

Propuesta de estrategias terapéuticas combinadas para KRAS en cáncer de pulmón de células no pequeñas a partir de análisis *in silico*

Daniela Chapilliquen Ramírez* ^{1,a}; Juan Faya Castillo ^{1,b}; Richard Zapata Dongo ^{1,c}; Brenda Moy Díaz ^{1,d}; Stefany Infante Varillas ^{1,c}

RESUMEN

Objetivo: Los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas positivas a la mutación del gen linfoma anaplásico quinasa (ALK+) que, además, presentan mutaciones en el gen Kirsten rat sarcoma (KRAS), como KRAS^{G12C}, están mostrando resistencia tanto a inhibidores del gen linfoma anaplásico quinasa (ALK) como de KRAS. Por ello, se analizó la interacción de los inhibidores de ALK con KRAS, para sugerir una sinergia entre ambos.

Materiales y métodos: En el estudio se realizó un modelado por homología de las estructuras KRAS^{wt}, KRAS^{G12C} y ALK^{wt}. Posteriormente, se realizaron acoplamientos moleculares para determinar la energía de unión de los inhibidores de ALK y de KRAS, y evaluar la posible interacción entre los inhibidores de ALK con KRAS y la estructura KRAS^{G12C}. Finalmente, se analizó la expresión en la vía de proliferación celular de las proteínas rat sarcoma/quinasa regulada por señales extracelulares (vía RAS/MEK) mediante la técnica de Western blot.

Resultados: Los valores de energía de unión muestran la posibilidad de interacción de los inhibidores de ALK^{wt}, como crizotinib y alectinib, con las estructuras de KRAS^{wt} y KRAS^{G12C}. Los acoplamientos entre crizotinib con KRAS^{wt} y KRAS^{G12C}, respectivamente, muestran valores de energía de interacción (42,77 kcal/mol y 46,20 kcal/mol) muy similares a los obtenidos entre crizotinib y ALK (42,37 kcal/mol). A su vez, alectinib se acopló en el mismo sitio que los fármacos específicos de KRAS y KRAS^{G12C}, y presentaron valores de energía de interacción (51,74 kcal/mol y 54,69 kcal/mol, respectivamente) superiores a los obtenidos con ALK (44,94 kcal/mol). Finalmente, la expresión de la vía RAS/MEK nos mostró una disminución significativa de la expresión de RAS en líneas celulares de cáncer de pulmón ALK+ y ALK^{L1196M} tratadas con crizotinib y alectinib.

Conclusiones: Las técnicas *in silico* de este estudio muestran la posibilidad de acoplamiento entre los inhibidores de ALK (crizotinib y alectinib) con la estructura de KRAS. Esto permite sugerir una posible terapia combinada entre inhibidores de KRAS y ALK para los casos de coexistencia de ambas mutaciones, que puede evaluarse en posteriores ensayos con líneas celulares.

Palabras clave: Cáncer de Pulmón de Células no Pequeñas; ALK Quinasa; Acoplamiento Molecular (Fuente: DeCS BIREME).

Proposal of combined therapeutic strategies for KRAS in non-small cell lung cancer based on an *in silico* analysis

ABSTRACT

Objective: Patients with non-small cell lung cancer positive for the anaplastic lymphoma kinase (ALK+) gene mutation who also have mutations in the Kirsten rat sarcoma (KRAS) gene, such as KRAS G12C, are showing resistance to both anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene and KRAS inhibitors. Therefore, the interaction between ALK inhibitors and KRAS was analyzed to suggest a synergy between them.

Materials and methods: The study performed homology modeling of the KRAS^{wt}, KRAS G12C and ALK^{wt} structures. Subsequently, molecular dockings were carried out to determine the binding energy of ALK and KRAS inhibitors and to evaluate the possible interaction of ALK inhibitors with KRAS and the KRAS G12C structure. Finally, the expression in the RAS/MEK pathway was analyzed using the Western Blot technique.

Results: The binding energy values show the potential interaction of ALK^{wt} inhibitors, such as crizotinib and alectinib, with the KRAS^{wt} and KRAS G12C structures. The binding of crizotinib to KRAS^{wt} and KRAS G12C, respectively, indicates interaction energy values (42.77 kcal/mol and 46.20 kcal/mol) which are very similar to those obtained between crizotinib and ALK (42.37 kcal/mol). In turn, alectinib bound to the same site as drugs targeting KRAS and KRAS G12C, and showed interaction energy values (51.74 kcal/mol and 54.69 kcal/mol, respectively) higher than those obtained with ALK (44.94

1 Universidad de Piura, Facultad de Medicina Humana. Lima, Perú.

^a Estudiantes de Medicina Humana; ^b magíster en Ciencias - Bioinformática; ^c magíster en Investigación Biomédica; ^d química-farmacéutica.

*Autor corresponsal.

kcal/mol). Finally, a significant decrease in RAS expression within the RAS/MEK pathway was observed in ALK+ and ALK 1196M lung cancer cell lines treated with crizotinib and alectinib.

Conclusions: In silico techniques of this study demonstrate the potential binding of ALK inhibitors (crizotinib and alectinib) to the KRAS structure. In addition, this allows suggesting a possible combined therapy between KRAS and ALK inhibitors for cases of coexistence of both mutations that can be assessed in subsequent trials with cell lines.

Keywords: Carcinoma, Non-Small-Cell Lung; Anaplastic Lymphoma Kinase; Molecular Docking Simulation (Source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón (CP) constituye una de las principales causas de muerte por cáncer a nivel global, por ello en el año 2020 se ubicó en el cuarto puesto en términos de prevalencia entre todos los tipos de cáncer. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) es el de mayor predominio entre los CP y representa el 84 % del total de diagnósticos ⁽¹⁾.

En el CPCNP se han identificado diversas alteraciones moleculares, como las mutaciones génicas (EGFR, MET, KRAS, BRAF, ERK) y cromosómicas (ALK o ROS1) ^(2,3). En pacientes con CPCNP positivo para la proteína quinasa del linfoma anaplásico (CPCNP ALK+), se observa una inversión paracéntrica del gen Echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4) y el gen ALK, lo que conduce a la formación de una proteína de fusión anormal (EML4-ALK) ^(4,5), que, a su vez, genera la persistencia de la actividad catalítica en su dominio intracelular. Por tanto, se produce una fosforilación descontrolada por su naturaleza quinasa, lo cual desencadena la activación desregulada de múltiples vías de señalización. Estas vías incluyen la proliferación celular (mediante PLC y RAS), la supervivencia celular (a través de PI3K), el crecimiento tumoral (vía STAT 3/5) y la vía asociada a la familia de proteínas antiapoptóticas BCL2 ⁽⁶⁾. Por tanto, cabe resaltar

la importancia de abordar las implicaciones de esta mutación en la progresión y tratamiento del CPCNP.

Dentro de la familia de proteínas Ras, se identifican tres protooncogenes cruciales: KRAS, NRAS y HRAS, donde KRAS es el predominante en tumores sólidos como el cáncer de pulmón ⁽⁷⁾. La proteína KRAS se presenta en dos estados distintos, uno inactivo unido a guanosina difosfato (GDP) y otro activo unido a guanosina trifosfato (GTP). Normalmente, la inactivación de KRAS es inducida por proteínas activadoras de Ras-GTPasa (RasGAP) ⁽⁸⁾. Sin embargo, las mutaciones más comunes en los residuos de aminoácidos Gly12, Gly13 y Val61⁽⁹⁾ conducen a una resistencia a la hidrólisis de GTP mediada por RasGAP ^(10,11). Esto resulta en una forma de KRAS constitutivamente activa, lo que desencadena una activación descontrolada de mecanismos clave relacionados con el crecimiento, la proliferación y la supervivencia en las células oncogénicas (Figura 1). Esta comprensión detallada de los eventos moleculares que rodean a KRAS subraya su papel central en la patogénesis del cáncer de pulmón y enfatiza la necesidad crítica de desarrollar terapias dirigidas, específicamente a esta vía de señalización, para mejorar los resultados clínicos en pacientes afectados.

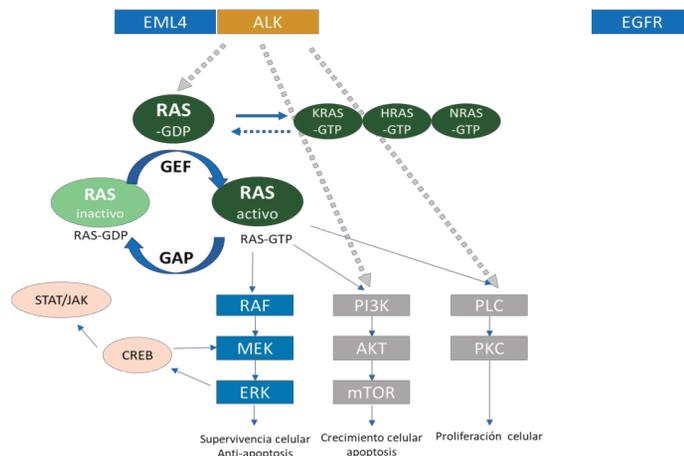


Figura 1. Vía RAS/MEK posalteraciones de KRAS y EML4-ALK en cáncer de pulmón de células no pequeñas. Adaptado de Huang L, Guo Z, Wang F, Fu L. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):1-20.

Las estrategias convencionales de terapia dirigida se centran en la competencia directa entre los inhibidores de ALK (ALKinh)^(12,13) y la molécula de ATP por el sitio de interacción de este último, lo que impide el proceso postraduccional de fosforilación. No obstante, en los últimos años se ha observado la presencia de resistencia a los ALKinh (crizotinib, ceritinib, alectinib⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ brigatinib⁽¹⁷⁾) en pacientes con CPCNP ALK+. Este fenómeno se ve agravado por la concomitancia de alteraciones en KRAS, ALK y/o EGFR en estos pacientes, lo que ha dado lugar a un aumento en la resistencia tanto a inhibidores de ALK como de KRAS^(18,19).

Se ha identificado que ciertas proteínas de fusión que incorporan receptores de tirosina quinasa, como EML4-ALK, pueden asociarse con GRB2 y SOS para formar gránulos proteicos citoplasmáticos sin membrana, lo que resulta en la activación de KRAS y otras señales descendentes⁽²⁰⁾. Esta comprensión detallada de los mecanismos moleculares subyacentes destaca la complejidad de las interacciones dentro de las vías de señalización en el contexto del CPCNP ALK+, y sugiere la necesidad de enfoques terapéuticos más integrados y específicos para abordar la resistencia emergente a los tratamientos convencionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y población de estudio

Los resultados de este estudio parten de un análisis descriptivo que combinó la ejecución de ensayos tanto *in silico* como *in vitro*. Los estudios *in silico* se llevaron a cabo utilizando herramientas y software especializados, y se consideró como población de estudio a las estructuras de KRAS^{WT}, KRAS^{G12C} y ALK a partir de la base de datos RCSB-PDB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics: Protein Data Bank), mientras que los ensayos *in vitro* emplearon a las líneas celulares de CPCNP: EML4-ALK^{WT}, EML4-ALK^{L1196M}, EML4-ALK^{G1202R} como población de estudio. Los experimentos se realizaron en los laboratorios de investigación de la Universidad de Piura. Todas las etapas de la investigación se desarrollaron con la aprobación del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad de Piura.

Variables y mediciones

Los ensayos *in silico* presentaron las variables de acoplamiento molecular entre crizotinib con KRAS^{WT} y KRAS^{G12C} y acoplamiento molecular entre alectinib con KRAS^{WT} y KRAS^{G12C}, medidos en kcal/mol. Los ensayos experimentales presentaron las variables de expresión de RAS y MEK, cuya expresión fue normalizada con β -actina expresada en su variación.

Análisis estadístico

El cálculo de la concentración inhibitoria media (IC50) se realizó mediante una regresión no lineal paramétrica ajustado a un intervalo de confianza del 95 %, mientras que para la comparación por grupos múltiples de variables

se utilizó Anova y el test de Tukey, y se consideró estadísticamente significativo para $p < 0,05$. Los gráficos se representaron en GraphPad Prism, versión 10.0.2.

Consideraciones éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad de Piura (N°: PREMED08202116). No se requirió la intervención de seres humanos o muestras biológicas. Se desarrolló en los laboratorios de investigación: Cultivo Celular, Inmunología y Biología Celular y Análisis de Proteína y Bioinformática de la Universidad de Piura.

Ensayos *in silico*

Para una comprensión más profunda de la naturaleza de la interacción en el sitio de unión de la proteína KRAS y sus ligandos inhibidores específicos, se llevó a cabo un enfoque computacional. Para lograr este objetivo, se implementaron técnicas de modelado y acoplamiento molecular, lo que permitió una exploración detallada de las interacciones moleculares en el nivel atómico.

Modelamiento molecular de KRAS

El modelado molecular es una técnica fundamental para obtener la estructura tridimensional completa de macromoléculas, especialmente en casos en que no estén disponibles o se presenten de manera incompleta, como en KRAS y ALK. En el contexto de este estudio, se adquirió la secuencia aminoacídica de la proteína KRAS de UniProt (<https://www.uniprot.org/>), a partir de la cual se generó su estructura tridimensional utilizando el módulo de modelado por homología de YASARATM (<http://www.yasara.org/>) en su versión 22.9.24. Además, se modeló la estructura de KRAS^{G12C} para introducir una mutación en el modelo KRAS^{WT}. Finalmente, el modelo de ALK se obtuvo utilizando también el software YASARATM.

Este módulo de modelamiento molecular facilita la comparación de la secuencia en formato "fasta" con estructuras 3D almacenadas en RCSB-PDB (<https://www.rcsb.org/>), lo que permite generar la estructura 3D correspondiente. Todo el procedimiento se realizó siguiendo un protocolo aprobado por la Evaluación crítica de técnicas para la predicción estructural de proteínas (The Critical Assessment of Protein Structure Prediction [CASP]), lo que garantizó la precisión y fiabilidad de los resultados obtenidos en este análisis de modelado molecular⁽²¹⁾.

Acoplamiento de KRAS e inhibidores

El proceso de acoplamiento molecular fue fundamental para generar los complejos conformados por las proteínas KRAS^{WT}, KRAS^{G12C} y ALK^{WT} en interacción con los inhibidores específicos de KRAS: adagrasib, sotorasib y SML8-73-1, así como los agentes inhibidores específicos de ALK: crizotinib y alectinib. Las características estructurales de estos fármacos se obtuvieron de la base de datos ZINC15 (<https://zinc.docking.org/>) en formato "mol". Posteriormente, se llevó a cabo un proceso

de optimización de los complejos formados, y se completó la adición de hidrógenos faltantes con el software YASARA™.

Para cada complejo, se realizó el cálculo de la energía de interacción en unidades de kcal/mol, lo que permitió una evaluación cuantitativa de la estabilidad y la fuerza de la interacción entre las macromoléculas estudiadas y los inhibidores específicos. Este análisis detallado de las interacciones moleculares proporcionó información valiosa sobre la afinidad de unión y la estabilidad de los complejos formados, lo que contribuyó significativamente a una comprensión más profunda de los mecanismos subyacentes a la interacción fármaco-proteína en el contexto del cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Ensayos *in vitro*

Para evaluar la variación en la expresión de RAS en las líneas celulares murinas de CPCNP, se realizaron ensayos para determinar el IC50, con el fin de identificar la dosis óptima para el tratamiento con inhibidores de ALK. Posteriormente, los ensayos emplearon técnicas estandarizadas de electrotransferencia y Western blot, que permitieron una evaluación cuantitativa y cualitativa de los niveles de expresión de RAS en las líneas celulares de CPCNP tratadas con diferentes dosis de inhibidores de ALK. El análisis de estos datos proporcionó información sobre la influencia de los inhibidores de ALK en la expresión de RAS, lo que contribuyó a una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis del CPCNP.

Líneas celulares

Para llevar a cabo los ensayos *in vitro*, se utilizaron tres líneas celulares murinas de CPCNP: Ba/F3 EML4-ALK^{WT}, Ba/F3 EML4-ALK^{L1196M} y Ba/F3 EML4-ALKG^{1202R}, las cuales fueron cedidas por los investigadores Luca Molteni y Diletta Fontana de la Università degli Studi di Milano Bicocca ⁽²²⁾. Cada uno de los ensayos experimentales se realizó en tres repeticiones independientes, lo que garantizó la robustez y la fiabilidad de los datos obtenidos.

Las líneas celulares se mantuvieron en condiciones de cultivo en DMEM 1x (Sigma-Aldrich), complementado con suero bovino fetal inactivado al 10 % y penicilina/estreptomina al 1 %. El cultivo celular se llevó a cabo en un entorno de incubación a 37 °C con una atmósfera controlada de 5 % de CO₂, lo que proporcionó un entorno óptimo para el crecimiento y la viabilidad celular durante el desarrollo de los ensayos *in vitro*.

Determinación de IC50

Se realizó el cultivo de 105 células/mL de cada línea celular en placas de 96 pocillos, seguido del tratamiento con los fármacos crizotinib (HY-50878, 877399-52-5) y alectinib (HY-13011, 1256580-46-7) en ocho concentraciones seriadas de proporción (1:3). La concentración mínima utilizada fue de 0 µM, mientras que la concentración máxima fue de 10

µM. Las muestras se incubaron durante 48 horas, tras las cuales se añadió CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega) al 10 %. Luego de un período adicional de tres horas, se obtuvieron las lecturas de absorbancia a 490 nm mediante un espectrofotómetro Multiskan Go (ThermoScientific®).

Los datos recolectados se utilizaron para calcular la IC50, lo que permitió una evaluación precisa de la eficacia de los fármacos crizotinib y alectinib en la inhibición del crecimiento celular en las líneas celulares de CPCNP estudiadas. Este análisis cuantitativo proporcionó información crucial sobre la respuesta de las células a diferentes concentraciones de los fármacos, lo que contribuyó a una comprensión más profunda de sus perfiles de sensibilidad y resistencia.

Tratamiento

Se realizó el cultivo de 106 células/ml de cada línea celular en placas de 12 pocillos distintos. Cada línea celular fue sometida a las siguientes condiciones experimentales: un grupo control sin tratamiento, un grupo tratado con la concentración de IC50 de 50 nM de crizotinib y otro grupo tratado con una concentración de IC50 de 50 nM de alectinib. Después de un período de incubación de 48 horas, se recolectaron las células y se procedió a la extracción de proteínas utilizando Buffer RIPA 1x (Thermo Scientific), Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail 100x (Thermo Scientific) y 0,5M EDTA Solution 100x (Thermo Scientific).

Las proteínas extraídas fueron posteriormente desnaturalizadas utilizando Buffer Laemly (Sigma-Aldrich) a una temperatura de 95 °C durante cinco minutos, y posteriormente almacenadas a -20 °C para su preservación. Este procedimiento garantizó la conservación óptima de las muestras de proteínas, y preservó su integridad estructural, lo que permitió los análisis posteriores detallados de las proteínas de interés.

Expresión de proteínas

Para determinar la expresión de RAS y MEK, se desarrolló un análisis mediante Western blot. Las proteínas extraídas fueron separadas en geles de poliacrilamida SDS y transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm (Amersham™ Protran™). Luego de la transferencia, se realizó un bloqueo utilizando leche libre de grasas al 5 % durante una hora. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con los siguientes anticuerpos primarios: anti-RAS (ab52939) en una dilución de 1:5000, anti-MEK (ab178876) en una dilución de 1:20000 y β-actina (ab8227) en una dilución de 1:1000, durante toda la noche.

Después de la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario (ab205718) en una dilución de 1:5000 durante una hora. Se llevaron a cabo los correspondientes lavados y las

membranas se revelaron utilizando el sustrato Clarity™ Western ECL (Bio-Rad). Las imágenes finales se obtuvieron utilizando el sistema de imagen Chemidoc Imaging Instrument (Bio-Rad).

RESULTADOS

Modelamiento molecular de KRAS^{wt}, KRAS^{G12C}

Se realizó el modelado de las estructuras tridimensionales de las proteínas KRAS^{wt} y KRAS^{G12C}, así como de ALK, para lo cual se empleó el software YASARATM. En el caso de KRAS^{wt}, se obtuvieron cinco modelos distintos basados en las estructuras tridimensionales previamente almacenadas en RCSB-PDB (códigos: 4LDJ, 4QL3, 5XCO, 5E95 y 6MBU). A partir de estos modelos, se generó un modelo híbrido con una puntuación Z de 0,586, que fue identificado como el mejor modelo para este estudio. La puntuación Z describe la cantidad de desviaciones estándar respecto a la calidad de la estructura media obtenida a partir del análisis de rayos X de alta resolución.

Para la obtención de KRAS^{G12C}, se realizó una mutación específica sobre el modelo híbrido previamente obtenido, lo que permitió la generación de una representación precisa de esta variante mutacional en la estructura tridimensional de KRAS.

Por último, la generación del modelo de ALK se realizó utilizando como base estructural los modelos

tridimensionales provenientes de los códigos PDB: 4CLJ, 4FOD, 4ANL, 5FTO. El modelo híbrido generado durante este proceso se seleccionó como el modelo final para el análisis subsiguiente. Los resultados proporcionaron representaciones precisas de las estructuras tridimensionales de las proteínas KRAS y ALK, que sirvieron como punto de partida crucial para la comprensión de las interacciones moleculares relevantes en el contexto del estudio.

Acoplamiento molecular de KRAS^{wt}, KRAS^{G12C} y ALK con inhibidores específicos de KRAS y ALK

KRAS es una GTPasa que oscila entre un estado inactivo ligado a GDP y un estado activo unido a GTP. En este estudio, se realizó el acoplamiento de las estructuras de KRAS^{wt} y KRAS^{G12C} con sus respectivos inhibidores específicos adragasib, sotorasib y SML8-73-1, así como con los inhibidores crizotinib y alectinib. La interacción de estas proteínas con los inhibidores resultó en la obtención de valores de energía de interacción en kcal/mol, como se detalla en la Tabla 1.

Se observó que los inhibidores de ALK, crizotinib y alectinib exhibieron valores de energía de unión similares al interactuar con KRAS^{wt}, KRAS^{G12C} y ALK. Sin embargo, se observó una disminución en las energías de unión de los inhibidores adragasib, sotorasib y SML8-73-1 al interactuar con ALK en comparación con KRAS^{wt} y KRAS^{G12C}, como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Energía de unión KRAS^{wt}, KRAS^{G12C}, ALK

Fármacos	KRAS ^{wt} (kcal/mol)	KRAS ^{G12C} (kcal/mol)	ALK (kcal/mol)
Adagrasib	55,41	55,71	46,01
Sotorasib	57,75	49,63	35,58
SML	79,22	79,82	44,18
Crizotinib	42,77	46,20	42,37
Alectinib	51,74	54,69	44,94

Los inhibidores adragasib y sotorasib, al ser específicos para KRAS, se acoplaron en el sitio de unión al fármaco (DBS) de las proteínas KRAS^{wt} y KRAS^{G12C}. Se observaron energías de interacción de 55,41 kcal/mol y 55,71 kcal/mol, respectivamente, para adragasib, y 57,75 kcal/mol y 49,63 kcal/mol para los complejos formados con sotorasib. Aunque estos fármacos también se acoplaron con ALK, los resultados revelaron valores inferiores en comparación con los obtenidos al unirse a KRAS.

Alectinib, un inhibidor de ALK, también se acopló en el mismo sitio que los fármacos específicos de KRAS, y presentó una energía de interacción de 51,74 kcal/mol y 54,69 kcal/mol para los complejos KRAS^{wt}-alectinib y KRAS^{G12C}-alectinib, respectivamente (Figuras 2A y 2B). Estos hallazgos señalan diferencias significativas en las interacciones moleculares entre los inhibidores específicos de KRAS y ALK.

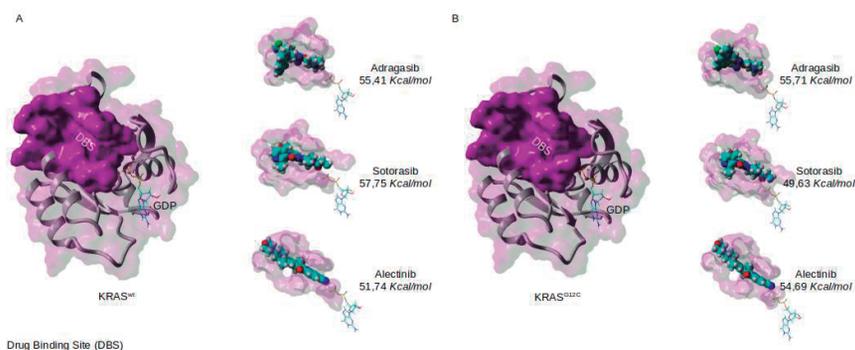


Figura 2A. KRAS e inhibidores que interactúan en el sitio de unión al fármaco

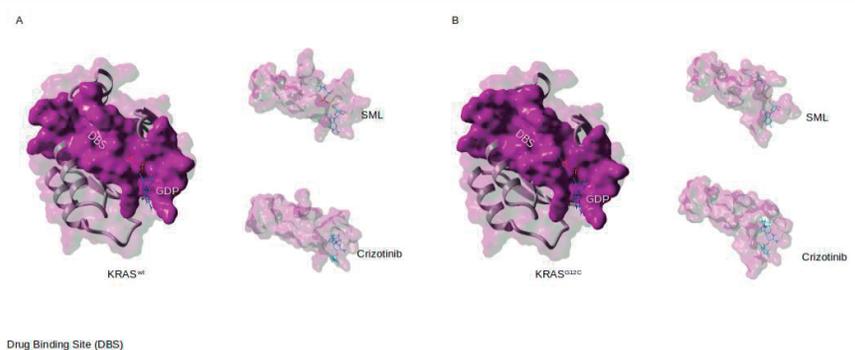


Figura 2B. KRAS e inhibidores que interactúan en el sitio de unión de GDP

Se seleccionó SML8-73-1 como un inhibidor competitivo de GDP, lo que orientó el acoplamiento hacia el sitio de interacción GDP-KRAS. Los valores obtenidos para la interacción de KRAS^{wt} y KRAS^{G12C} con SML8-73-1 fueron de 79,22 kcal/mol y 79,82 kcal/mol, respectivamente. Además, la interacción de SML8-73-1 con ALK mostró un valor de 44,18 kcal/mol, lo que indica una interacción menos energética en comparación con las interacciones con KRAS^{wt} y KRAS^{G12C}.

En relación con el acoplamiento de crizotinib con KRAS^{wt} y KRAS^{G12C}, se observaron valores de energía de interacción de 42,77 kcal/mol y 46,20 kcal/mol, respectivamente. Estos valores resultaron ser muy similares a la energía de interacción obtenida entre crizotinib y ALK (42,37 kcal/mol), como se muestra en las Figuras 3A y 3B.

Expresión de la Vía RAS/MEK

Se analizó la expresión de la vía RAS/MEK en las líneas celulares Ba/F3 EML4-ALK^{wt}, Ba/F3 EML4-ALK^{L1196M} y Ba/F3 EML4-ALK^{G1202R} bajo distintas condiciones en ensayos independientes. Estas condiciones incluyeron un grupo control sin tratamiento, un grupo tratado con 50 nM de crizotinib y otro grupo tratado con alectinib 50 nM. Los valores obtenidos representan

la transformación (Fold Change = FC) de la expresión normalizada de RAS y MEK en relación con la β -actina.

Los resultados revelaron una disminución significativa de la expresión de RAS en las tres líneas celulares (EML4-ALK^{G1202R} < EML4-ALK^{L1196M} < EML4-ALK^{wt}) en comparación con la expresión de la β -actina. Además, se observó una disminución significativa de la expresión en las líneas Ba/F3 EML4-ALK^{wt} y EML4-ALK^{L1196M} tratadas con crizotinib y alectinib en comparación con sus respectivos grupos control. En el caso de la línea Ba/F3 EML4-ALK^{G1202R}, se observó una baja expresión constante de RAS tanto en el grupo control como en los grupos tratados con crizotinib y alectinib. Estos hallazgos indican de manera consistente una regulación diferencial de la expresión de RAS en respuesta a los tratamientos con los inhibidores crizotinib y alectinib en las líneas celulares analizadas (Figura 3A).

En cuanto a la expresión de MEK, se observó un aumento significativo en la línea Ba/F3 EML4-ALK^{wt} que fue tratada con alectinib en comparación con su grupo control y el grupo tratado con crizotinib. Asimismo, se detectó un incremento notable en la expresión de MEK en la línea Ba/F3 EML4-ALK^{L1196M}, con un aumento adicional en el grupo que recibió tratamiento con alectinib. Por el contrario,

Propuesta de estrategias terapéuticas combinadas para KRAS en
cáncer de pulmón de células no pequeñas a partir de análisis *in silico*

se observó una disminución significativa en la expresión de MEK en la línea Ba/F3 EML4-ALK^{G1202R}, tanto en su grupo

control como en los grupos tratados con crizotinib y alectinib (Figura 3B).

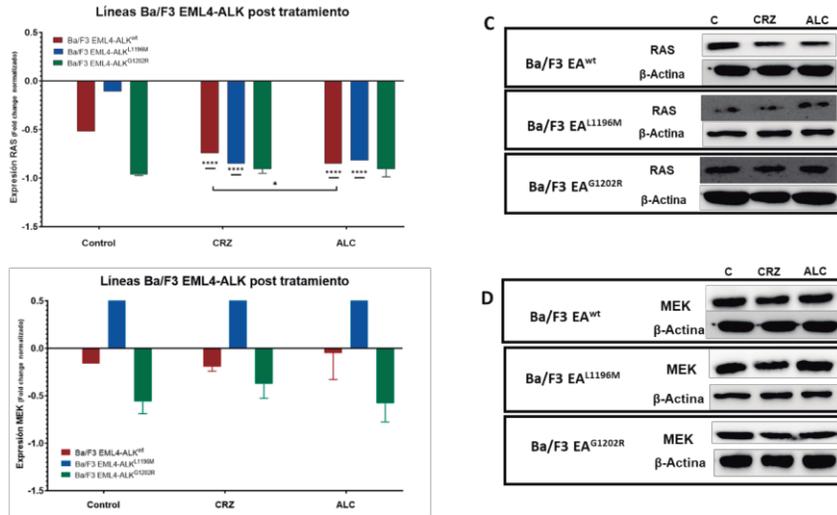


Figura 3. Expresión de RAS y MEK en líneas celulares de CPCNP ALK+ tratadas con inhibidores de ALK. A y B. Expresión de RAS y MEK normalizada en líneas celulares EML4-ALK^{wt}, EML4-ALK^{L1196M}, y EML4-ALK^{G1202R} tratadas con 50 nM de crizotinib (CRZ) y 50 nM de alectinib (ALC). C y D. Expresión de RAS y MEK mediante Western blot: comparación por grupos múltiples de variables utilizando Anova y test de Tukey considerándose estadísticamente significativo para $p < 0,05$ (* = 0,0332; ** = 0,0021; *** = 0,0002; **** = <0,0001) y no significativo $p = 0,1234$.

DISCUSIÓN

El gen KRAS (Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) es ampliamente reconocido como un oncogén que codifica la proteína transdutora de GTPasa KRAS, por lo que desempeña un papel fundamental en la regulación de la división celular y en la transmisión de señales externas al núcleo celular (23). Junto con las alteraciones genéticas en EGFR y ALK, estas representan algunas de las anomalías más frecuentes identificadas en el CPCNP.

Aunque las mutaciones en los genes KRAS y ALK suelen presentarse de manera mutuamente excluyente, diversos estudios han revelado la coexistencia de ambas mutaciones en ciertos casos clínicos (23,24). La presencia de mutaciones en el gen KRAS ha demostrado tener un impacto significativo en la transformación celular, lo que genera una mayor resistencia a la quimioterapia y a las terapias biológicas dirigidas a los receptores del factor de crecimiento epidérmico.

Dada la complejidad de la activación descontrolada de las vías de señalización, especialmente en la proliferación celular, se resalta en este estudio la importancia de buscar nuevas estrategias terapéuticas para abordar eficazmente estas anomalías moleculares. En este sentido, se llevaron a cabo experimentos tanto *in silico* como *in vitro*, con el objetivo de proporcionar una base sólida para el desarrollo de terapias más efectivas y específicas dirigidas

a contrarrestar la cascada de señalización activada en el contexto de las mutaciones en KRAS y ALK en el CPCNP.

Resultados clínicos de series cortas han señalado a las mutaciones de KRAS como un posible mecanismo de resistencia secundaria a los inhibidores de ALK, como el crizotinib, lo que sugiere una asociación potencial entre la alteración conjunta de ALK y KRAS y la resistencia primaria al tratamiento con inhibidores de ALK (25). En concordancia con estos hallazgos, los resultados de esta investigación revelan que el crizotinib, un inhibidor quinasa competitivo de ATP, se acopla en el sitio de unión al GDP con valores de energía de interacción comparables tanto en KRAS^{wt} como en KRAS^{G12C}, así como en ALK.

Por otro lado, alectinib mostró una preferencia por el sitio de unión al fármaco (DBS) en lugar del sitio de unión al GDP. Los valores de energía de interacción obtenidos fueron notablemente más altos cuando interactuaban con KRAS^{wt} y KRAS^{G12C} en comparación con ALK. Estos resultados sugieren la posibilidad de interacciones cruzadas entre los inhibidores quinasa de ALK y KRAS^{wt}, así como KRAS^{G12C}. Sin embargo, las pruebas realizadas con los inhibidores específicos de KRAS^{wt} y KRAS^{G12C} con ALK revelaron valores de energía de acoplamiento inferiores, indicando una menor afinidad en estas.

Estos hallazgos plantean la posibilidad de explorar terapias combinadas que involucren tanto inhibidores de ALK como de KRAS, dado que la evidencia clínica ha sugerido una respuesta limitada al tratamiento exclusivo con inhibidores de tirosina quinasa en pacientes con mutaciones ALK-KRAS. En este sentido, la evaluación de la expresión de RAS en las líneas celulares Ba/F3 EML4-ALK^{wt}, L1196M y G1202R tratadas con los fármacos mencionados proporciona importante información para comprender mejor las respuestas celulares en presencia de estos inhibidores. Estos resultados sugieren posibles estrategias terapéuticas combinadas más efectivas para abordar la complejidad de las vías de señalización en el CPCNP.

Los resultados obtenidos mediante el enfoque *in silico* subrayan la importancia de explorar terapias combinadas en el tratamiento del CPCNP. En relación con nuestra investigación, estudios previos han señalado que los pacientes con CPCNP ALK+ que también presentan mutaciones en KRAS^{G12C} podrían exhibir una respuesta mejorada al tratamiento con brigatinib, aunque la eficacia aún no alcanza niveles significativos⁽¹⁸⁾. La resistencia observada en pacientes con KRAS^{G12C} hacia adagrasib y sotorasib ha sido documentada en investigaciones recientes, aunque los mecanismos subyacentes siguen siendo objeto de estudio^(9,26,27).

Actualmente, se están investigando posibles tratamientos sinérgicos que involucran sotorasib y adagrasib en combinación con inhibidores de MEK, EGFR, inhibidores de puntos de control inmune e inhibidores de tirosina quinasa⁽²⁸⁾, con la esperanza de lograr mejoras en las respuestas terapéuticas⁽⁹⁾. Algunos estudios han propuesto combinaciones como sotorasib + crizotinib, este último actuando como inhibidor de MEK, y han mostrado resultados prometedores en la mejora de las respuestas⁽²⁹⁾. Además, la eficacia de sotorasib en combinación con otras drogas anticancerígenas ha sido respaldada por hallazgos recientes⁽²⁴⁾.

En contraste con los resultados de la proteína MEK obtenidos en nuestro estudio, que mostraron cambios leves, pero no significativos en su expresión, es posible que MEK no sea el principal contribuyente a la proliferación tumoral en los modelos celulares de CPCNP analizados. Aunque investigaciones anteriores han sugerido que los inhibidores de MEK podrían ser efectivos en la supresión de la actividad proliferativa en el CPCNP⁽³⁰⁾, nuestros hallazgos indican que, en este contexto particular, otras vías como la de PI3K/AKT/mTOR podrían desempeñar un papel más crucial y podrían considerarse como posibles dianas terapéuticas para futuras investigaciones.

En conclusión, los estudios realizados *in silico* muestran la posibilidad de interacción entre los inhibidores de ALK como crizotinib y alectinib hacia KRAS^{wt} y KRAS^{G12C}, y exhiben un

acoplamiento similar y superior al obtenido al interactuar con ALK. Sin embargo, los inhibidores de KRAS^{wt} y KRAS^{G12C} como adagrasib y sotorasib muestran valores inferiores de acoplamiento frente a ALK, en comparación con KRAS^{wt}. Finalmente, luego de la evaluación de la expresión de RAS, donde se identifica una disminución en su expresión en las líneas tratadas con crizotinib y alectinib, se reafirma el acoplamiento molecular detectado entre KRAS y KRAS^{wt} con los inhibidores de ALK. Estos resultados nos permiten sugerir una posible terapia combinada entre inhibidores de KRAS y ALK para los casos de coexistencia de ambas mutaciones para evaluar en posteriores ensayos con líneas celulares.

Agradecimiento: A los investigadores Diletta Fontana y Luca Mogni por ceder sus modelos celulares murinos de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Contribución de los autores: DCR y SIV conceptualizaron el estudio. JFC y RZD se encargaron de la curación de los datos y del software para el estudio. JFC, BMD, SIV y RZD realizaron el análisis formal del estudio. SIV y RZD gestionaron el financiamiento ante Concytec-Prociencia. JFC y SIV propusieron el método de investigación. BMD se responsabilizó por la administración del proyecto. JFC, RZD y SIV supervisaron la investigación. DCR redactó el borrador original. Todos los autores contribuyeron a la investigación, también participaron en la redacción, la revisión y edición del artículo.

Fuentes de financiamiento: La investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (Concytec), a través del programa Prociencia, por el proyecto “Determinación *in vitro* de nuevas dianas terapéuticas en modelos celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas positivo para la mutación del gen linfoma anaplásico quinasa (ALK) resistente a inhibidores selectivos de la proteína ALK”, con número de contrato 375-2019.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amorín Kajatt E. Lung cancer: a review of current knowledge, diagnostic methods and therapeutic perspectives. Rev Peru Med Exp Salud Publica [Internet]. 2013;30(1):85-92.
2. Dammacco F, Silvestris F. Oncogenomics. 1.ª ed. India: Academic press; 2018.
3. Sabir SR, Yeoh S, Jackson G, Bayliss R. EML4-ALK variants: biological and molecular properties, and the implications for patients. Cancers (Basel) [Internet]. 2017;9(9):118.
4. Liu XQ, Kiefl R, Roskopf C, Tian F, Huber RM. Interactions among lung cancer cells, fibroblasts, and macrophages in 3D co-cultures and the impact on MMP-1 and VEGF expression. PLoS One [Internet]. 2016;11(5):1-14.
5. Du X, Shao Y, Qin HF, Tai YH, Gao HJ. ALK-rearrangement in non-small-

Propuesta de estrategias terapéuticas combinadas para KRAS en cáncer de pulmón de células no pequeñas a partir de análisis *in silico*

- cell lung cancer (NSCLC). *Thorac Cancer* [Internet]. 2018;9(4):423-30.
6. Muller IB, De Langen AJ, Honeywell RJ, Giovannetti E, Peters GJ. Overcoming crizotinib resistance in ALK-rearranged NSCLC with the second-generation ALK-inhibitor ceritinib. *Expert Rev Anticancer Ther* [Internet]. 2016;16(2):147-57.
 7. Huang L, Guo Z, Wang F, Fu L. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2021;6(1):1-20.
 8. Uras IZ, Moll HP, Casanova E. Targeting KRAS mutant non-small-cell lung cancer: past, present and future. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020;21(12):1-30.
 9. Veluswamy R, Mack PC, Houldsworth J, Elkhoully E, Hirsch FR. KRAS G12C-Mutant non-small cell lung cancer: biology, developmental therapeutics, and molecular testing. *J Mol Diagn* [Internet]. 2021;23(5):507-20.
 10. Román M, Baraibar I, López I, Nadal E, Rolfo C, Vicent S, et al. KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target. *Mol Cancer* [Internet]. 2018;17(1):1-14.
 11. Lee A. Sotorasib: A review in KRAS G12C mutation-positive non-small cell lung cancer. *Target Oncol* [Internet]. 2022;17(6):727-33.
 12. Elliott J, Bai Z, Hsieh SC, Kelly SE, Chen L, Skidmore B, et al. ALK inhibitors for non-small cell lung cancer: a systematic review and network meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(2):1-18.
 13. Sankar K, Gadgeel SM, Qin A. Molecular therapeutic targets in non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* [Internet]. 2020;20(8):647-61.
 14. Pan Y, Deng C, Qiu Z, Cao C, Wu F. The resistance mechanisms and treatment strategies for ALK-Rearranged non-small cell lung cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2021;11:713530.
 15. Friboulet Luc, Li N, Katayama R, Lee CC, Gairnor JF, Crystal AS, et al. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* [Internet]. 2014;4(6):662-73.
 16. Bayliss R, Choi J, Fennell DA, Fry AM, Richards MW. Molecular mechanisms that underpin EML4-ALK driven cancers and their response to targeted drugs. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2016;73(6):1209-24.
 17. Rao Q, Zuo B, Lu Z, Gao X, You A, Wu C, et al. Tumor-derived exosomes elicit tumor suppression in murine hepatocellular carcinoma models and humans in vitro. *Hepatology* [Internet]. 2016;64(2):456-72.
 18. Bordi P, Tiseo M, Rofi E, Petrini I, Restante G, Danesi R, et al. Detection of ALK and KRAS mutations in circulating tumor DNA of patients with advanced ALK-Positive NSCLC with disease progression during crizotinib treatment. *Clin Lung Cancer* [Internet]. 2017;18(6):692-7.
 19. Martorell PM, Huerta M, Compañ Quilis A, Abellán R, Seda E, Blesa S, et al. Coexistence of EGFR, KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations and ALK rearrangement in a comprehensive cohort of 326 consecutive Spanish nonsquamous NSCLC patients. *Clin Lung Cancer* [Internet]. 2017;18(6):e395-402.
 20. Salgia R, Pharaon R, Mambetsariev I, Nam A, Sattler M. The improbable targeted therapy: KRAS as an emerging target in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cell Rep Med* [Internet]. 2021;2(1):100186.
 21. Ferreira LG, Dos Santos RN, Oliva G, Andricopulo AD. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules* [Internet]. 2015;20(7):13384-421.
 22. Fontana D, Ceccon M, Gambacorti-Passerini C, Mologni L. Activity of second-generation ALK inhibitors against crizotinib-resistant mutants in an NPM-ALK model compared to EML4-ALK. *Cancer Med* [Internet]. 2015;4(7):953-65.
 23. Lee B, Lee T, Lee SH, Choi YL, Han J. Clinicopathologic characteristics of EGFR, KRAS, and ALK alterations in 6,595 lung cancers. *Oncotarget* [Internet]. 2016;7(17):23874-84.
 24. De Langen AJ, Johnson ML, Mazieres J, Dingemans Anne-Marie, Mountzios G, Pless M, et al. Sotorasib versus docetaxel for previously treated non-small-cell lung cancer with KRASG12C mutation: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* [Internet]. 2023;401(10378):733-46.
 25. Schmid S, Gautschi O, Rothschild S, Mark M, Froesch P, Klingbiel D, et al. Clinical outcome of ALK-Positive non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with de novo EGFR or KRAS co-mutations receiving tyrosine kinase inhibitors (TKIs). *J Thorac Oncol* [Internet]. 2017;12(4):681-8.
 26. Awad MM, Liu S, Rybkin II, Arbour KC, Dilly J, Zhu VW, et al. Acquired Resistance to KRAS G12C inhibition in cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2021;384(25):2382-93.
 27. Yang SR, Schultheis AM, Yu H, Mandelker D, Ladanyi M, Büttner R. Precision medicine in non-small cell lung cancer: Current applications and future directions. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2022;84:184-98.
 28. Adderley H, Blackhall FH, Lindsay CR. KRAS-mutant non-small cell lung cancer: converging small molecules and immune checkpoint inhibition. *EBioMedicine* [Internet]. 2019;41:711-6.
 29. Suzuki S, Yonesaka K, Teramura T, Takehara T, Kato R, Sakai H, et al. KRAS inhibitor-resistance in MET-amplified KRASG12C non-small cell lung cancer induced by RAS- and non-RAS-mediated cell signaling mechanisms. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2021;27(20):5697-707.
 30. Subbiah V, Baik C, Kirkwood JM. Clinical Development of BRAF plus MEK inhibitor combinations. *Trends Cancer* [Internet]. 2020;6(9):797-810.

Correspondencia:

Daniela Chapilliquen Ramirez

Dirección: Cantuarias 355, Miraflores. Lima, Perú.

Teléfono: +51 944 619 675

Correo electrónico: daniela.chapilliquen@alum.udel.edu.pe

stefany.infante@udel.edu.pe

Recibido: 26 de octubre de 2023

Evaluado: 1 de diciembre de 2023

Aprobado: 20 de diciembre de 2023

© La revista. Publicado por la Universidad de San Martín de Porres, Perú.

 Licencia de Creative Commons. Artículo en acceso abierto bajo términos de Licencia Creative Commons. Atribución 4.0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

ORCID iD

Daniela Chapilliquen Ramirez

 <https://orcid.org/0000-0001-7577-6696>

Juan Faya Castillo

 <https://orcid.org/0000-0002-3408-7971>

Richard Zapata Dongo

 <https://orcid.org/0000-0001-7634-1029>

Brenda Moy Díaz

 <https://orcid.org/0009-0008-3055-975X>

Stefany Infante Varillas

 <https://orcid.org/0000-0002-3067-233X>