B).

Tabla 2.- Resultados de la simulación de DM del sitio más probable del compuesto C19 en el complejo KRAS4b-PDE δ .

Proteína	Ligando	Receptor	Interacción	Distancia (Å)	E (kcal/mol)
KRAS4b	CB 18	OE2 GLU 37	H-donador	3.19	-0.6
	N 22	OE1 GLU 37	H- donador	2.65	-6.4
	N 22	OE2 GLU 37	H- donador	2.81	-13.9
	CAF 25	O ASP 33	H- donador	3.42	-1.5
	O 15	CA TYR 32	H-aceptor	3.34	-0.3
	O 15	N ASP 33	H- aceptor	3.00	-4.0
	N 22	OE1 GLU 37	iónico	2.65	-12.4
	N 22	OE2 GLU 37	iónico	2.81	-10.7
PDE δ	CAP 37	6-ring TRP 90	H- π	4.71	-0.3
KRAS4b	6-ring	CD2 TYR 32	π -H	3.63	-0.2

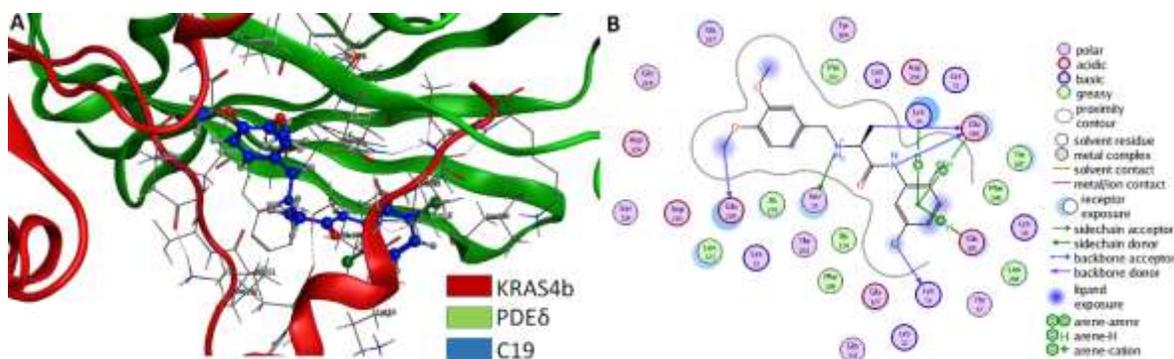


Figura 9.- Conformación número 1 del complejo KRAS4b-PDE δ -C19. **A.** Primera conformación del complejo KRAS4b-PDE δ -C19 donde se puede observar que el compuesto C19 se encuentra en una conformación extendida, interactuando con ambas proteínas por la formación de seis enlaces con PDE δ y cinco con KRAS4b. **B.** Interacciones del complejo proteína-ligando con C19 en la primera conformación de la simulación DM.

En efecto, los valores del ΔG de unión fueron energéticamente más favorables entre KRAS4b-PDE δ y C19 que solo con el grupo farnesilo, sugiriendo que C19 tiene el potencial de estabilizar el complejo KRAS4b-PDE δ , previniendo su disociación (Tabla 3).

Tabla 3.- Energía libre de unión de los componentes de los complejos proteína-ligando (en unidades de kcal/mol).

Sistema	ΔE_{vdw}	ΔE_{ele}	$\Delta G_{ele,sol}$	$\Delta G_{npol,sol}$	$\Delta E_{non-polar}$	ΔE_{polar}	DG_{bind}
Proteína-ligando							
KRAS4B-PDE-FAR	-123.0 (0.3)	-1546.9 (4.4)	1608.1 (4.2)	-17.7 (0.04)	-140.8	61.2	-79.6 (0.4)
KRAS4B-PDE-C19	-137.3 (0.2)	-1236.3 (5.3)	1304.6 (5.8)	-18.7 (0.04)	-156.1	68.3	-87.8 (0.5)

Energía libre de unión y términos de energía individual de la unión PL con ORL o EGCG comenzando de las conformaciones del *docking* (kcal/mol). Contribuciones polares ($\Delta E_{polar} = \Delta E_{ele} + \Delta G_{ele,sol}$) y no polares ($\Delta E_{non-polar} = \Delta E_{vwd} + \Delta G_{npol,sol}$). Todas las energías son promediadas sobre 500 conformaciones en intervalos de tiempo de 100 ps de al menos 50 ns de simulación MD y están en kcal/mol (\pm error estándar de la media).

8.2.- C19 presenta actividad citotóxica específica en células de cáncer colorrectal KRAS4b-dependientes.

Debido a que la unión de C19 mejora la estabilidad del complejo KRAS4b-PDE δ y dada la importancia de este complejo en el desarrollo y progresión de cáncer colorrectal, procedimos a averiguar el efecto del compuesto C19 en la viabilidad de células de cáncer colorrectal dependientes de KRAS. Para lo cual, se utilizó la línea celular dependiente de KRAS proveniente de adenocarcinoma colorrectal metastásico denominada LoVo, así como la línea celular HCT116, independiente de KRAS obtenida a partir de un carcinoma colorrectal y la línea celular CCD-18Co recuperada a partir de colon normal como control (Singh et al, 2012). La viabilidad celular fue determinada por la cuantificación de la concentración de ATP en las líneas celulares después de tres días de tratamiento con C19 a diferentes concentraciones (2.5, 10, 30 y 100 μ M). Nuestros resultados mostraron que la línea celular dependiente de KRAS LoVo fue más sensible al tratamiento de manera dosis dependiente con un IC₅₀ de 22.7 μ M; mientras que la línea celular HCT116 (K-Ras independiente) y la línea celular normal CCD-18Co presentaron un valor de IC₅₀ mucho más alto de 103.03 y 60.8 μ M, respectivamente (Figura 10A). De manera importante, C19 mostró efecto citotóxico más significativo en las células LoVo que en las células CCD-18Co a la concentración de 10 μ M. Mientras que no se observaron diferencias significativas entre las células HCT116 y CCD-18Co (Figura 10B).

Tomando en cuenta la participación de KRAS4b en la proliferación celular, se determinó si C19 regulaba el crecimiento celular utilizando el ensayo de formación

de colonia. Esto nos permitió evaluar la capacidad de una sola célula de cáncer para proliferar después de tres dosis de C19 o 5-fluorouracilo (5-Fu). Encontrándose que ambos tratamientos reducen significativamente la proliferación celular y por lo tanto la formación de colonias (Figura 10C). De manera importante, observamos que las células tratadas con C19 formaron menos colonias que en los cultivos tratados con 5-Fu, en las células dependientes de KRAS LoVo (Figura 10D). Estos resultados sugieren que C19 tiene un efecto citotóxico específico en células de cáncer colorrectal dependientes de la actividad de KRAS4b oncogénico.

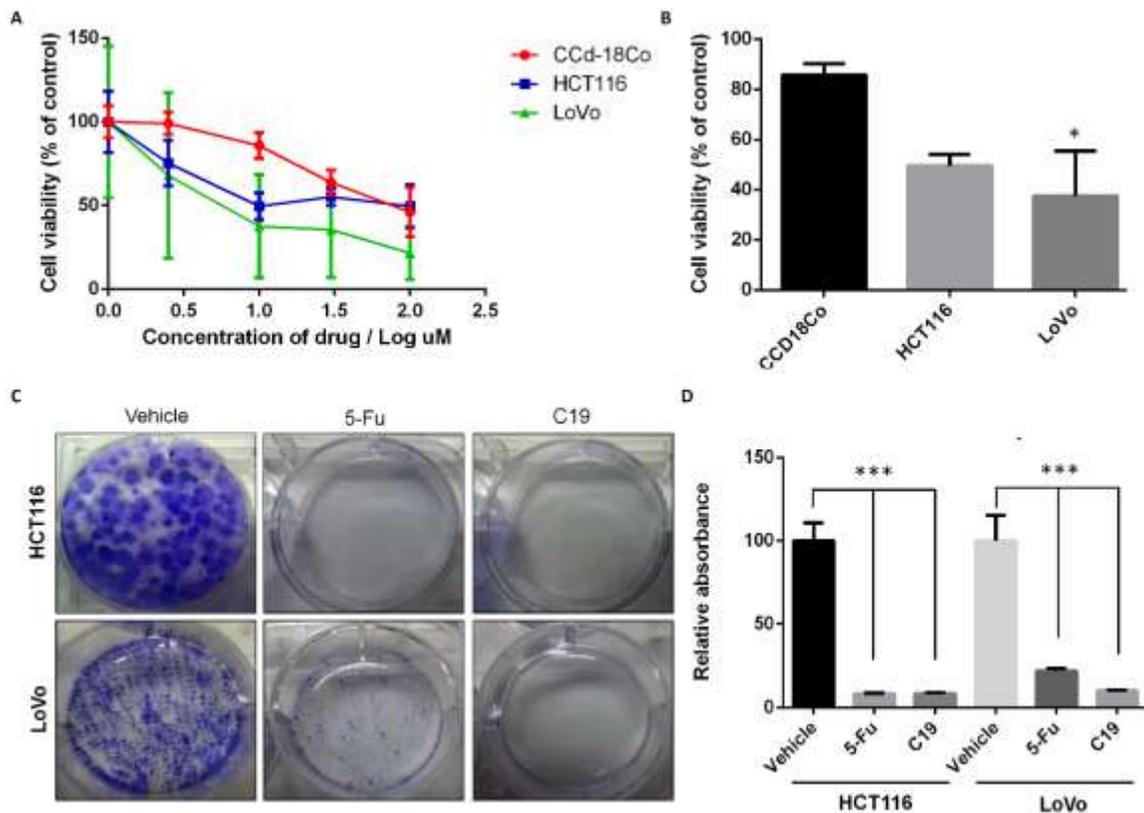


Figura 10.- C19 inhibe el crecimiento de células de cáncer colorrectal humano, principalmente de células dependientes de KRAS **A**. Las líneas celulares de cáncer colorrectal HCT116, LoVo y la línea celular de colon normal CCD-18Co fueron tratadas con las concentraciones indicadas de C19 por 72 h. Los valores de IC_{50} de las células HCT116, LoVo y CCD-18Co fueron 103.03, 22.7 y 60.8 μ M, respectivamente. **B**. El tratamiento con C19 a la concentración de 10 μ M reduce

significativamente la viabilidad de la línea celular LoVo. * $p < 0.01$. **C.** Las células fueron tratadas con el vehículo (DMSO), el IC_{50} de C19 y el IC_{85} de 5-Fu en el ensayo clonogénico y teñidas con cristal violeta. Se muestra la placa representativa de tres experimentos independientes. **D.** Cuantificación de la tinción de cristal violeta de las células presentadas en (**C**). $n = 3$; *** $p < 0.0001$.

8.3. C19 induce apoptosis.

El efecto citotóxico observado nos condujo a investigar cómo C19 inhibía la viabilidad y/o proliferación de células de cáncer colorrectal dependientes de KRAS. Para este fin, realizamos ensayos de Western blot para detectar si la proteína poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP) es escindida (c-PARP) después de 24, 48 y 72 h de tratamiento con C19 en ambas líneas celulares de cáncer, lo cual nos indica, si las células morían por apoptosis. Como se aprecia en la figura 11A (derecha), C19 promueve la escisión de PARP desde las 24 h de tratamiento en la línea celular LoVo. De manera interesante, después de 72 h de tratamiento, c-PARP pudo ser observado en la línea celular HCT116 (Figura 11A, izquierda), mientras que el compuesto C19 solo promueve un pequeño porcentaje de apoptosis en las células normales CCD-18Co y no provoca necrosis en estas células (Figura 12A). El incremento en la escisión de PARP a las 72 h post-tratamiento con C19 es significativo en ambas líneas celulares de cáncer comparado con el tratamiento solo con vehículo (DMSO) (Figura 11A). Además, se analizaron las células dependientes de KRAS LoVo y las células independientes de KRAS HCT116 por citometría de flujo utilizando la anexina V y el yoduro de propidio (PI) después del tratamiento con C19 utilizando las respectivas concentraciones de IC_{50} o DMSO como vehículo (Figura 11C). El tratamiento con el vehículo no afectó significativamente la muerte

celular comparado con las células sin tratamiento (datos no mostrados). Por el contrario, el tratamiento con C19 provoca un incremento en la apoptosis tardía (anexina V⁺ PI⁺) de aproximadamente 23% en las células HCT116 y de un 28.3% en las células LoVo. Sin embargo, en las células LoVo también hay un incremento del 20% de células en necrosis (anexina V⁻ PI⁺) comparado con HCT116 donde solamente hubo un incremento del 5%. En general, los resultados sugieren que el tratamiento con C19 promueve una muerte celular por apoptosis en ambas líneas celulares de cáncer y no por necrosis.

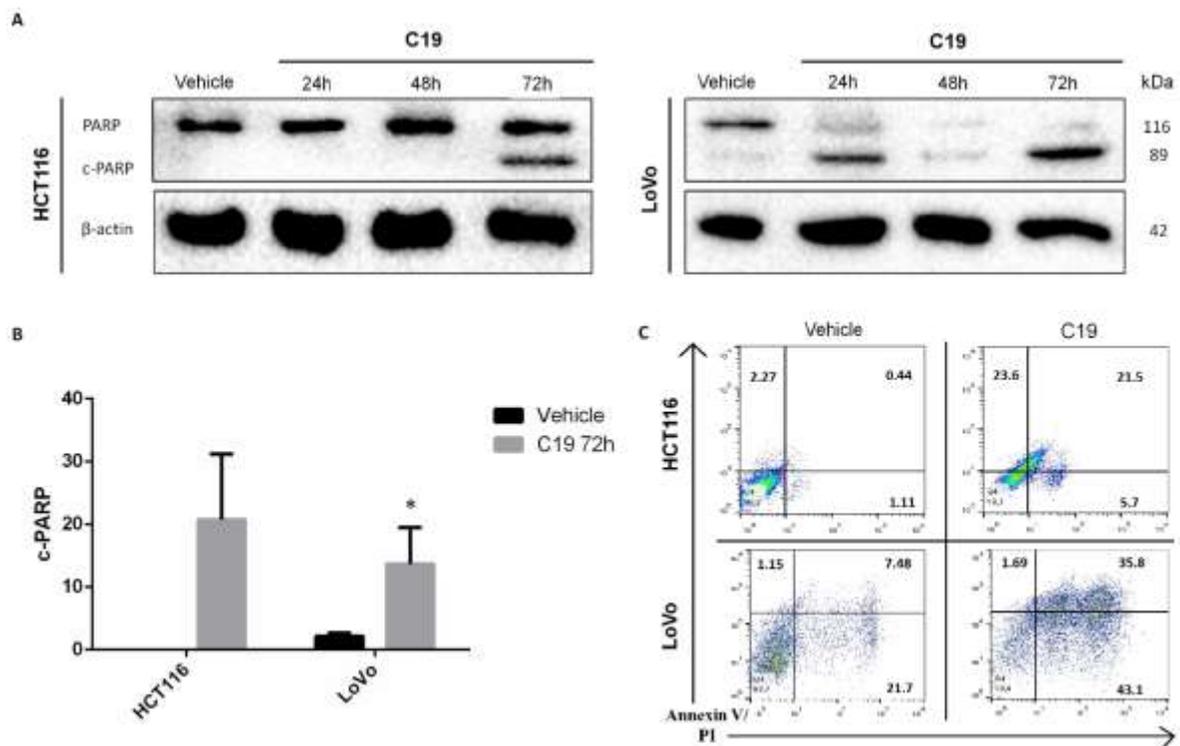


Figura 11.- C19 induce muerte celular por apoptosis en células de cáncer colorrectal. **A.** Las células fueron tratadas con el IC₅₀ de C19 por 24, 48 y 72 h y los lisados celulares fueron analizados para PARP escindida y β-actina como control de carga. Se muestran los blots representativos de tres experimentos independientes. **B.** Análisis densitométrico de c-PARP normalizado con los niveles de PARP total en las células HCT116 y LoVo tratadas con C19 por 72 h. Las barras de error representan el SEM. *p< 0.01 **C.** Análisis de anexina V y PI de las células HCT116 y LoVo tratadas con la concentración IC₅₀ de C19 o vehículo solo por 72 h.

El tratamiento con C19 incrementa significativamente los porcentajes de células de cáncer LoVo en apoptosis temprana (anexina V+ PI-) y tardía (anexina V+ PI+).

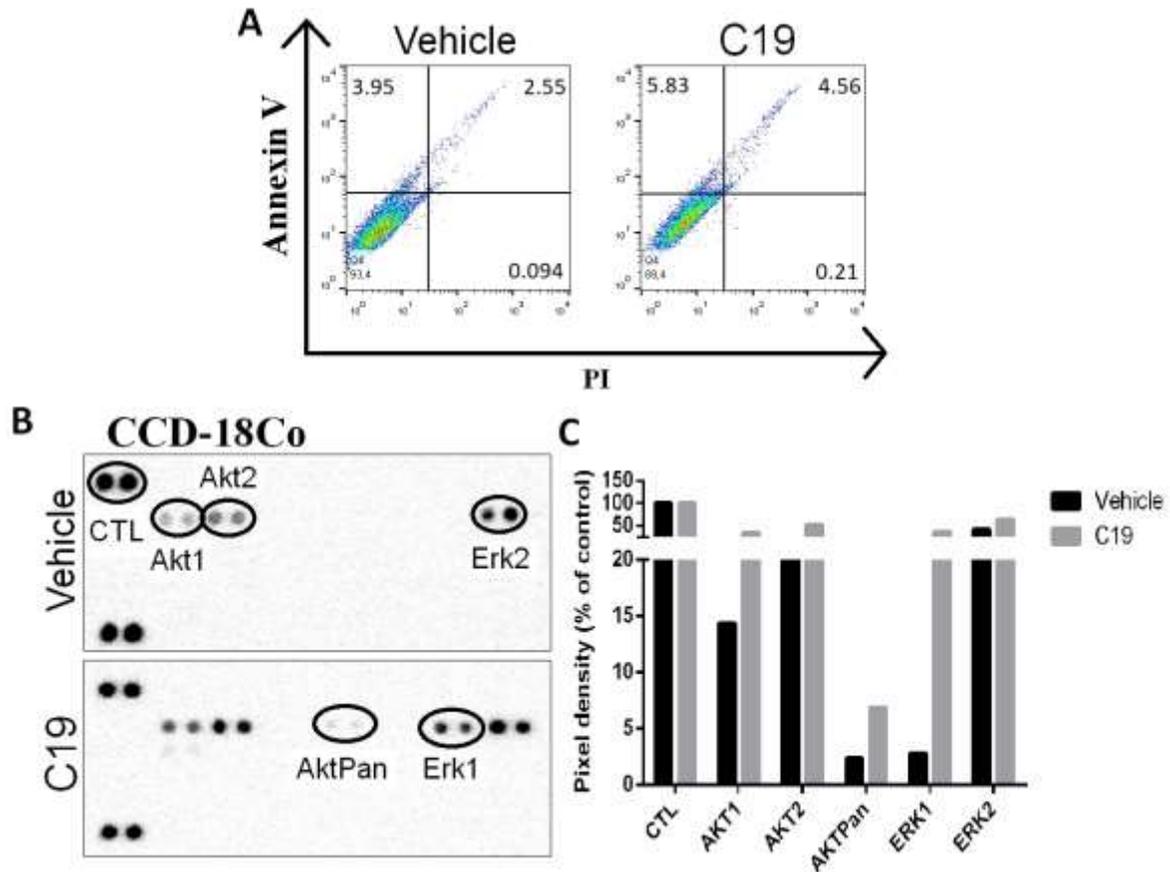


Figura 12.- C19 promueve la muerte celular por apoptosis en un pequeño porcentaje de células de la línea celular de colon normal e incrementa la fosforilación de Erk y Akt. **A.** Marcaje con anexina V y PI de la línea celular normal CCD-18Co tratada con 22.7 μ M de C19 o con el vehículo solo por 72 h. El tratamiento con C19 incrementa poco el número de células en apoptosis temprana (anexina V+ PI-) y tardía (anexina V+ PI+). **B.** Perfil de proteínas fosforiladas de células CCD-18Co tratadas con el vehículo (panel superior) y con C19 a una concentración de 22.7 μ M (panel inferior) por 24 h. Lisados totales de células, de la línea celular de colon normal. Después del tratamiento fueron incubadas en membranas del kit de proteínas fosforiladas Phospho-MAPK como se describe en los métodos. **C.** Cuantificación de la intensidad de los pixeles de la señal en duplicado de cada membrana. Los datos son representados como porcentaje del control positivo (set a 100%).

8.4.- El tratamiento con C19 reduce la señalización dependiente de KRAS.

Para probar si C19 puede prevenir la activación de RAS en células de cáncer colorrectal, se realizó el ensayo de *pull down* RAS-GTP (Figura 13, panel superior), esperando que, si C19 evita que KRAS se vaya a la membrana plasmática, entonces se tendría menos KRAS unido a GTP que las células tratadas con DMSO. Efectivamente, C19 inhibe significativamente la activación de RAS en más del 50% en las células HCT116 y LoVo 24 h después del tratamiento (Figura 13A, panel inferior). Debido a que KRAS4b induce la activación de las MAPKs, nos preguntamos si el tratamiento con C19 podría inhibir la señalización río abajo de KRAS4b. Por lo que empleamos una membrana comercial que contiene anticuerpos que reconocen 28 diferentes proteínas fosforiladas de la familia de las MAPKs (Figura 13B y C). Después de 24 h de tratamiento con C19, las células independientes de KRAS HCT116 mostraron un pequeño incremento de la activación de JNK2 y JNKpan, las cuales son usualmente activadas en respuesta a estrés celular (Vlahopoulos et al, 2004). Sugiriendo, que la señalización de JNK puede ser un efecto compensatorio en esta línea celular contra el tratamiento de C19 (Figura 13, membrana con spots duplicados de cada enzima; y cuantificación de las señales de la membrana en el gráfico de abajo). En contraste, el tratamiento con C19 reduce la fosforilación en un 50% de las cinasas involucradas en la síntesis de proteínas *de novo* como p70s6k, y reduce significativamente la activación de Erk2 en 88.5% (Figura 12B). De manera interesante, el tratamiento con C19 en las células LoVo dependientes de KRAS mostraron una inhibición significativa de la fosforilación de Akt1 (74%) y AktPan (61.7%), y una pequeña disminución de la

fosforilación de Erk1 (4.1%). Además, C19 afecta la fosforilación de los aminoácidos T421/S424 de p70s6k (Figura 13C, y la cuantificación de las señales de la membrana en el gráfico de abajo). De manera interesante, identificamos que después del tratamiento con C19 en ambas líneas celulares, la activación de P38 disminuye del 24-50%. En contraste, en la línea celular normal de colon CCD-18Co, C19 incrementa la señalización de cinasas involucradas en la vía de KRAS4b como Erk1, Akt1 y Akt2 (Figura 12B y 12C). Por lo tanto, todos estos datos sugieren que C19 disminuye la activación de muchas vías dependientes de KRAS4b específicamente en células de cáncer colorrectal.

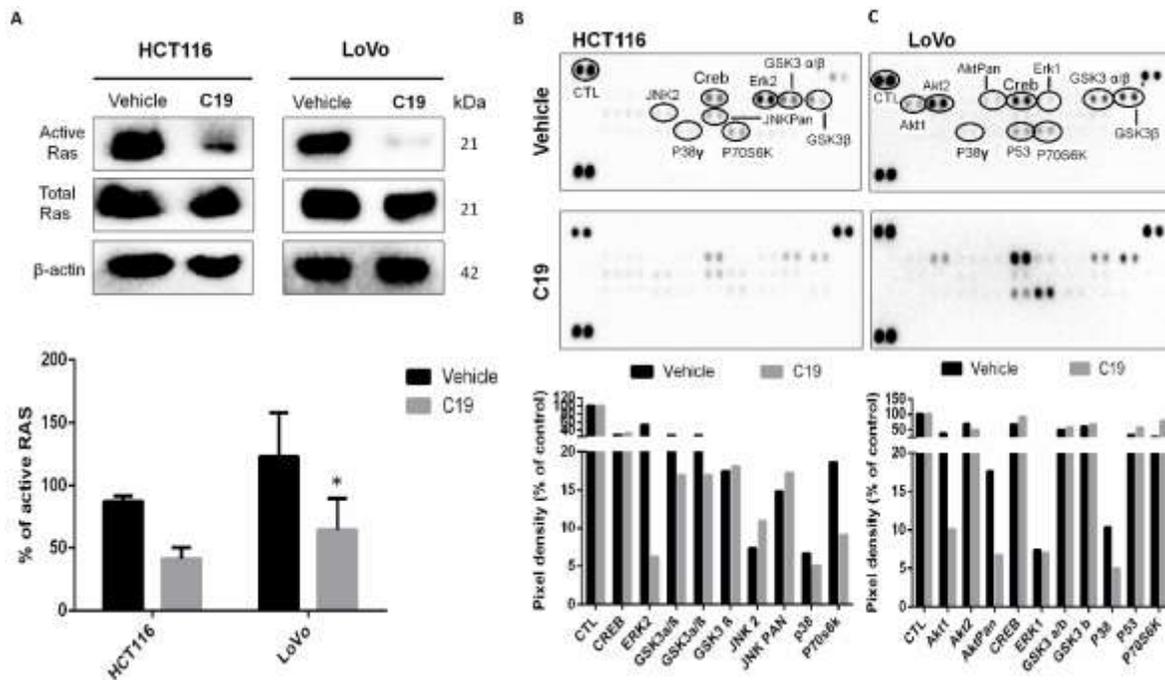


Figura 13.- Efecto del tratamiento de C19 en la activación de RAS y la fosforilación de proteínas de la vía MAPK. **A.** Imagen representativa de western blot de las líneas celulares HCT116 y LoVo tratadas con el vehículo y con C19 (n=3). La extracción de proteína total se puso a interactuar con perlas RAF-RBD. La membrana fue incubada con el anticuerpo anti pan-RAS, para confirmar el pull down de RAS activo. Los extractos totales fueron probados con los anticuerpos como se indica y se muestra el análisis densitométrico en unidades arbitrarias. *p< 0.01 (panel inferior). **B, C** Perfil de proteínas fosforiladas de HCT116 (**B**) y de LoVo (**C**) tratadas con el

vehículo (panel superior) y con la concentración de IC₅₀ de C19 (panel inferior) por 24 h. Después del tratamiento, los lisados totales de las líneas celulares de cáncer se incubaron con las membranas del kit de proteínas fosforiladas humanas Phospho-MAPK descrito en los métodos. Se muestra la cuantificación de las intensidades de los pixeles de las señales por duplicado de una membrana. Los datos se expresan como porcentaje del control (set a 100%).

8.5.- El tratamiento con C19 inhibe el crecimiento tumoral de células LoVo xenotransplantadas.

Dado el efecto citotóxico específico de C19 en la línea celular LoVo, dependiente de KRAS *in vitro*, decidimos probar si C19 exhibe actividad antitumoral en un modelo xenográfico de cáncer colorrectal utilizando a esta línea celular. Para lo cual, el tumor xenográfico fue establecido por la inyección subcutánea de 5×10^6 células LoVo en ratones Nu/Nu hasta que el tumor alcanzó un tamaño de 150 mm³. Después, los ratones fueron tratados con el vehículo, 15 o 30 mg/kg de C19 vía intraperitoneal una vez por día para un periodo total de 12 días. Durante el transcurso de la administración de C19, observamos una disminución significativa en el crecimiento tumoral con ambas concentraciones de C19 mientras que esto no se observó cuando solo se administró el vehículo (Figura 14B panel superior). Los tumores extraídos después de 12 días mostraron que el tratamiento con C19 reduce significativamente el tamaño del tumor (Figura 14B panel inferior). Además de que no se observó ningún cambio significativo en el peso de los ratones con los diferentes tratamientos en todo el transcurso del experimento (Figura 14C).

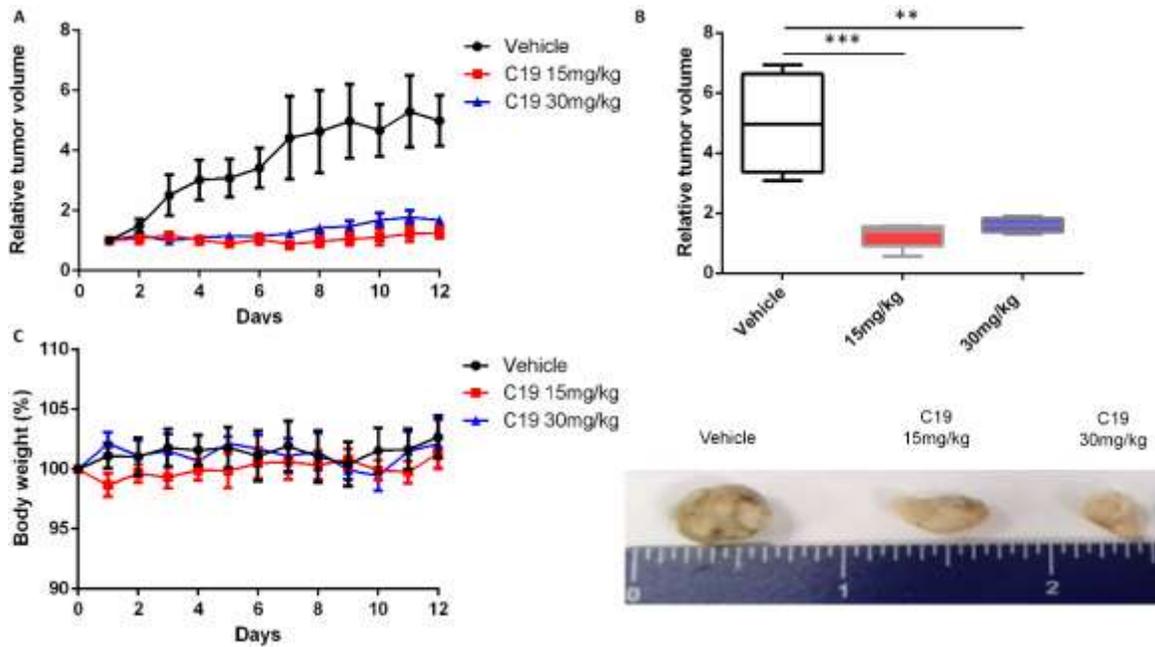


Figura 14.- El tratamiento con C19 reduce el crecimiento tumoral *in vivo*. **A.** El tratamiento con C19 vía intraperitoneal (i.p.) a 15 mg/kg y 30 mg/kg (n = 6) diario, durante 12 días, reduce el crecimiento tumoral en un modelo xenográfico de cáncer colorrectal después de la inyección de células LoVo. Se muestra el porcentaje de la media de los cambios en el volumen relativo final del tumor al volumen inicial. Las barras de error representan el SEM. **B.** Distribución del volumen tumoral después de 12 días de tratamiento con el vehículo o con C19. n = 6 **p < 0.001; ***p < 0.0001 (panel superior). Observación general de los tumores al final del experimento (panel inferior) **(C)** Peso de los ratones medido diariamente durante el tratamiento. C19 en ambas concentraciones probadas, no disminuyó el peso de los ratones comparado con el tratamiento con vehículo. Los datos representan la media ± SEM de al menos tres experimentos independientes.

El análisis inmunohistoquímico de los tumores reveló que C19 reduce significativamente la proliferación celular como lo muestra la tinción con Ki67 (Figura 15A). C19 a la concentración de 15 mg/kg reduce la tinción de Ki67 en un 30-40% y en más del 75% a la concentración de 30 mg/kg (Figura 15B). Para corroborar el efecto de C19 en la proliferación de células tumorales *in vivo*, realizamos un ensayo de Western blot para identificar la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). En efecto, a la concentración de 30 mg/kg de C19, PCNA disminuye

48% (Figura 15C). Además, y corroborando los datos *in vitro*, el tratamiento con C19 incrementa la apoptosis determinada por la tinción de TUNEL. Los tumores tratados con el compuesto C19 a la concentración de 15 mg/kg presentan señales de TUNEL solo en la periferia del tumor (Figura 16A). Por el contrario, las células positivas al marcaje del TUNEL se elevaron significativamente en los tumores tratados con C19 a 30 mg/kg (Figura 16B).

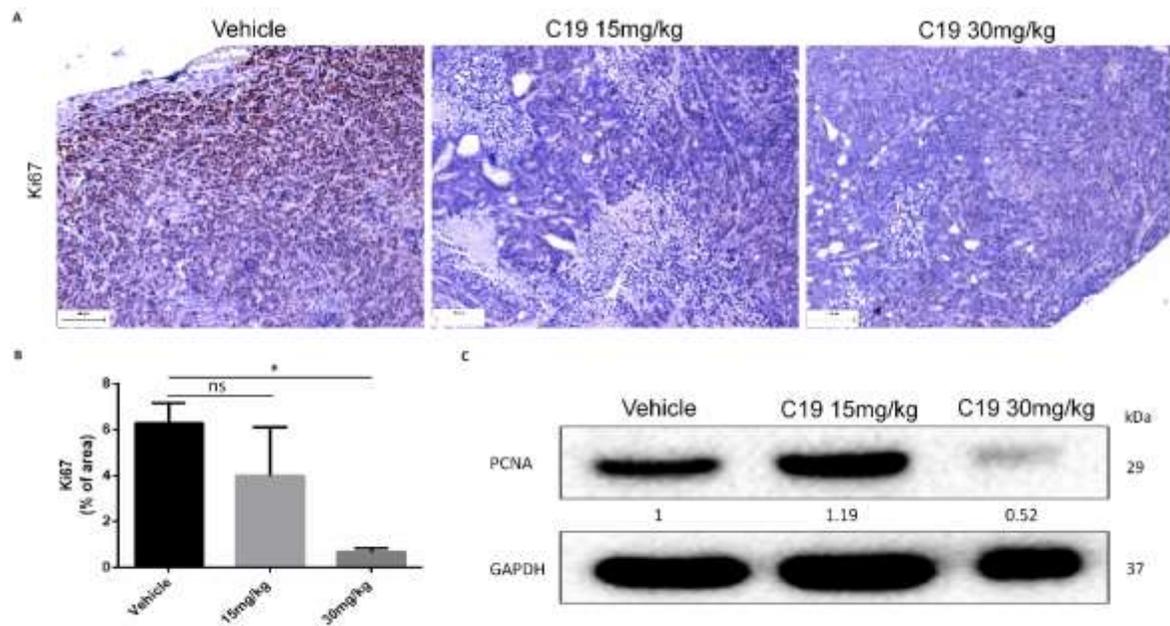


Figura 15.- El tratamiento con C19 inhibe la proliferación celular *in vivo*. **A.** Los tejidos tumorales de los modelos xenográficos fueron evaluados por inmunohistoquímica para Ki67 (como marcador de proliferación). **B.** El gráfico muestra las intensidades de las señales de las células positivas calculado con el software Image Pro Plus. n = 3 *p < 0.05. **C.** Los lisados de los tumores fueron analizados por western blot para los niveles de expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). El análisis densitométrico se realizó con Image Lab 4.0.

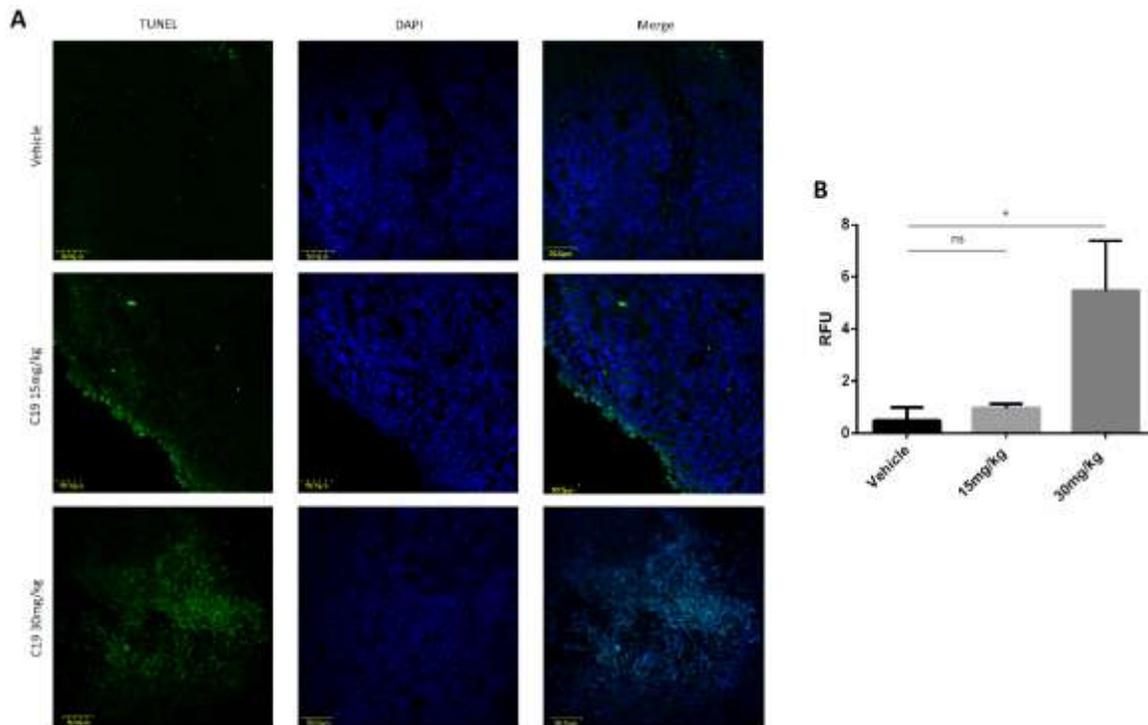


Figura 16.- Tinción de TUNEL de los tumores xenográficos. **A.** Las células apoptóticas y los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). **B.** Las unidades relativas de fluorescencia (RFU) de células apoptóticas (verde) se calcularon con el software Image Pro Plus. $n = 4$ * $p < 0.01$. Las barras de error representan el SEM. Barra de escala = 50 μ M.

8.6.- C19 reduce la fosforilación de Akt y Erk *in vitro* e *in vivo*.

Finalmente, analizamos si C19 previene la fosforilación de Erk1/2 y Akt en los tumores xenográficos derivados de las células LoVo, así como lo observamos *in vitro*. Akt es conocido como un objetivo río abajo de la señalización de KRAS4b activo (Karnoub et al, 2008). En la figura 17A podemos confirmar los datos del ensayo de fosfo-MAPK por Western blot en donde también pudimos observar que el tratamiento con el IC₅₀ de C19 por 24 h inhibe significativamente la fosforilación de Erk1/2 en ambas líneas celulares de cáncer colorrectal. De manera importante, Akt solo se detectó activo bajo condiciones basales en las células LoVo y se inhibió

de manera significativa por C19. El análisis de los extractos de proteína total de los tumores xenográficos mostró niveles similares de Erk1/2 y Akt total en todas las muestras (Figura 17B). De manera importante, el tratamiento con C19 también abolió completamente la fosforilación de Erk1/2 y Akt *in vivo*, y este efecto fue más pronunciado en comparación con el tratamiento con 5-fluorouracilo (5FU).

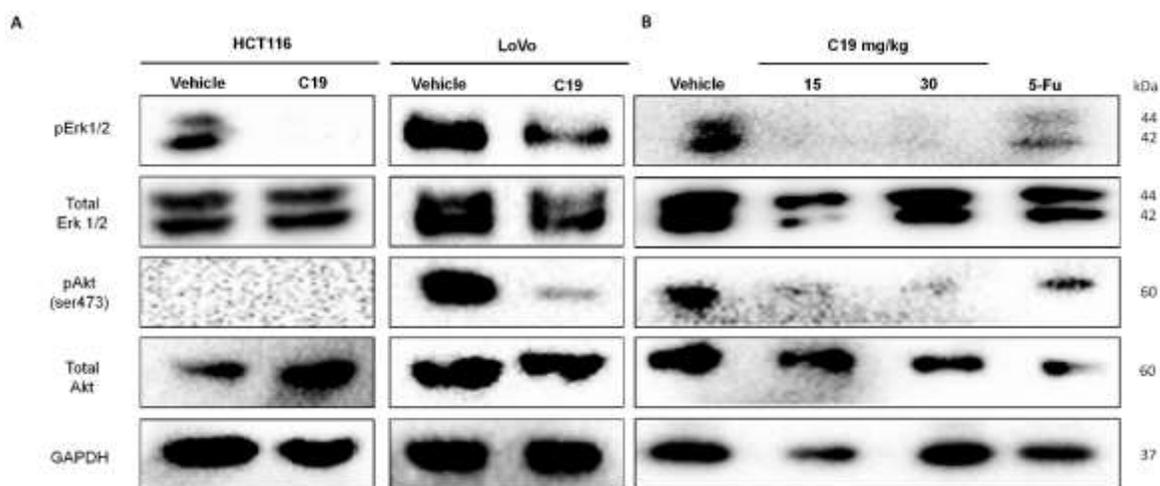


Figura 17.- C19 inhibe la fosforilación de Erk y Akt *in vitro* e *in vivo*. **A.** Los lisados de las líneas celulares HCT116 y LoVo y (**B**) de los tumores fueron analizados por western blot para los niveles de fosforilación de Erk (p-Erk) y Akt (p-Akt). Erk total, Akt total y β -actina se utilizaron como control de carga. Se muestran los blots representativos de tres experimentos independientes.

8.7.- Simulación docking *in silico* del análogo yodado del compuesto C19: I-C19.

Con el propósito de conocer la biodistribución del compuesto C19 y averiguar si tenía efecto en el colon, se procedió a obtener el compuesto C19 yodado (I-C19). Para lo cual se sustituyeron los elementos cloro por yodo. Una vez obtenido el compuesto I-C19, averiguamos si conservaba sus propiedades de unión sobre el complejo KRAS-PED δ , se procedió a realizar las pruebas de *docking* y simulación

de dinámica molecular (MD), como se reportó por nuestro grupo de investigación (Casique-Briseño et al, 2018). Nuevamente, los resultados del *docking* fueron analizados por el *score* de unión, la frecuencia de poses similares y el tipo de interacciones no vinculadas. La inspección visual de las poses del *docking* de I-C19 (azul) muestran interacciones simultaneas con KRAS4b (verde) y PDEδ (rojo) (Figura 18A). En la conformación más frecuente obtenida en el tiempo de simulación equilibrado (50 ns), I-C19 mostró dos interacciones con el ácido glutámico 110 de PDEδ, tres interacciones con el ácido glutámico 63, uno con la lisina 178, una con la alanina 59, y otra más con la glicina 60 de KRAS4b (Figura 18B). Basado en este análisis estructural, procedimos a realizar el análisis de agrupamiento y los cálculos de la energía libre de unión para el complejo KRAS4b-PDEδ-grupo farnesilo-C19 y KRAS4b-PDEδ-grupo farnesilo-IC19. Los resultados obtenidos sugieren que, los valores obtenidos con el compuesto I-C19 fueron energéticamente más favorables entre el complejo KRAS4b-PDEδ y el análogo yodado I-C19 (-102.88 kcal/mol), que con C19 (-87.81 kcal/mol) (Tabla 4), sugiriendo que el compuesto I-C19 es un inhibidor potencial de la activación de KRAS4b.

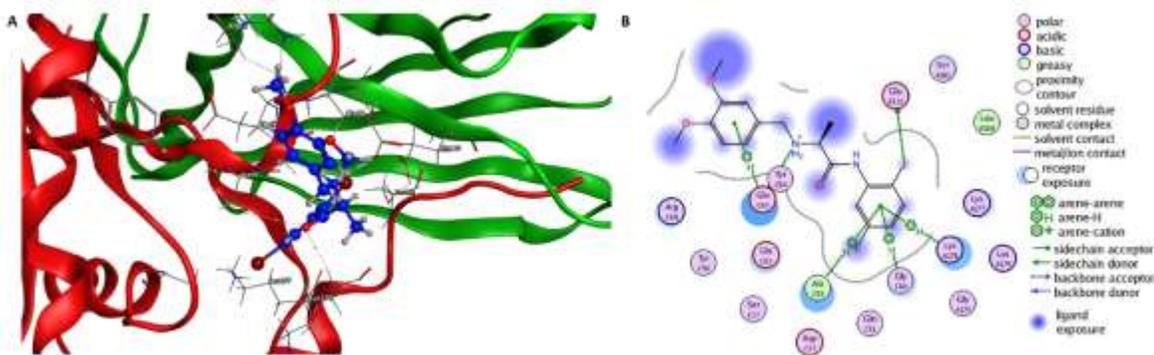


Figura 18.- **A.** Conformación más frecuente de I-C19 (azul) en el complejo KRAS4b-PDEδ (rojo-verde) durante la simulación MD. **B.** I-C19 presenta dos interacciones con PDEδ y seis con KRAS4b.

La energía libre de unión y los términos de energía individuales de los complejos comenzaron a partir de conformaciones acopladas (kcal/mol). Se muestran las contribuciones polares ($\Delta E_{\text{polar}} = \Delta E_{\text{ele}} + \Delta G_{\text{ele,sol}}$) y no polares ($\Delta E_{\text{non-polar}} = \Delta E_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{npol,sol}}$). Todas las energías son promediadas sobre 500 conformaciones instantáneas, a intervalos de tiempo de 100 ps, de al menos 50 ns de toda la simulación MD, y están dadas en kcal/mol (\pm desviación estándar).

Tabla 4.- Componentes de la energía libre de unión de los complejos proteína-ligando (kcal/mol).

Proteína-ligando							
Sistema	ΔE_{vdw}	ΔE_{ele}	$\Delta G_{\text{ele,sol}}$	$\Delta G_{\text{npol,sol}}$	$\Delta E_{\text{non-polar}}$	ΔE_{polar}	ΔG_{bind}
KRAS4b-PDEδ-C19	-137.3 (0.2)	-1236.3 (5.3)	1304.6 (5.8)	-18.7 (0.04)	-156.1	68.3	-87.8 (0.5)
KRAS4b-PDEδ-I-C19	-150.2 (8.5)	-1369.0 (79.8)	1438.0 (75.2)	-21.7 (0.9)	-171.9	69.0	-102.8 (10.4)

8.8.- Estudios de citotoxicidad *in vitro* del análogo yodado I-C19.

Para determinar qué tan citotóxico era el compuesto I-C19 nuevamente se utilizaron las líneas celulares de cáncer colorrectal HCT116, LoVo y SW620. Las líneas celulares contienen la mutación de KRAS4b en G12 y G13. La línea celular HCT116 se utilizó como control negativo ya que se considera independiente de KRAS4b. Mientras que las líneas celulares LoVo y SW620 se consideran dependientes de la señalización de KRAS4b (Singh et al, 2012). La línea celular CCD-18Co también se utilizó como control de células de colon sano, las cuales tuvieron un IC_{50} del compuesto I-C19 de 171.1 μM (Figura 19), mientras que la línea celular HCT116 mostró un IC_{50} de 88.24 μM (Figura 20A). En contraste las líneas celulares dependientes de KRAS4b presentaron un IC_{50} de 18.39 μM para LoVo y de 68.28 μM para la línea celular SW620 (Figuras 20B y 20C, respectivamente).

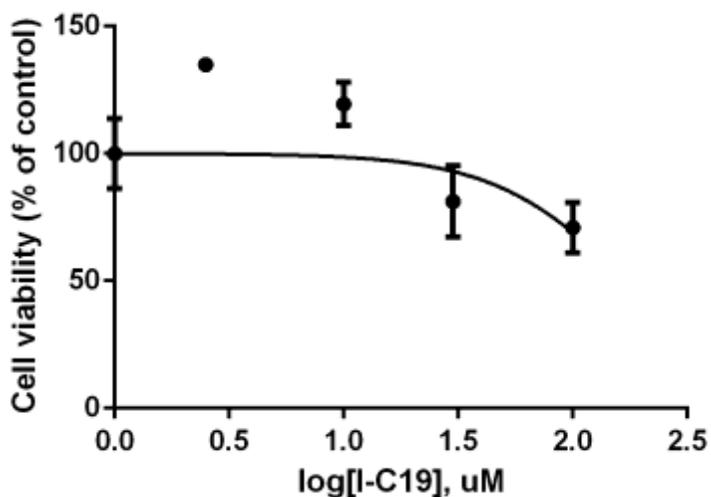


Figura 19.- Curva dosis-respuesta del compuesto I-C19 en la línea celular CCD-18Co de miofibroplastos de colon sano.

Subsecuentemente, se realizó el marcaje del compuesto I-C19 con el yodo radiactivo (I^{131}), con el propósito de conocer su biodistribución. A este nuevo compuesto se le llamó ^{131}I -C19. El marcaje radiactivo de I-C19 con ^{131}I (Figura 21) se realizó a través de una sustitución isotópica. La pureza radioquímica del compuesto ^{131}I -C19 fue del 95%, evaluado por radio-HPLC de fase-reversa; el tiempo de retención fue de 15.3 ± 2 min (Figura 21; superior derecha).

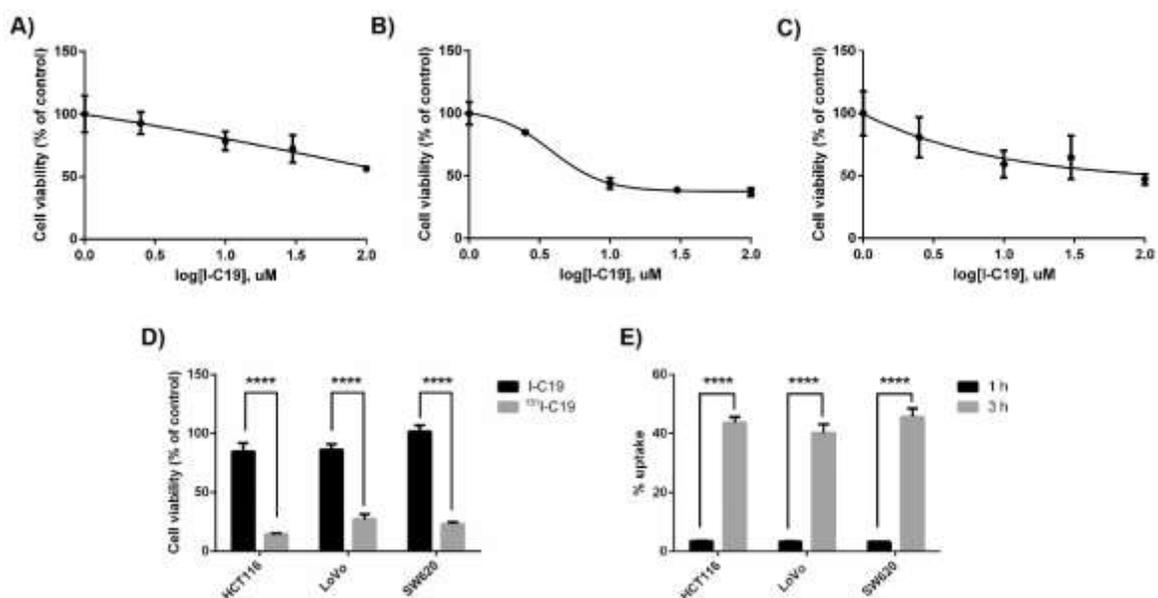


Figura 20.- **A.** Las líneas celulares de cáncer colorrectal HCT116, **B.** LoVo y **C.** SW620 fueron tratadas con las concentraciones indicadas de I-C19 por 72 h. **D.** El tratamiento con ^{131}I -C19 a una concentración de 1.8 μ M reduce significativamente la viabilidad de las tres líneas celulares de cáncer colorrectal en comparación con I-C19 sin marcaje radiactivo. **E.** Experimentos de captación con ^{131}I -C19. Después de la incubación por 1 y 3 h, la captación de ^{131}I -C19 por células de cáncer se incrementó significativamente. n = 3; ****p < 0.0001.

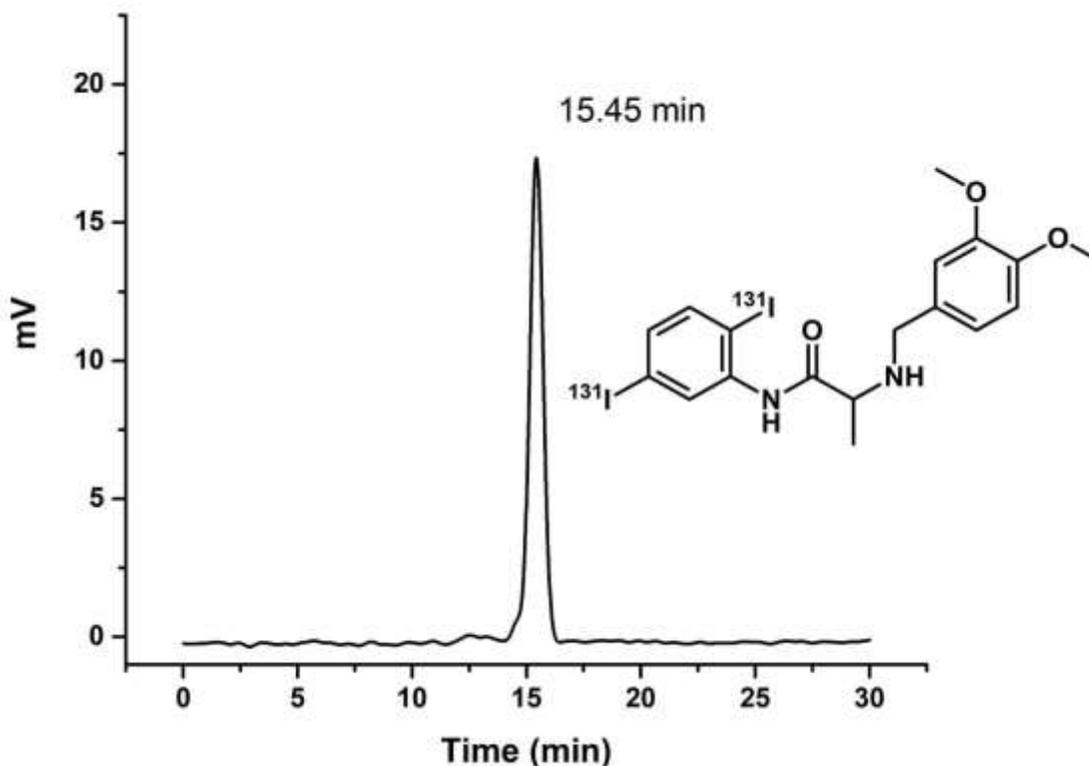


Figura 21.- Cromatograma de radio-HPLC de fase reversa del radiofármaco ^{131}I -C19. Esquema general de I-C19 marcado con ^{131}I (superior derecha).

8.9.- Captación celular y dosis absorbida de radiación del compuesto [^{131}I]-C19.

Posteriormente el compuesto ^{131}I -C19 se añadió a las líneas celulares y la captación se determinó por detección de la radioactividad por líquido de centelleo. Los datos obtenidos indican que el compuesto ^{131}I -C19 se acumuló en las líneas celulares de cáncer colorrectal de manera dependiente de tiempo (Figura 20E). La captación total se incrementa significativamente en las primeras tres horas de incubación. A las tres horas post-incubación, se internaliza un total de radiactividad de $43.6 \pm$

4.7%, $40.2\% \pm 6.4\%$ y $45.6\% \pm 6.7\%$ en las células HCT116, LoVo y SW620, respectivamente (Figura 20E).

Una vez que se había establecido que a las tres horas se internalizaba casi el 50 % del compuesto en las tres líneas celulares se procedió a determinar la eficacia del compuesto marcado (quimio y radioterapia) sobre las líneas de cáncer de colon. Para esto las líneas celulares HCT116, LoVo y SW620 fueron expuestas al compuesto [^{131}I]I-C19 a una concentración de $1.8 \mu\text{M}$ (1.44 Bq/célula). Los resultados de este ensayo mostraron que el compuesto radiomarcado redujo significativamente la viabilidad de las células de cáncer, comparado con la viabilidad que se obtuvo a las 72 h con el compuesto sin marcar I-C19 a la misma concentración (Figura 20D). Esto nos sugiere que hay un efecto sinérgico de la quimioterapia y la radioterapia producida por [^{131}I]I-C19. Lo cual se corroboró cuando se utilizaron las dosis de I-C19= $1.8 \mu\text{M}$ y las dosis de radiación absorbida de 1.88, 2.88 y 0.43 (dosis sub-letales) en las células HCT116, LoVo y SW620, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5.- Dosis de radiación absorbida producida por Bq/célula de [¹³¹I]I-C19 en el núcleo de las células de cáncer HCT116, LoVo y SW620.

Línea celular	Captación Número total de transformaciones nucleares (Bq.s)	Internalización Número total de transformaciones nucleares (Bq.s)	Dosis absorbida (Gy)	
			$D_{N \leftarrow CS}$	$D_{N \leftarrow Cy}$
HCT116	20232	471.6	1.77	0.11
LoVo	16092	9180	1.45	1.43
SW620	4248	367.2	0.38	0.05

8.10.- Ensayo γ -H2AX: detección del rompimiento de la doble cadena del DNA.

Los resultados del ensayo de viabilidad sugieren que I-C19 presenta un efecto citotóxico mayor en las células de cáncer colorrectal, comparado con C19. Además, de que [¹³¹I]I-C19 presentó 10 veces más efectividad que el compuesto I-C19.

Con el objetivo de averiguar si los análogos yodados I-C19 e ¹³¹I-C19 promueven el rompimiento de la doble cadena del DNA (DSB), realizamos ensayos de inmunofluorescencia empleando a la variante de la histona H2AX (γ -H2AX) la cual identifica los focos en donde el DNA presenta daños. Este rompimiento es usualmente promovido por agentes químicos exógenos o radiación ionizante, y puede promover inestabilidad genética y apoptosis (Jackson-Bartek, 2009). Los datos obtenidos indican que, en efecto, el tratamiento con I-C19 induce un

incremento en la cantidad de focos de γ H2AX en las líneas celulares de cáncer (Figura 22A; panel central). Aunque en las tres líneas celulares, no se aprecia una diferencia significativa entre la respuesta después del tratamiento con el vehículo e I-C19. la cantidad de focos de daño al DNA fue significativamente mayor cuando las células HCT116, SW620 y LoVo fueron tratadas con [131 I]I-C19, con respecto a las células que fueron tratadas con el compuesto no marcado I-C19 (Figura 22A; panel derecho). Para las líneas celulares dependientes de KRAS4b (las células LoVo y SW620), los focos de γ H2AX fueron de 2.3 y 2.1 veces más alto cuando se comparó con células tratadas con el compuesto I-C19 y [131 I]I-C19 a la misma concentración. Sin embargo, la línea celular independiente de KRAS4b HCT116 mostró al menos cinco veces más (I-C19 vs 131 I-C19) focos de γ H2AX en condiciones similares (Figura 22B).

Al mismo tiempo, el efecto de la radiación (131 I-C19) se observó de igual manera para ambas líneas celulares dependiente de KRAS4b, LoVo y SW620. Consecuentemente, el efecto de I-C19, combinado con el efecto de la radiactividad, promueven daño al DNA en células de cáncer colorrectal dependientes e independientes de KRAS4b.

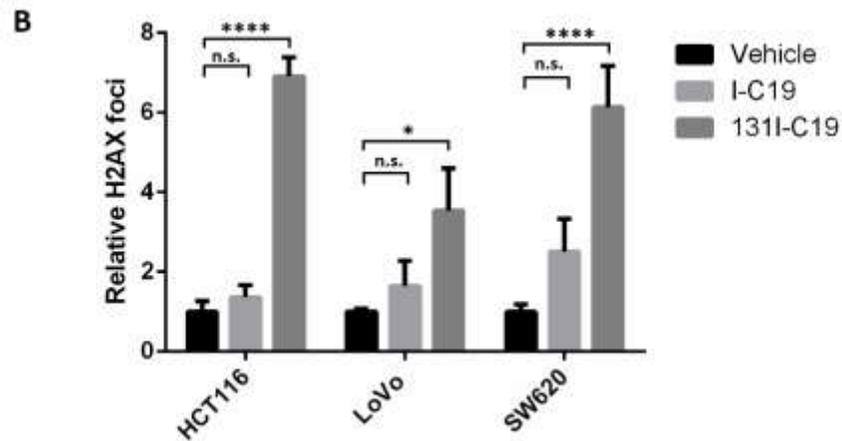
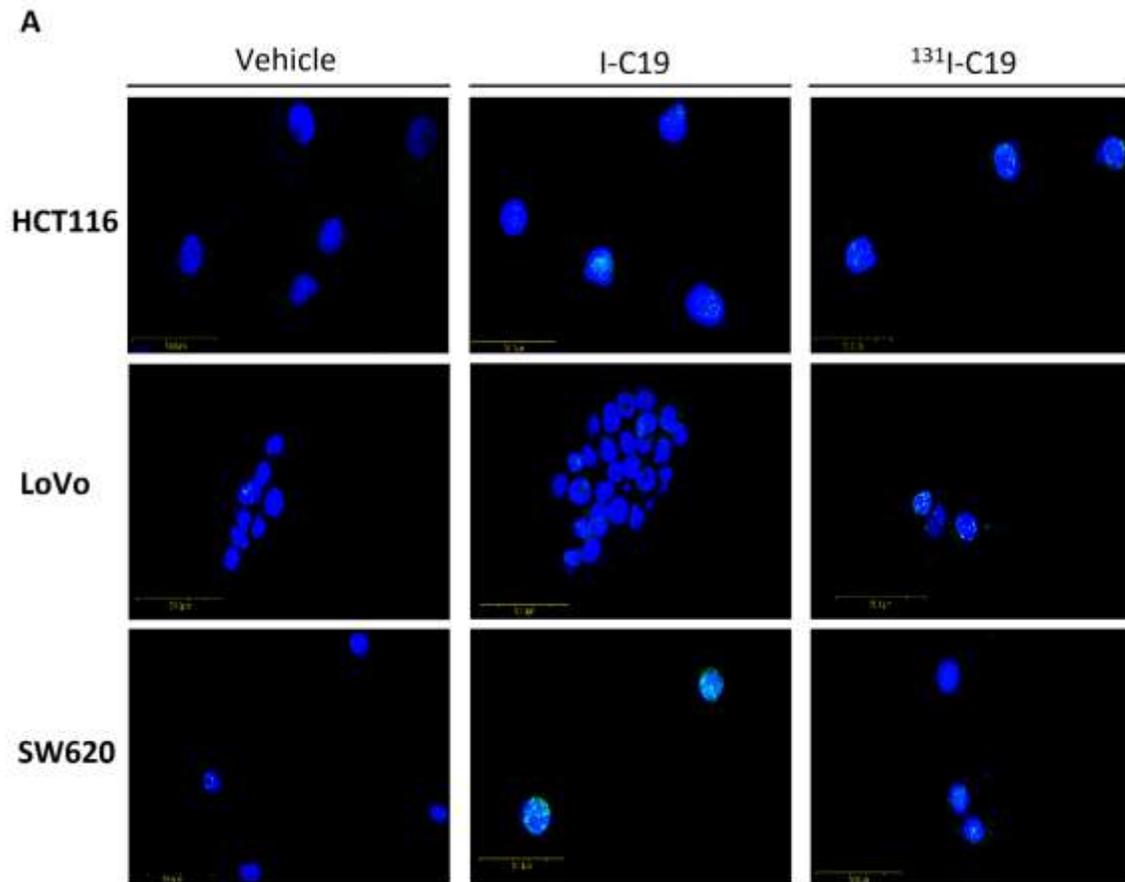
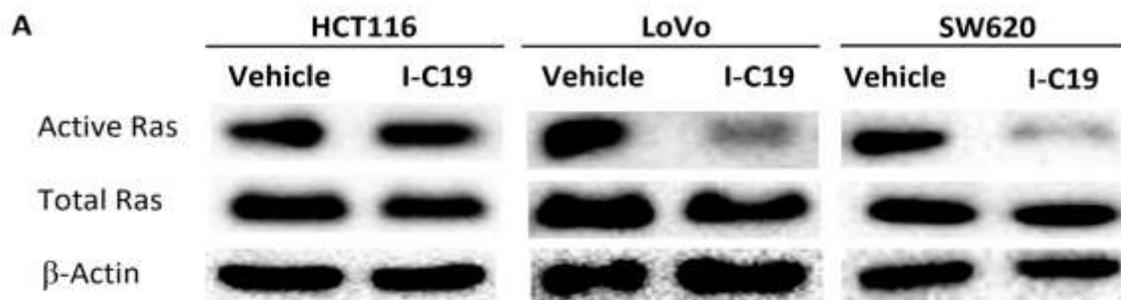


Figura 22.- **A.** Imágenes representativas de microscopía confocal, mostrando los focos de γ -H2AX en el núcleo (DAPI) de células de cáncer colorrectal tratadas con el vehículo, IC₅₀ de I-C19 y ¹³¹I-C19 (un décimo de la concentración del IC₅₀ para cada línea celular) por tres horas. **B.** Focos relativos de γ -H2AX de células de cáncer tratadas con I-C19, ¹³¹I-C19, y células control. Los datos están representados como la media \pm SEM de tres experimentos independientes **p* < 0.1, *****p* < 0.0001.

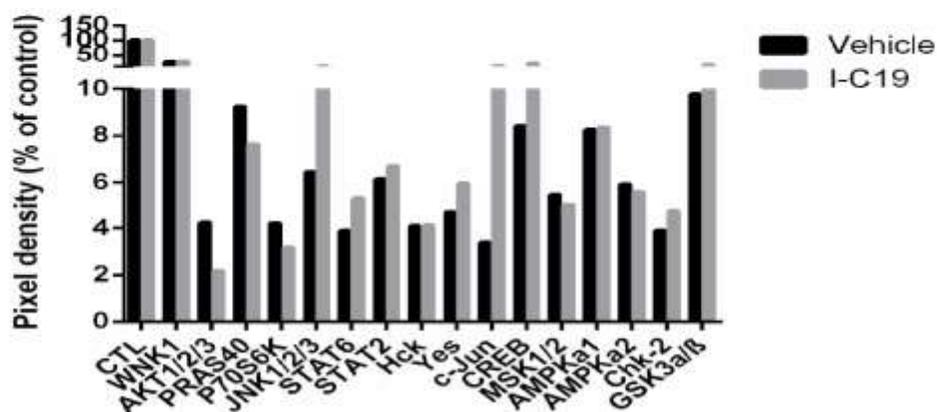
8.11.- Pull down GTP-RAS y arreglo de fosfo-cinasas.

Para determinar si la inhibición de la viabilidad y el rompimiento de la doble cadena de DNA de las células de cáncer colorrectal fueron producidas por la inhibición de la activación de KRAS4b y por lo tanto de sus vías de señalización, decidimos examinar la propiedad de I-C19 para prevenir la unión de RAS al GTP, y también fue examinada la activación de algunas de las cinasas más importantes de la vía de señalización de RAS. Después del tratamiento con el IC₅₀ de I-C19, la concentración de RAS-GTP disminuye en más del 80% en las líneas celulares LoVo y SW620 (Figura 23A; panel derecho). Como se esperaba, la línea celular independiente de KRAS4b no mostró disminución de RAS activo (Figura 23A; panel izquierdo). Para detectar si I-C19 disminuye la fosforilación de cinasas involucradas en la señalización de KRAS4b, se empleó un microarreglo de fosfo-cinasas. En la línea celular HCT116, el tratamiento con I-C19 redujo en 50% la fosforilación de AKT1/2/3 (Figura 23B). No obstante, I-C19 induce un incremento de la fosforilación JNK1/2/3, de 155%, el cual, promueve la fosforilación del factor de transcripción CREB y c-Jun en las células HCT116. Por otra parte, el tratamiento con I-C19 reduce la fosforilación de AKT1/2/3 (-57.7%), Erk 1/2 (-53.4%) y AMPka1 (58.1%) en la línea celular LoVo y reduce la fosforilación inhibitoria de GSKα/β (S21/S9), involucrados en la vía de WNT (Figura 23C). Además, I-C19 reduce la fosforilación de AKT1/2/3 en la serina 473 (-92.6%), en la treonina 308 (-25%) y AMPka (-70%) en la línea celular SW620 (Figura 23D). De manera más notable, el tratamiento con I-C19 reduce la fosforilación del oncogén WNK1 (el cual está sobre-expresado en el cáncer colorrectal, y está involucrado en la regulación del metabolismo) en niveles

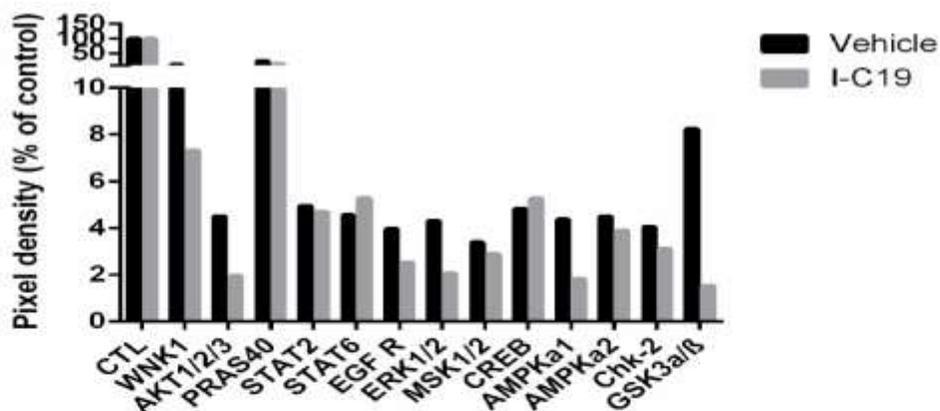
de 38.6% y 32.6% en las líneas celulares LoVo y SW620, respectivamente. Por lo que todos estos resultados indican que el tratamiento con I-C19 reduce la concentración de RAS-GTP y además reduce la fosforilación de cinasas involucradas en la señalización de KRAS4b en las líneas celulares LoVo y SW620.



B HCT116



C LoVo



D SW620

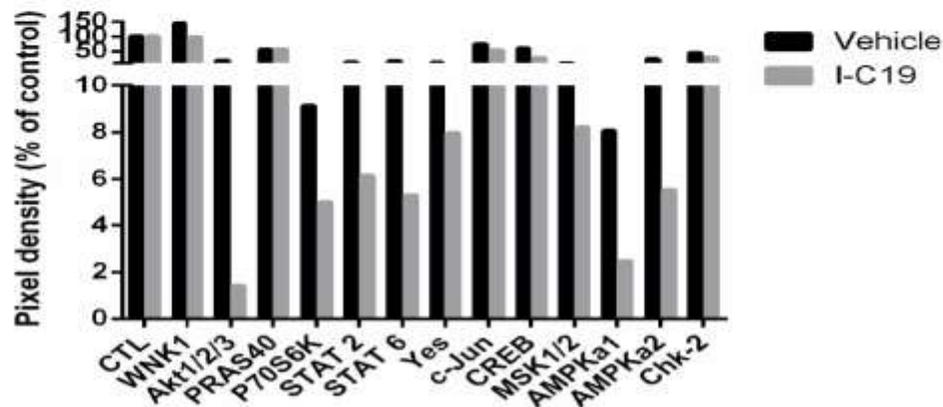


Figura 23.- **A.** Ensayo de pull down RAS-GTP en tres líneas celulares de cáncer colorrectal tratadas con el vehículo y con el IC₅₀ de I-C19 por 24 h. Ras total y β -actina se utilizaron como control de carga (blots cortados). Arreglo de cinasas fosforiladas de los extractos de proteína total de las líneas celulares de cáncer colorrectal **B.** HCT116, **C.** LoVo y **D.** SW620 tratadas con el IC₅₀ de I-C19 por 24 h. Densidad de los pixeles (% sobre el control).

8.12.- I-C19 inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*.

Para determinar si el compuesto I-C19 induce una disminución de las células neoplásicas *in vivo*, utilizamos el modelo de cáncer colorrectal *in situ* con AOM/DSS. A la semana 50, después de la inyección de 10 mg/kg de AOM y dos ciclos de DSS, el análisis histológico mostró el desarrollo de una lesión neoplásica de linaje glandular en el colon de los ratones. Glándulas aberrantes forman esta lesión; las células que las forman presentan núcleos atípicos con nucléolos evidentes y muestran pérdida de la producción de moco (Figura 24A). Para checar si I-C19 puede disminuir los tumores del colon inducidos por AOM y DSS, los ratones fueron tratados con el vehículo, con el compuesto C19 y con el compuesto I-C19. Nuestros resultados mostraron que después del tratamiento con el vehículo, el porcentaje de adenocarcinoma colorrectal en los ratones fue del 7-8%, mientras que en los ratones tratados con C19 mostraron un porcentaje de adenocarcinoma colorrectal del 5-6%. Sin embargo, el tratamiento con I-C19 reduce significativamente la tasa de adenocarcinoma colorrectal (3-4%) (Figura 24A). En el modelo de AOM/DSS los ratones fueron tratados con I-C19 durante 12 días, y no hubo diferencias significativas en el peso corporal de los ratones (Figura 24B). Para la evaluación del efecto de I-C19 en el grado de malignidad de los tumores y la proliferación de las células de cáncer colorrectal, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica

utilizando el antígeno carcinoembrionario (CEA) y el marcador de proliferación intrínseco Ki67. El tratamiento con I-C19 reduce significativamente el marcador CEA (7.5% del tejido neoplásico), cuando lo comparamos con el tratamiento con C19 (12.5%) y el vehículo (65% del tejido neoplásico) (Figura 24C; panel superior). Además, I-C19 redujo en un 20% la proliferación de las células neoplásicas en el colon de los ratones, medido con el marcador Ki67 (Figura 24C; panel inferior).

Para corroborar nuevamente la eficacia del compuesto I-C19 en el modelo de cáncer colorrectal xenográfico con células LoVo. Los tumores generados en los ratones Nu/Nu fueron tratados con 30 mg/kg de I-C19 por 12 días y los tumores fueron medidos con un caliper. Como se observa en la figura 25B a partir del día 10 al 12, el tratamiento con I-C19 inhibe significativamente el crecimiento tumoral (Figura 25A-B). El tratamiento con I-C19 no reduce el peso corporal de los ratones durante los 12 días de tratamiento (Figura 25C). En el análisis inmunohistoquímico, las células positivas al CEA fueron ampliamente detectadas en los tumores tratados con el vehículo, y el tratamiento con I-C19 reduce significativamente las células positivas al marcador CEA (Figura 25D y 25E; panel superior). Por consiguiente, I-C19 suprime la proliferación celular medido a través del marcaje con el anticuerpo Ki-67 (Figura 25D y 25E; panel central). Vale la pena señalar que detectamos un aumento en la caspasa-3 procesada en los tumores tratados con I-C19 (Figura 25D y 25E; panel inferior).

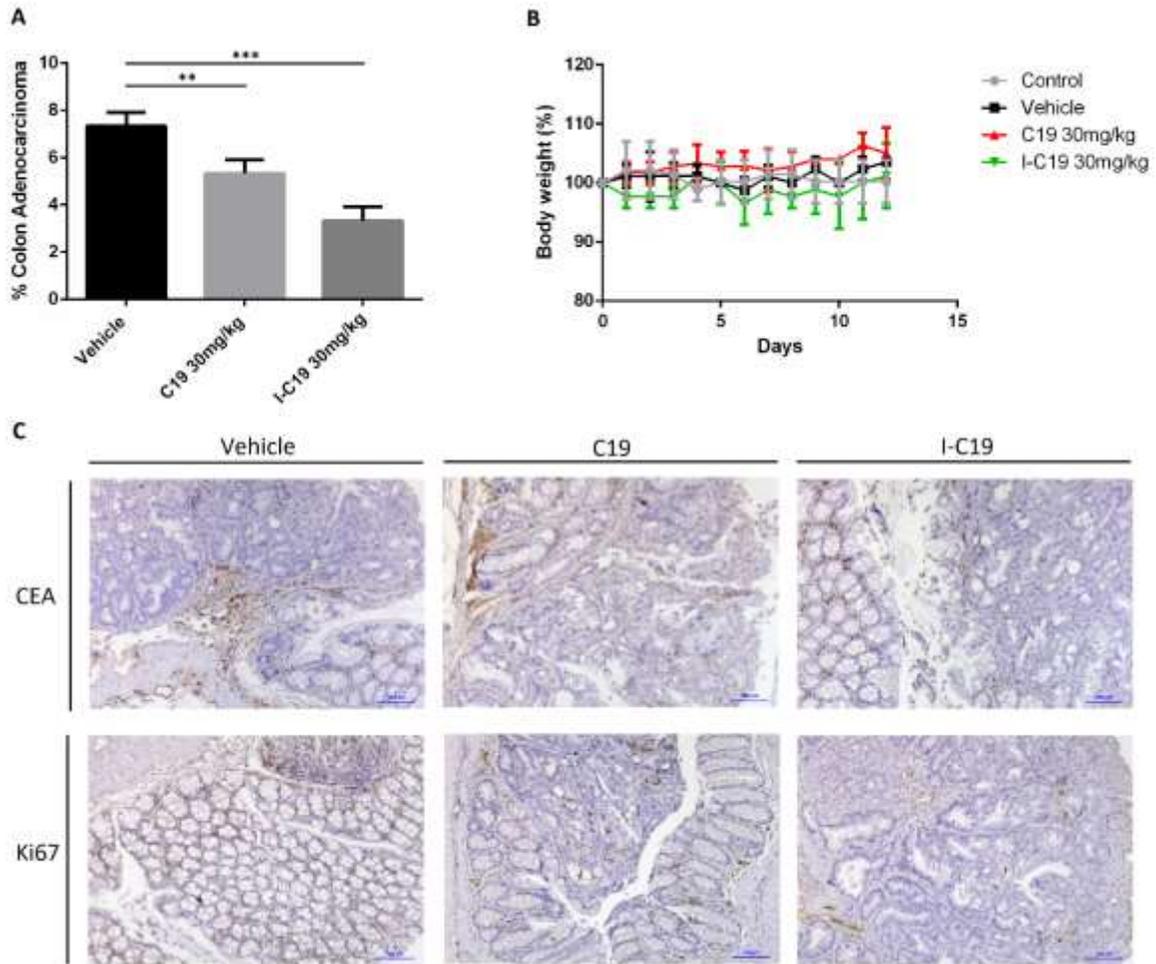


Figura 24.- **A.** Efecto del tratamiento con I-C19 en el crecimiento tumoral en ratones tratados con AOM/DSS. Porcentaje de adenocarcinomas colorrectales en los ratones. Los ratones fueron tratados con C19 (30 mg/kg) o I-C19 (30 mg/kg) vía intraperitoneal todos los días por 12 días. **B.** Porcentaje del peso de los ratones tratados con AOM/DSS, medido cada día durante el tratamiento. **C.** Imágenes representativas del marcaje de IHQ para CEA y Ki67 en los tejidos colorrectales.

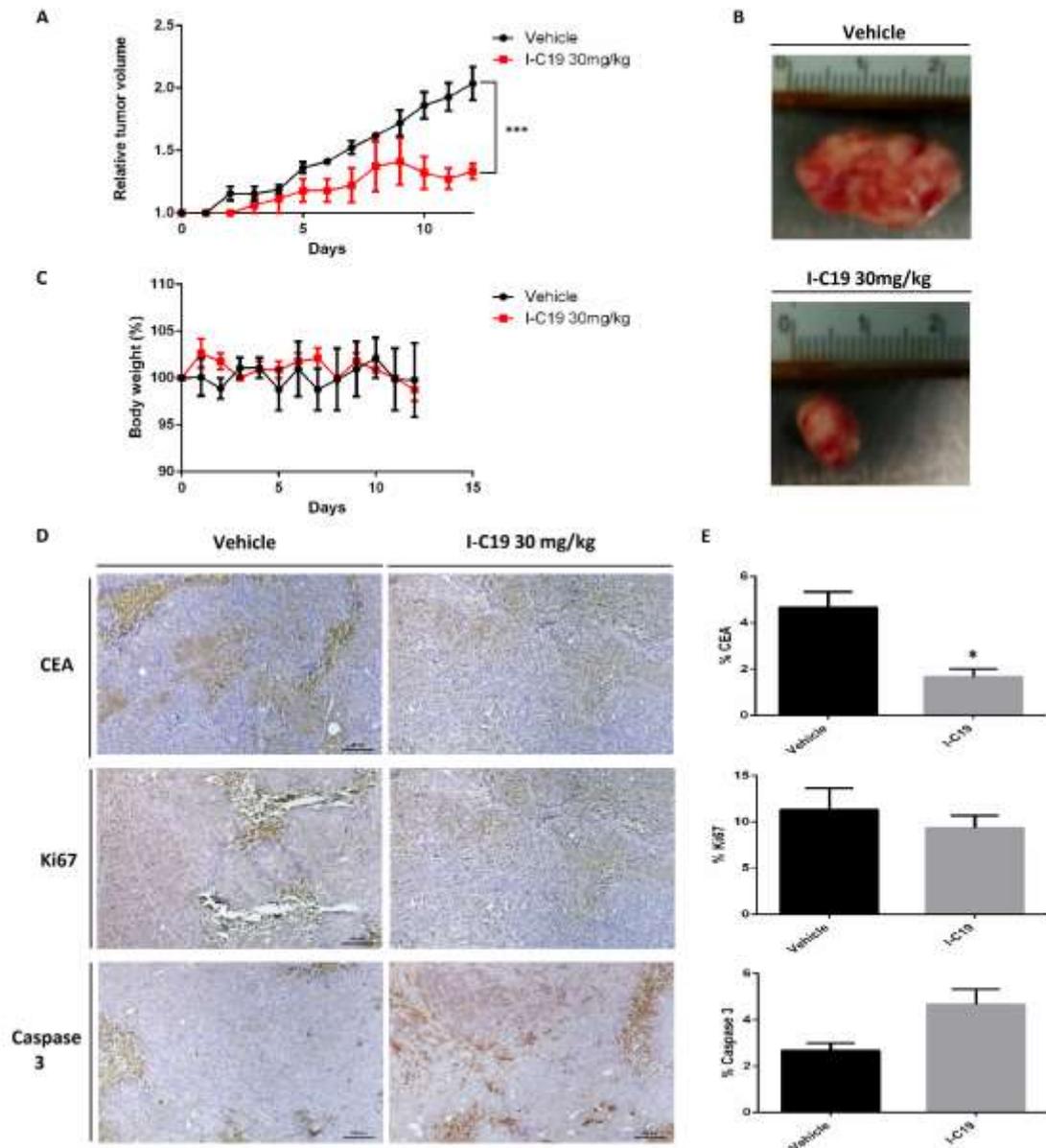


Figura 25.- **A.** I-C19 fue administrado todos los días durante 12 días a una concentración de 30 mg/kg. El volumen tumoral fue medido diario y se estimó con la fórmula ($V = \frac{1}{2} \times D \times d^2$), $***p < 0.001$. **B.** Imágenes representativas del volumen tumoral después de la disección, $n = 4$. **C.** Porcentaje del peso corporal de los ratones medido cada día durante el tratamiento. **D.** Imágenes representativas del marcaje de IMQ para CEA, Ki67 y caspasa-3 escindida en los tejidos tumorales xenográficos. **E.** Los gráficos muestran el porcentaje de tejido neoplásico positivo a la tinción, $*p < 0.1$.

8.13.- Biodistribución.

Con el objetivo de conocer si el compuesto se distribuía preferencialmente en el tumor, realizamos el estudio de biodistribución. Este estudio consiste en una inyección única vía intraperitoneal de [^{131}I]-C19 en ratones Nu/Nu xenotransplantados con células LoVo. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados a diferentes tiempos, para la extracción de los órganos de interés.

Los resultados obtenidos de los estudios de biodistribución muestran que el radiofármaco mostró buena captación en el tumor de células LoVo en los ratones atímicos. Además, ^{131}I -C19 mostró un incremento en la captación a partir de primera y la tercera hora (Figura 26). En todos los órganos, el promedio del porcentaje de la dosis inyectada (%ID) de [^{131}I]-C19 disminuyó en paralelo (Tabla 6). A las 24 h después de la administración intraperitoneal, la dosis de radiación de ^{131}I -C19 en la sangre fue cinco veces menor que la dosis en el tumor.

Además, se demostró que el compuesto se acumula o distribuye preferencialmente en el hígado y riñón (Figura 26). Los riñones fueron los órganos que recibieron la dosis de radiación más alta por MBq de radiactividad administrada (5.04 mGy/MBq); el colon recibió 0.46 mGy/MBq y el hígado recibió 1.45 mGy/MBq. La dosis máxima tolerada reportada para los riñones es de 25-40 Gy, así que no se espera que la administración de ^{131}I -C19 vía intraperitoneal provoque radiotoxicidad severa. La dosis de radiación depositada en el colon fue menor que en el hígado (1.45 mGy/MBq) o que en el páncreas (1.61 mGy/MBq). La dosis absorbida máxima fue observada en el tumor (76.06 mGy/MBq) (Tabla 6).

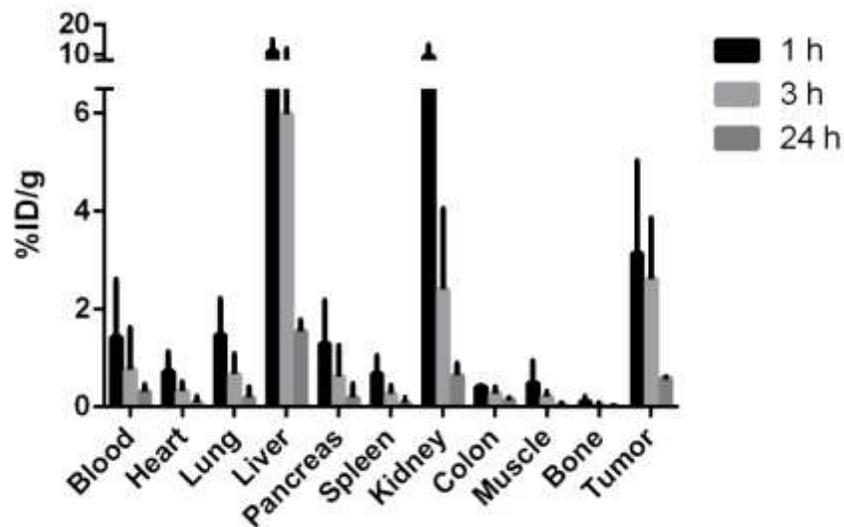


Figura 26.- Distribución en los órganos expresado como %ID/g de tejido a la 1, 3 y 24 h pos-inyección (^{131}I -C19). El perfil de distribución de los órganos muestra que la captación de ^{131}I -C19 en hígado, riñones y tumor, indica la funcionalidad y especificidad.

Tabla 6.- Modelo biocinético y dosis absorbida de radiación producida por MBq de ¹³¹I-C19 a órganos específicos y tumor (administración intraperitoneal).

Organo	Número total de desintegraciones nucleares $N = \int_0^{\infty} A_h(t) dt$ (MBq.s)	Dosis absorbida (Gy)
Hígado	3816	0.34
Páncreas	399	0.18
Riñón	1796	0.12
Colon	504	0.14
Pulmón	421	0.40
Bazo	151	0.19
Tumor	7020	3.55

8.14.- Ensayo de micronúcleos.

Para medir el daño en la estructura cromosomal o cromosomas rezagados en los eritrocitos inmaduros de medula ósea, se evaluó la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNPCEs) (Jain-Pandey, 2019). Encontrándose un incremento pronunciado en la frecuencia de MNPCEs en los animales tratados con 5-FU (27 ± 4), comparado con el vehículo (7 ± 2) (Figura 27A y 27B; panel izquierdo). La media de los datos obtenidos a las 24 h de tratamiento mostró un incremento, pero no un número significativo de MNPCEs, en el tratamiento de 30 mg/kg de C19 12 ± 1 y de I-C19 11 ± 2 (Figura 27A y 27B; panel derecho). Por lo que estos datos indican que ambos compuestos (C19 e I-C19) no provocan toxicidad en medula ósea.

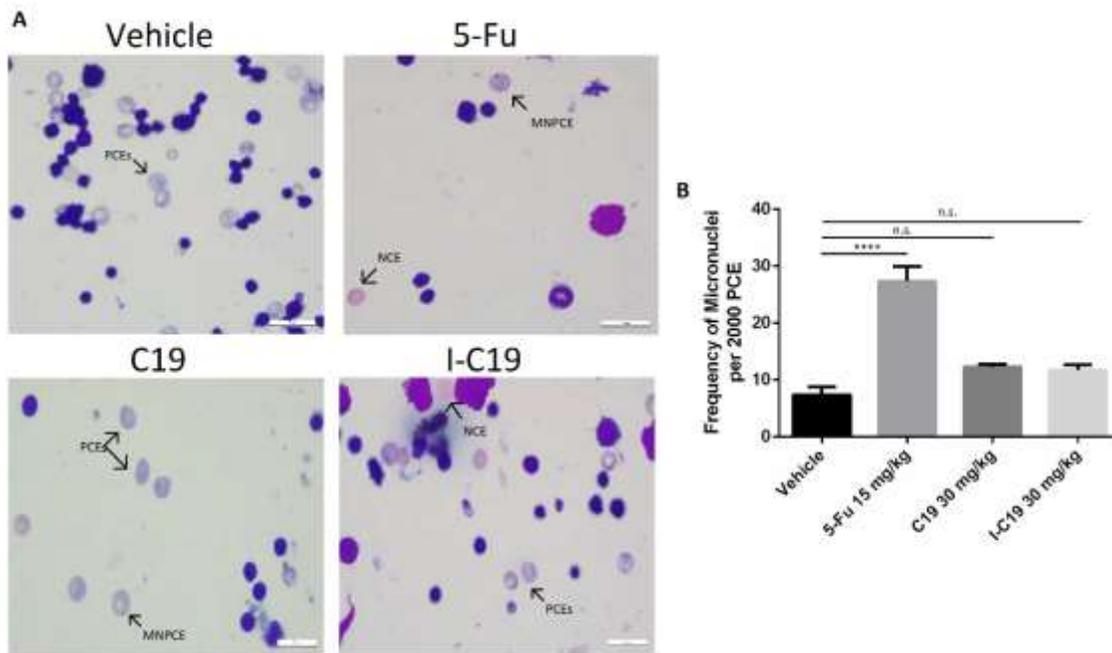


Figura 27.- **A.** Imágenes representativas de células de médula ósea de ratones después de 24 h de una inyección única de 15 mg/kg de 5-FU y 30 mg/kg de C19 e I-C19. Las flechas muestran los eritrocitos policromáticos (PCEs), micronúcleos de eritrocitos policromáticos (MNPCE) y eritrocitos normocromático (NCE). **B.** Valores del conteo de micronúcleos de células de medula ósea. Se presentan los datos como media \pm SEM de cuatro experimentos independientes ****p < 0.0001, no-significativo (n.s.).

9.- Discusión.

El cáncer colorrectal metastásico es uno de los tipos de cáncer más letales, y esta patología tiene pocas opciones de tratamiento cuando la proteína KRAS4b se encuentra mutada. En el presente estudio, desarrollamos una estrategia nueva para inhibir selectivamente la actividad de KRAS4b mutado. Utilizando estudios bioinformáticos como el *docking* y la simulación MD, detectamos que C19 se une y estabiliza el complejo molecular KRAS4b-PDEδ por la unión a la interfaz del heterodímero. En años recientes, varios investigadores intentaron inhibir selectivamente una u otra proteína del complejo molecular KRAS4b-PDEδ. Han sido desarrolladas moléculas que irreversiblemente se unen a KRAS mutado (Ostrem et al, 2013). La unión de estos inhibidores interrumpe ambos *switches* de KRAS (I y II) alterando la preferencia de los nucleótidos nativos en favor de GTP sobre GDP. Una de las desventajas es que estas moléculas pequeñas solo funcionan con la mutación de KRAS G12C. Además, esta mutación no es prevalente en el cáncer colorrectal y los autores no realizaron la evaluación *in vivo*.

En este trabajo seleccionamos al compuesto C19 por su capacidad de unirse al complejo KRAS4b-PDEδ, lo que sugiere que no interfiere con el *switch* si no que estabiliza el complejo, aumentando así la energía libre de unión del sistema KRAS4b-PDEδ-Far-C19 comparado con el sistema KRAS4b-PDEδ-Far. Otras estrategias se han basado en el *pocket* hidrofóbico de PDEδ para inhibir la unión a KRAS4b y con esto inhibir su transporte a la membrana plasmática. Por ejemplo, el compuesto Deltarasin puede unirse al *pocket* hidrofóbico de PDEδ e inhibir

selectivamente la viabilidad de células de cáncer ductal pancreático dependientes de KRAS (Zimmermann et al, 2013). Nuestra estrategia bioinformática utilizada para el diseño de fármacos se ha explorado antes para obtener medicamentos potenciales con mayor eficacia, para interrumpir las interacciones proteína-proteína (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28482793>). Nosotros proveemos evidencia experimental de que C19 inhibe selectivamente la viabilidad de células de cáncer colorrectal dependientes de KRAS.

En células de cáncer colorrectal con KRAS mutado, los tratamientos con cetuximab (anticuerpo anti-EGFR) o regorafenib (inhibidor multikinasa oral) por separado, no producen más del 22% de apoptosis después de 24 h de tratamiento (Napolitano et al, 2015). Desde un punto de vista terapéutico, la supresión de la apoptosis es probablemente una de las causas más importantes de las mutaciones de KRAS (Knickelbein-Zhang, 2015). En nuestro trabajo, C19 inhibe la proliferación y la viabilidad de células de cáncer colorrectal por apoptosis, ya que C19 aumenta significativamente la proteína PARP procesada de manera específica en la línea celular dependiente de KRAS después de 24 h de tratamiento. Además de que nuestros resultados indican que C19 presenta efectos superiores en la inhibición de la viabilidad, capacidad proliferativa e inducción de la apoptosis en células de cáncer colorrectal dependientes de KRAS.

Los inhibidores de la señalización de PI3K/Akt se han sugerido como agentes potenciales en el cáncer colorrectal. Nuestros datos muestran que C19 inhibe la activación de Akt1, Akt2 y AktPan e incrementa la activación de p53, lo cual es importante ya que la vía de señalización del fosfoinosítido 3-cinasa (PI3K)-Akt tiene

un papel significativo en la tumorigénesis, progresión del cáncer colorrectal y vías de anti-apoptosis (Yan et al, 2012). Estos resultados correlacionan con el incremento en la concentración de c-PARP después del tratamiento con C19 (Figura 28).

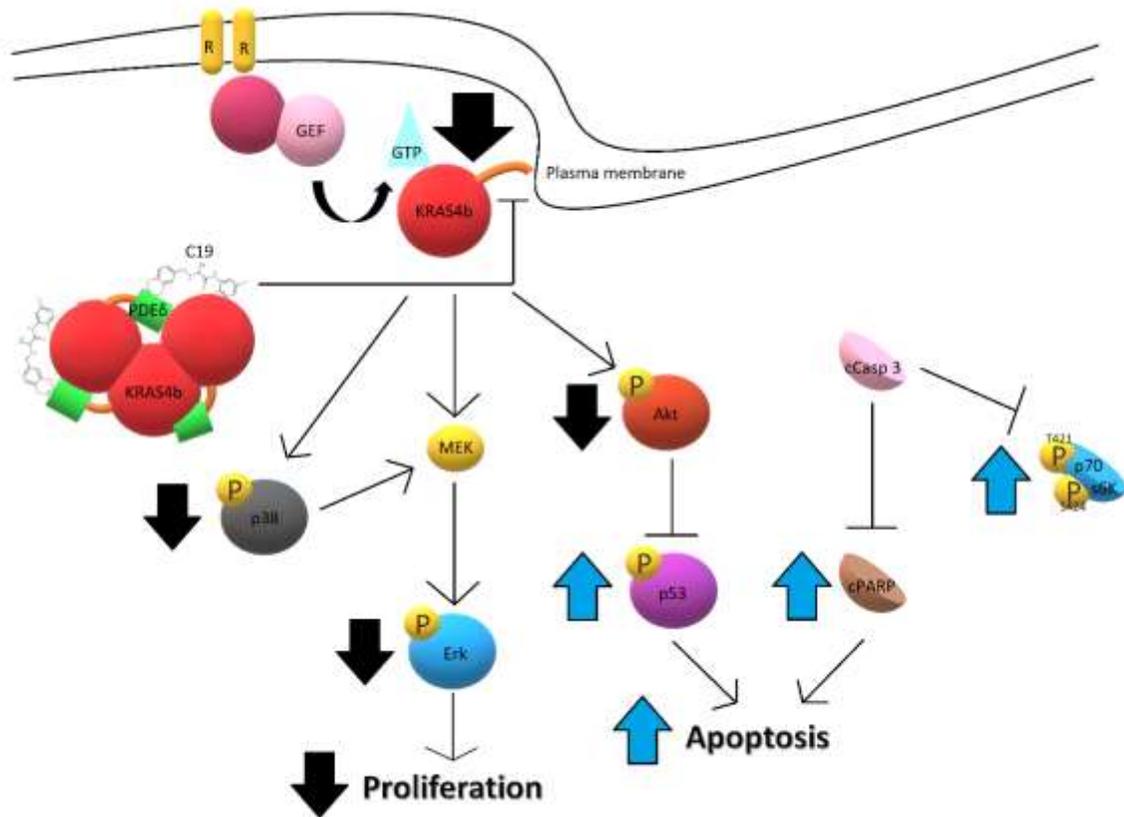


Figura 28.- Representación esquemática del efecto de C19 en la activación y señalización de KRAS4b oncogénico. C19 reduce significativamente la proliferación celular por la inhibición de las vías de Erk y p38, e induce la apoptosis por la inhibición de la activación de Akt.

En efecto, KRAS activado puede inhibir la cascada de señalización apoptótica a través de su efector PI3K, el cual activa a Akt (una potente cinasa pro-supervivencia) que inhibe la apoptosis por muchos mecanismos incluyendo la inactivación de la

familia de proteínas BAD Bcl-2, y la fosforilación inhibitoria de la caspasa-9 (Knickelbein et al, 2015).

De manera interesante, después del tratamiento con C19 en la línea celular LoVo, p70S6K mostró un incremento en la señal de fosforilación (Figura 13C). Esto tiene relevancia porque en células de cáncer de pulmón hay un incremento en la señal del fragmento de 45 kDa de p70S6k fosforilado, en respuesta a la apoptosis causada por cisplatino (Dhar et al, 2009). Con respecto a nuestros datos, esto sugiere que el incremento de la señal de p70S6k puede derivarse de la escisión de la proteína, en respuesta a la apoptosis causada por C19 (Figura 28). Además, en la línea celular LoVo, se redujo la fosforilación de p38 en más del 50% (Figura 13C). En el cáncer colorrectal, la activación de p38 por KRAS mutado ha sido implicado en el mantenimiento de la proliferación celular aún con la inhibición de MEK (van Houdt et al, 2010), sugiriendo que C19 inhibe la activación de KRAS4b, conduciendo a la inhibición de la activación de múltiples efectores involucrados en la señalización oncogénica como la proliferación y las vías anti-apoptóticas.

Por consiguiente, en el modelo xenográfico *in vivo*, C19 a una concentración de 15 y 30 mg/kg promueve una disminución significativa de la fosforilación de Erk1/2 y Akt, y con esto podemos confirmar la inhibición de la señalización de KRAS4b *in vivo*. Los inhibidores que afectan la señalización río abajo de KRAS4b como el inhibidor de RAF LY3009120, inhibe significativamente el crecimiento tumoral en modelos murinos de cáncer de piel y colon, con una dosis que inhibe el 50% de la fosforilación de Erk (ED₅₀) de 4.36 mg/kg. Sin embargo, las concentraciones de 12.5 y 25 mg/kg no reducen completamente la fosforilación de Erk (Peng et al, 2015). Por

ende, podría ser de gran importancia realizar pruebas con concentraciones más bajas del compuesto C19 para encontrar la dosis mínima en la cual se inhiba el crecimiento tumoral y la vía de señalización de KRAS4b.

C19 reduce significativamente el crecimiento tumoral y es más eficiente que la quimioterapia estándar como el 5-FU, el cual presenta toxicidad severa en ratones (Cao et al, 2014). 5-FU es efectivo en algunos tipos de cáncer intestinales, como el cáncer colorrectal, donde está preliminarmente asociado con el daño a los tejidos y tiene efecto en la regeneración de la mucosa gastrointestinal (Panchenko et al, 2018). FOLFOX4 es una combinación del régimen de quimioterapia que involucra la administración de oxaliplatín en combinación con 5-FU y leucovorin; este régimen está reportado como activo en pacientes quienes han sido tratados previamente con 5-FU solo o en combinación con leucovorin. Sin embargo, el régimen FOLFOX4 requiere de por lo menos tres días de hospitalización debido a la infusión intravenosa continua de 48 h y es insatisfactorio para la calidad de vida (Nukatsuka et al, 2012). En nuestro estudio, el 5-FU causa una pérdida rápida del peso corporal de los ratones. En contraste, C19 administrado diariamente no provoca efectos adversos visibles en los ratones (pérdida de peso, irritabilidad, pelo irsuto). Además, observamos una disminución de la proliferación celular en los tumores xenogénicos medidos con Ki67, corroborando la disminución observada en la proliferación celular *in vitro*. En un pequeño estudio de predicción de la quimiosensibilidad, Ki67 se utilizó como un predictor de la respuesta al tratamiento y efectivamente se demostró que los tumores sensibles al tratamiento mostraron una disminución significativa de la

expresión de Ki67 comparado con los tumores resistentes (Brown et al, 2018). Aunado a esto, C19 puede ser un potente regulador del balance entre la proliferación celular y la apoptosis en células de cáncer colorrectal.

Por consiguiente, buscando generar una herramienta que nos permitiera seguir al compuesto C19 en el organismo para realizar estudios de biodistribución y farmacocinética, se diseñó el compuesto I-C19, intercambiando en la molécula los dos átomos de cloro por yodo. El intercambio de halógenos en la molécula C19 mejoró el ΔG (de unión) del sistema KRAS4b-IC19-PDE δ , el cual se incrementó a -102.88 kcal/mol respecto al compuesto C19 (-87.81 kcal/mol) (Tabla 4). Este resultado sugiere que I-C19 se une fuertemente al complejo KRAS4b-PDE δ , previniendo su disociación a través del mismo mecanismo que C19. Para el inhibidor de PDE δ , la alta selectividad de unión al *pocket* de PDE δ con gran afinidad, produce menos citotoxicidad inespecífica (Papke et al, 2016). En este trabajo, I-C19 mostro alta citotoxicidad específica. El IC₅₀ en la línea celular sana, después del tratamiento con C19, fue de 60.8 μM , mientras que con el tratamiento con I-C19, el IC₅₀ se incrementó a 170.1 μM (Figura 19).

El IC₅₀ más bajo fue obtenido de la línea celular LoVo (18.39 μM), el cual fue un orden de magnitud más bajo que el obtenido para la línea celular de colon sano (171.1 μM). El IC₅₀ para la línea celular SW620 fue 2.5 veces menos que el obtenido para la línea celular control (68.28 μM vs. 171.1 μM). Si comparamos el valor del IC₅₀ de la línea celular independiente de KRAS4b HCT116, la respuesta obtenida en las células LoVo fue cinco veces mejor, y en la línea celular SW620, el efecto fue 1.2 veces mejor.

El principal inconveniente de la terapia contra el cáncer (inmunoterapia o moléculas pequeñas) es la pobre penetración de los fármacos en tumores sólidos, incluyendo el cáncer colorrectal. Para superar este problema, la conjugación de los fármacos con radionúclidos emisores α o β^- pueden mejorar significativamente sus efectos terapéuticos (Maisonial-Besset et al, 2017). En este trabajo, I-C19 radiomarcado con ^{131}I exhibe una gran citotoxicidad a una concentración diez veces menor que el IC_{50} del compuesto sin marcar I-C19, en tres diferentes líneas celulares de cáncer colorrectal (Figura 20D). Consecuentemente, en ensayos de captación con Na^{125}I , se observa que a 1 h post-tratamiento, tres líneas celulares murinas CMT93 (cáncer colorrectal), EMT6 (cáncer de mama) y CMT64 (cáncer de pulmón), presenta un incremento significativo de la acumulación del conjugado de yodo (Gaertner et al, 2009). El compuesto radiomarcado ^{131}I -C19 mostró una captación inicial de 3.28-3.6%, mientras que después de 3 h de tratamiento, las tres líneas de cáncer colorrectal presentaron un incremento significativo en la captación de ^{131}I -C19 (Figura 20E). La alta captación de ^{131}I -C19 a las tres horas de tratamiento sugiere que la emisión beta del ^{131}I (β^- , $E_{\text{max}}=606$ keV) puede disminuir la viabilidad de las células de cáncer a través del rompimiento de la doble cadena de ADN (DSBs). En efecto, ^{131}I -C19 promueve el DSBs del ADN, lo cual es evidenciado por la acumulación significativa de los focos de γH2AX en las líneas celulares de cáncer colorrectal, comparado con el tratamiento con I-C19 y con células sin tratamiento (Figura 21A y 21B). El DSB del ADN es una lesión extremadamente peligrosa con consecuencias severas para la sobrevivencia celular. El DSB en el ADN inmediatamente promueve la fosforilación de la variante de la histona H2A, H2AX, en la serina 139, para generar γH2AX (Kinner et al, 2008). En este contexto, se ha demostrado que

las células LoVo son más radio-resistentes cuando son comparadas con la línea celular SW620 (Chang et al, 2018), y con esto se puede explicar que la concentración de focos de γ H2AX fue dos veces mayor en las células LoVo que en SW620. Algunos otros estudios han probado que los emisores- β pueden reducir significativamente la capacidad proliferativa de las células a través del DSB del ADN, comparado con inmunocóncjugados no marcados o células sin tratamiento (Aghevlian et al, 2019). El mayor nivel de DSBs del ADN en HCT116 (seis veces más alto que el control), se da como consecuencia de la exposición a la radiación β del ^{131}I , como se esperaba, ya que la captación en todas las células evaluadas no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Sin embargo, la dosis absorbida en el núcleo de las células LoVo fue más alta comparada con las células HCT116 y SW620 (2.88 Gy/Bq, 1.88 Gy/Bq y 0.43 Gy/Bq, respectivamente).

Dirigir la terapia en el cáncer colorrectal hacia la inhibición de KRAS4b, a través del bloqueo de su localización celular o sus modificaciones postraduccionales ha tenido gran relevancia en la terapia preclínica, sin embargo, se necesitan nuevas metodologías para el descubrimiento de fármacos anti-KRAS4b. En efecto, en la figura 22A, se pudo observar que después del tratamiento con I-C19 en las líneas celulares dependientes de KRAS4b, se inhibió significativamente la activación de RAS. Además, decidimos analizar el estatus de fosforilación de proteínas involucradas en la vía de señalización de RAS y de otras vías esenciales en el cáncer como angiogénesis, supervivencia y anti-apoptosis, proliferación, metabolismo, quimio-resistencia y reparación del daño al ADN. Se ha reportado la potenciación de las funciones de WNK como el incremento de la señalización de fosfolipasa C- β ,

angiogénesis y migración celular dependiente de la fosforilación por AKT. En este aspecto, después del tratamiento con I-C19 en las líneas celulares dependientes de KRAS4b, tanto AKT como WNK1 disminuyen su fosforilación (Figuras 22C y 22D, respectivamente). Además, una de las vías que se encuentran sobre-activadas en cáncer colorrectal es la vía de mTOR. Se ha observado que el silenciamiento de RHEB (homólogo de RAS enriquecido en cerebro) conduce a la disminución de la fosforilación de mTOR, p70S6k y 4EBP1; la expresión de RHEB, aumenta la fosforilación de Ki67, mTOR, p70S6k, BCL-2 y PCNA, así como la proliferación y diferenciación (Ni et al, 2019). El tratamiento con I-C19 mostró una disminución significativa de vías dependientes de RAS, como la fosforilación de Akt1/2/3, PRAS40, p70S6k y Erk1/2, cinasas esenciales en vías como anti-apoptosis y proliferación. Por consiguiente, después del tratamiento con I-C19, se disminuye la fosforilación de ambas cinasas activadas por AMP, AMPKa1 y AMPKa2, solo en las líneas celulares dependientes de KRAS4b (Figuras 22C y 22D, respectivamente). Con respecto a esto, la reprogramación metabólica de células pancreáticas de cáncer por el tratamiento con gemcitabine (quimioterapéutico citotóxico) es dependiente de KRAS4b. Además, el gemcitabine también induce reprogramación metabólica activando a AMPK, lo cual promueve el flujo glicolítico y la diferenciación de las células de cáncer (Tian et al, 2019). Estos descubrimientos sugieren que el tratamiento con I-C19, en combinación con radioterapia, puede ser una herramienta poderosa para el tratamiento de algunos tipos de cáncer dependientes de KRAS4b.

Decidimos analizar el potencial terapéutico de I-C19 en el cáncer colorrectal *in vivo*. Se utilizó el azoximetano, un carcinógeno específico de colon de roedores, el cual induce daño al ADN y causa mutaciones puntuales en el proto-oncogen KRAS4b y subsecuentemente forma un tumor si el daño al ADN no es reparado o removido (Zhao et al, 2019). Observamos que después del tratamiento con I-C19 a una concentración de 30 mg/kg por 12 días, hay una disminución significativa del porcentaje de adenocarcinomas colorrectales, cuando lo comparamos con los ratones tratados con el vehículo o con C19 (Figura 24A), lo cual sugiere que I-C19 disminuye la activación de KRAS4b *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, I-C19 disminuye significativamente la tinción de CEA (Figura 24C; panel superior) y Ki67 (Figura 24C; panel inferior), lo cual nos permite confirmar que este tratamiento disminuye la malignidad y capacidad proliferativa del cáncer colorrectal con KRAS4b mutado. Estos descubrimientos son consistentes con los reportados por Shen y colaboradores en 2017, donde identifican al microRNA miR30a como un agente sintético letal en células de cáncer colorrectal con KRAS4b mutado. ME1 y KRAS4b son objetivos directos de miR-30-a, e inhibe el crecimiento y la tumorigénesis de células con KRAS4b mutado. Además, su tratamiento mostro la reducción de la proliferación e incrementó la apoptosis, como se indica, por la disminución de Ki67 y el incremento de la tinción de la caspasa-3 escindida (Shen et al, 2017). Estos descubrimientos son semejantes a nuestros resultados; ya que después del tratamiento con I-C19, fuimos capaces de observar la disminución del crecimiento tumoral (Figura 25A) del modelo xenográfico de LoVo. I-C19 disminuye la malignidad y proliferación, e incrementa la apoptosis, como lo demuestra la

disminución de CEA y Ki67 y el incremento de la tinción de la caspasa 3 escindida (Figura 25C y 25D).

Para confirmar que I-C19 fue captado en el tumor, así como para evaluar la ruta de excreción, realizamos estudios de biodistribución con el compuesto radiomarcado ^{131}I -C19. En esta investigación, ^{131}I -C19 mostró captación específica en el tumor, y exhibió una acumulación en el hígado y riñones, lo cual indica que ambos órganos son vías excretoras. De igual forma, los estudios de biodistribución después de la inyección con Na^{125}I en ratones con tumores alográficos de células CMT93 (cáncer colorrectal de ratón) resultaron en concentraciones de actividad de ± 9.1 % de ID/g del tejido tumoral, 30 minutos post-inyección (Gaertner et al, 2009). En este estudio, después de 1 h, la actividad de ^{131}I -C19 en el tejido tumoral fue de ± 4.4 % ID/g. Estos resultados son congruentes con la reducción del crecimiento tumoral en los ratones tratados con I-C19.

El incremento en la incidencia de la formación de micronúcleos es un biomarcador útil para el daño genotóxico, esto a través de mecanismos clastogénicos (daño directo en el ADN), o a través de la interacción secundaria con la replicación del ADN (mecanismo aneugénico) (Jain-Pandey, 2019). La ciclofosfamida (CP) es un potente agente antitumoral utilizado globalmente, contra muchos tipos de cáncer humano. Cuando los ratones son tratados con 30 mg/kg de CP, se produce una fuerte inducción de micronúcleos (Te et al, 1997). De forma similar, cuando tratamos a los ratones con 15 mg/kg de 5-FU (quimioterapéutico ampliamente utilizado), hay un incremento significativo de MNPCEs (Figura 27A). En contraste, el número de MNPCEs fue similar con el vehículo y los tratamientos con C19 e I-C19 (Figura 27B).

El perfil biocinético mostró eliminación renal por la producción normalizada de radiación absorbida de 1.45 mGy/MBq, lo cual no se espera que induzca radiotoxicidad renal. La dosis de radiación más alta fue detectada en el tumor (76.06 mGy/MBq).

10.- Conclusión.

En conclusión, C19 y sus derivados I-C19 y ¹³¹I-C19 presentan buenas propiedades antineoplásicas, además de tener una doble acción terapéutica, como terapia dirigida y radioterapia. Dichos compuestos tienen potencial de ser una alternativa en el tratamiento del cáncer colorrectal dependiente de KRAS4b oncogénico.

11.- Perspectivas.

Es importante explorar las propiedades antitumorales de C19 e I-C19 en tumores xenográficos derivados de pacientes (PDX) en modelos murinos.

Referencias

- Aghevlian, S., Cai, Z., Lu, Y., Hedley, D. W., Winnik, M. A., & Reilly, R. M. (2019). Radioimmunotherapy of PANC-1 Human Pancreatic Cancer Xenografts in NRG Mice with Panitumumab Modified with Metal-Chelating Polymers Complexed to (177)Lu. *Mol Pharm*, *16*(2), 768-778.
- Berendsen HC, P. J. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys.*, *81*(8), 3684–3690.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA CANCER J CLIN*, *68*(6), 394–424.
- Brown KM., X. A. (2018). Using patient-derived xenograft models of colorectal liver metastases to predict chemosensitivity. *J Surg Res.*, *227*, 158–167.
- Cao Z., Z. Z. (2014). Antitumor and immunomodulatory effects of low-dose 5-FU on hepatoma 22 tumorbearing mice. *Oncol Lett.*, *7*(4), 1260–1264.
- Case DA, C. T. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem.*, *26*(16), 1668–1688.
- Casique-Aguirre, D., Briseno-Diaz, P., Garcia-Gutierrez, P., la Rosa, C. H., Quintero-Barceinas, R. S., Rojo-Dominguez, A., . . . Vargas, M. (2018). KRas4B-PDE6delta complex stabilization by small molecules obtained by virtual screening affects Ras signaling in pancreatic cancer. *BMC Cancer*, *18*(1), 1299-1315.
- Chandra, A., Grecco, H. E., Pisupati, V., Perera, D., Cassidy, L., Skoulidis, F., . . . Bastiaens, P. I. (2011). The GDI-like solubilizing factor PDEdelta sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins. *Nat Cell Biol*, *14*(2), 148-158.
- Chang, H., Wei, J.-w., Tao, Y.-l., Ding, P.-r., Xia, Y.-f., Gao, Y.-h., & Xiao, W. (2018). CCR6 is a predicting biomarker of radiosensitivity and potential target of radiosensitization in rectal cancer. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*, *50*(4), 1203.
- Chen Fengqian, A. M. (2019). Targeting Mutant KRAS for Anticancer Therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *19*, 2098-2113.
- Cox AD, F. S. (2014). Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov*, *13*(11), 828–851.
- Darden T, Y. D. (1993). Particle mesh Ewald-an N. log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys*, *98*(12), 10089–10092.
- Dhar R., P. S. (2009). Proteolytic cleavage of p70 ribosomal S6 kinase by caspase-3 during DNA damage-induced apoptosis. *Biochemistry*, *48*(7), 1474–1480.
- Dharmaiaha Srisathiyarayanan., B. L. (2016). Structural basis of recognition of farnesylated and methylated KRAS4b by PDEδ. *PNAS*, E6766–E6775.

- Duan Y, W. C. (2003). A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J Comput Chem*, 24(16), 1999–2012.
- Gaertner, F. C., Rohde, F., Mueller, J., Blechert, B., Janssen, K. P., & Essler, M. (2009). Endogenous expression of the sodium iodide symporter mediates uptake of iodide in murine models of colorectal carcinoma. *Int J Cancer*, 125(12), 2783-2791.
- Gohlke H., C. D. (2004). Converging free energy estimates: MM-PB(GB)SA studies on the protein-protein complex Ras-Raf. *J Comput Chem*, 25(2), 238–250.
- Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Kirsh-Volders, M., . . . Shimada, H. (1994). In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res*, 312(3), 293-304.
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009,). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071-1078.
- Jain, A. K., & Pandey, A. K. (2019). In Vivo Micronucleus Assay in Mouse Bone Marrow. *Methods Mol Biol*, 2031, 135-146.
- Jorgensen WL, J. C. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys*, 79(2), 926–935.
- Karnoub AE, W. R. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(7), 517–531.
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., & Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res*, 36(17), 5678-5694.
- Kinzler Kenneth, V. B. (1996). Lessons from Hereditary Colorectal cancer. *Cell*, 87, 159-170.
- Knickelbein K., Z. L. (2015). Mutant KRAS as a critical determinant of the therapeutic response of colorectal cancer. *Genes Dis*, 2(1), 4–12.
- Knickelbein Kyle, Z. L. (2015). Mutant KRAS as a critical determinant of the therapeutic response of colorectal cancer. *Genes & Diseases*, 2, 4-12.
- Kollman PA., M. I. (2000). Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc Chem Res*, 33(12), 889–897.
- Li, W., Ji, Y. H., Li, C. X., Liu, Z. Y., Li, N., Fang, L., . . . Tan, J. (2016). Evaluation of therapeutic effectiveness of (131)I-antiEGFR-BSA-PCL in a mouse model of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 22(14), 3758-3768.
- Maisonial-Besset, A., Witkowski, T., Navarro-Teulon, I., Berthier-Vergnes, O., Fois, G., Zhu, Y., . . . Chezal, J. M. (2017). Tetraspanin 8 (TSPAN 8) as a potential target for radio-immunotherapy of colorectal cancer. *Oncotarget*, 8(13), 22034-22047.

- Miller BR., M. T. (2012). MMPBSA. Py: an efficient program for end-state free energy calculations. *J Chem Theory Comput*, 8(9), 3314–3321.
- Morris GM, H. R. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*, 30(16), 2785–2791.
- Napolitano S., M. G. (2015). Primary and acquired resistance of colorectal Cancer to anti-EGFR monoclonal antibody can be overcome by combined treatment of Regorafenib with Cetuximab. *Clin Cancer Res*, 21(13), 2975–2983.
- Ni, D., Li, X., He, X., Zhang, H., Zhang, J., & Lu, S. (2019). Drugging K-Ras(G12C) through covalent inhibitors: Mission possible? *Pharmacol Ther*, 202, 1-17.
- Nukatsuka M., S. H. (2012). Efficacy of combination chemotherapy using oral fluoropyrimidine S-1 with oxaliplatin (SOX) against colorectal cancer in vivo. *Anticancer Res*, 32(7), 2807–2812.
- Onufriev A., B. D. (2004). Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model. *Proteins*, 55(2), 383–394.
- Ostrem JM., P. U. (2013). K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature*, 503(7477), 548–551.
- Panchenko AV., F. E. (2018). Effect of the polyphenol composition BP-C3 on haematological and intestinal indicators of 5-fluorouracil toxicity in mice. *Exp Ther Med*, 15(3), 3124–3132.
- Papke, B., Murarka, S., Vogel, H. A., Martin-Gago, P., Kovacevic, M., Truxius, D. C., . . . Bastiaens, P. I. (2016). Identification of pyrazolopyridazinones as PDEdelta inhibitors. *Nat Commun*, 7, 11360.
- Peng SB., H. J. (2015). Inhibition of RAF isoforms and active dimers by LY3009120 leads to anti-tumor activities in RAS or BRAF mutant cancers. *Cancer Cell*, 28(3), 384–398.
- Phelps, R. A. (2009). A Two-Step Model for Colon Adenoma Initiation and Progression Caused by APC Loss. *Cell*, 137, 623–634.
- Poulikos, S. A. (2014). Targeting RAS–ERK signalling in cancer: promises and challenges. *NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY*, 13, 928-942.
- Prior Ian A., L. P. (2012). A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*, 72(10), 2457–2467.
- Pylayeva-Gupta Yuliya, G. E.-S. (2011). RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *NATURE REVIEWS*, 11, 761-774.
- Sánchez-Barriga, J. (2017). Tendencias de mortalidad y riesgo de muerte por. *Asociación Mexicana de Gastroenterología*, 82(3), 217-225.
- Shen, H., Xing, C., Cui, K., Li, Y., Zhang, J., Du, R., . . . Li, Y. (2017). MicroRNA-30a attenuates mutant KRAS-driven colorectal tumorigenesis via direct suppression of ME1. *Cell Death Differ*, 24(7), 1253-1262.

- Singh A., S. M. (2012). TAK1 inhibition promotes apoptosis in KRAS-dependent colon cancers. *Cell*, 148(4), 639–650.
- Takayama Tetsuji, M. K. (2006). Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol*, 41, 185–192.
- Te, C., Gentile, J. M., Baguley, B. C., Pearson, A. E., Gregory, T., & Ferguson, L. R. (1997). In vivo effects of chlorophyllin on the antitumour agent cyclophosphamide. *Int J Cancer*, 70(1), 84-89.
- Thaker, A. I., Shaker, A., Rao, M. S., & Ciorba, M. A. (2012). Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). *J Vis Exp*, 67-88.
- Tian, Y., Shen, L., Li, F., Yang, J., Wan, X., & Ouyang, M. (2019). Silencing of RHEB inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in colorectal cancer cells via inhibition of the mTOR signaling pathway. *J Cell Physiol*, 226-235.
- van Gunsteren WF, B. H. (1977). Algorithms for macromolecular dynamics and constraint dynamics. *Mol Phys*, 34(5), 1311–1327.
- van Houdt WJ., d. B. (2010). Oncogenic K-ras activates p38 to maintain colorectal cancer cell proliferation during MEK inhibition. *Cell Oncol*, 32(4), 245–257.
- Vlahopoulos S., Z. V. (2004). JNK: a key modulator of intracellular signaling. *Biochemistry (Mosc)*, 69(8), 844–854.
- Walther Axel, H. R. (2008). Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *BMJ Publishing Group Ltd (& BSG)*, 1-18.
- Wang J, W. R. (2004). Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem*, 25(9), 1157–1174.
- Xiuxing, G. R. (2019). RAS: Striking at the Core of the Oncogenic Circuitry. *Frontiers in Oncology*, 9, 965-981.
- Yan Y., L. M. (2012). FOXO3a and beta-catenin co-localization: double trouble in colon cancer? *Nat Med*, 18(6), 854–856.
- Ye Na, X. Q. (2019). Recent Advances in Developing K-Ras Plasma Membrane Localization Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19, 2114-2127.
- Zhao, H., Wu, S., Li, H., Duan, Q., Zhang, Z., Shen, Q., . . . Yin, T. (2019). ROS/KRAS/AMPK Signaling Contributes to Gemcitabine-Induced Stem-like Cell Properties in Pancreatic Cancer. *Mol Ther Oncolytics*, 299-312.
- Zimmermann G, P. B. (2013). Small molecule inhibition of the KRAS-PDEdelta interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature*, 497(7451), 638–642.