

Comportamiento de la proteína antiapoptótica BCL2 en modelos celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas frente a tratamientos con inhibidores ALK y su potencial inhibición dual BCL2-ALK

Richard Zapata-Dongo* ^{1,a}; Diletta Fontana ^{2,b}; Luca Mogni ^{2,c}; Juan Faya-Castillo ^{1,d}; Francesca Silva-Torres ^{1,e}; Brenda Moy-Diaz ^{1,f}; Stefany Infante-Varillas ^{1,a}

RESUMEN

Objetivo: Describir el comportamiento de la proteína BCL2 en modelos celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas frente a tratamientos con inhibidores de la tirosina proteína quinasa (crizotinib y alectinib) de ALK (quinasa de linfoma anaplásico) y su potencial inhibición dual BCL2-ALK.

Materiales y métodos: Se utilizaron tres modelos celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas: Ba/f3 EML4-ALK^{WT}, Ba/f3 EML4-ALK^{L1196M} y Ba/f3 EML4-ALK^{G1202R}, generados por mutagénesis dirigida. Estos fueron tratados a dosis-respuesta con crizotinib y alectinib, asimismo, se realizó un ensayo de apoptosis para corroborar la susceptibilidad farmacológica. Seguidamente, se procedió a medir la expresión de la proteína BCL2 en tres condiciones de tratamiento (sin tratamiento, 100 nM crizotinib y 50 nM alectinib). Finalmente, se realizó una búsqueda de los ligandos de BCL2 y ALK para la simulación del acoplamiento molecular y cálculo de energía de interacción medido en kcal/mol en el programa YASARATM.

Resultados: Se evidenció que el modelo WT mostró sensibilidad a crizotinib y alectinib, con porcentajes de apoptosis de 23 % y 74 %, respectivamente; G1202R, resistencia a ambos fármacos (apoptosis: 5 %); y L1196M, resistencia al crizotinib (apoptosis: 12 %) y sensibilidad al alectinib (apoptosis: 25 %). La expresión de BCL2 reveló sobreexpresión en los modelos WT y G1202R, mientras L1196M evidenció una expresión cercana a la basal. Los hallazgos bioinformáticos apuntaron a ABT-199 (perteneciente a la biblioteca de moléculas pequeñas) como el mejor candidato para inhibir BCL2, mientras que su interacción con ALK^{L1196M} reveló energías de interacción superiores a las obtenidas con el crizotinib y el alectinib.

Conclusiones: Los modelos celulares mostraron la susceptibilidad farmacológica descrita según la literatura. La expresión de BCL2 durante los tratamientos mantuvo sobreexpresados a WT y G1202R, mientras L1196M no mostró variación. Finalmente, los hallazgos bioinformáticos sugieren a ABT-199 como potencial acción dual de inhibición por exhibir una mayor energía de interacción con ALK.

Palabras clave: Bibliotecas de Moléculas Pequeñas; Cáncer de Pulmón de Células no Pequeñas; Inhibidores de la Tirosina Proteína Quinasa; Proteínas Proto-Oncogénicas c-bcl-2; Quinasa de Linfoma Anaplásico; Simulación del Acoplamiento Molecular (Fuente: DeCS BIREME).

Behavior of the anti-apoptotic BCL-2 protein in non-small-cell lung cancer cell models in response to treatments with ALK inhibitors and its potential dual BCL2-ALK inhibition

ABSTRACT

Objective: To describe the behavior of the BCL-2 protein in non-small-cell lung cancer cell models in response to treatment with ALK (anaplastic lymphoma kinase) protein tyrosine kinase inhibitors (crizotinib and alectinib) and their potential dual BCL-2-ALK inhibition.

Materials and methods: Three non-small-cell-lung cancer cell models were used: Ba/f3 EML4-ALK^{WT}, Ba/f3 EML4-ALK^{L1196M} and Ba/f3 EML4-ALK^{G1202R}, generated by site-directed mutagenesis. These were treated with crizotinib and alectinib in a dose-responsive manner, and an apoptosis assay was also conducted to confirm pharmacological susceptibility. Subsequently, BCL-2 protein expression was measured under three treatment conditions (no treatment, 100 nM crizotinib

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

2 Università degli Studi di Milano-Bicocca. Milan, Italia.

^a Magíster en Investigación Biomédica; ^b Ph. D. en Medicina Traslacional y Molecular; ^c Ph. D. Medicine; ^d magíster en Ciencias-Bioinformática; ^e estudiantes de Medicina Humana; ^f química farmacéutica.

*Autor corresponsal.

and 50 nM alectinib). Finally, a search for BCL-2 and ALK ligands was performed for molecular docking simulation and interaction energy calculation, measured in kcal/mol in the YASARA™ program.

Results: The WT model evidenced sensitivity to crizotinib and alectinib, with apoptosis percentages of 23 % and 74 %, respectively; G1202R showed resistance to both drugs (apoptosis: 5 %), and L1196M resistance to crizotinib (apoptosis: 12 %) and sensitivity to alectinib (apoptosis: 25 %). BCL-2 expression revealed overexpression in the WT and G1202R models, while L1196M showed expression close to baseline. Finally, bioinformatics findings identified ABT-199 (which is part of small molecule libraries) as the best candidate to inhibit BCL-2, while its interaction with ALK^{L1196M} revealed interaction energies higher than those obtained in the interaction with crizotinib and alectinib.

Conclusions: The cell models exhibited the pharmacological susceptibility described in the literature, BCL-2 expression during treatments remained overexpressed in WT and G1202R, while L1196M showed no variation. Finally, bioinformatics findings suggest ABT-199 as a potential dual action inhibitor due to its higher interaction energy with ALK.

Keywords: Small Molecule Libraries; Carcinoma, Non-Small-Cell Lung; Inhibitors, Tyrosine Kinase; Proto-Oncogene Proteins c-bcl-2; Anaplastic Lymphoma Kinase; Molecular Docking Simulation (Source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es el segundo tipo de cáncer diagnosticado a nivel mundial, específicamente el de células no pequeñas (CPCNP) en Estados Unidos de Norteamérica, que representa el 81 %^(1,2). Dentro de los muchos factores de riesgo del CPCNP, los oncogenes tales como KRAS (29 %), EGFR (19 %), ALK (3 %), entre otros, son los principales marcadores genéticos responsables de llevar a cabo esta neoplasia^(3,4). El gen quinasa de linfoma anaplásico (ALK, por sus siglas en inglés) traduce a una proteína de transmembrana ALK con dominio tirosina quinasa que, al fusionarse con el gen EML4^(5,6), conduce la fosforilación constitutiva de la proteína ALK y desencadena una cascada de señalizaciones tumorales dentro de la célula⁽⁷⁾. La fosforilación constitutiva en las células del CPCNP está siendo eludida con el inhibidor de la tirosina proteína quinasa de ALK “crizotinib”, y dirige el ambiente tumoral hacia la muerte celular; sin embargo, mutaciones puntuales en aminoácidos específicos tales como L1196M, G1202R, C1156Y, y otros más, han generado resistencia farmacológica. Por tanto, ha surgido la necesidad de la búsqueda de nuevas moléculas como ceritinib, alectinib, brigatinib y lorlatinib, que ya están aprobadas por la Asociación Norteamericana de Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) como algoritmo de tratamientos para evadir la resistencia y conducir hacia la apoptosis a las células tumorales⁽⁸⁻¹⁰⁾. Sin embargo, según lo descrito anteriormente, las mutaciones puntuales dentro la proteína ALK parecen interminables, por lo que siempre surgirá la necesidad de la búsqueda de más moléculas inhibitoras selectivas de ALK con cada mutación puntual.

Por otro lado, la proteína BCL2 es directamente responsable de activar la apoptosis, y actualmente ha sido descrita como diana terapéutica oncológica debido a su alta expresión en muchos tumores^(11,12). Una de las moléculas dirigidas hacia BCL2 es el ABT-199, aprobada por la FDA para su uso clínico en leucemia linfática crónica⁽¹³⁾, además de ello, se han

evidenciado resultados motivadores en el tratamiento de tumores sólidos, como el sarcoma, y en la terapia combinada^(14,15).

De acuerdo con este argumento, en este estudio se identificó a BCL2 como otra diana de ataque para conducir a la célula tumoral hacia la apoptosis y evitar que la proteína ALK obtenga las mutaciones puntuales. En ese sentido, proponemos estudiar el comportamiento de la proteína antiapoptótica BCL2 en modelos celulares de CPCNP frente a los tratamientos con inhibidores ALK (crizotinib y alectinib) y evaluar mediante estudios bioinformáticos la interacción entre el inhibidor de BCL2 y la proteína ALK, con la expectativa de exhibir una inhibición dual.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y población de estudio

El diseño de este estudio fue descriptivo, *in silico* e *in vitro*. Nuestra población de estudio fueron tres modelos celulares de CPCNP: Ba/F3 EML4-ALK^{WT}, Ba/F3 EML4-ALK^{L1196M} y Ba/F3 EML4-ALK^{G1202R}, los cuales fueron generados por mutagénesis dirigida *in vitro*⁽¹⁶⁾. Los modelos celulares fueron mantenidos en un medio de cultivo RPMI® suplementado con suero bovino fetal inactivado al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 %. Para asegurarse de su crecimiento celular, estos fueron incubados bajo condiciones y parámetros de temperatura de 37 °C y 5 % CO₂.

Variables y mediciones

Para determinar la susceptibilidad farmacológica, se utilizó el ensayo de proliferación celular con el reactivo CellTiter-Blue®; en este se calculó la dosis media máxima inhibitoria (IC50), cuyos valores referenciales (IC50 < 350 nM = sensible y IC50 > 350 nM = resistente), según Huan et al., permitieron determinar la sensibilidad o resistencia a los fármacos en los modelos celulares. Para

Comportamiento de la proteína antiapoptótica BCL2 en modelos celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas frente a tratamientos con inhibidores ALK y su potencial inhibición dual BCL2-ALK

ello, se cultivaron 105 células/mL de cada modelo celular (Ba/F3 EML4-ALK^{WT}, Ba/F3 EML4-ALK^{L1196M} y Ba/F3 EML4-ALK^{G1202R}) en placas de 96 pocillos, y fueron expuestos a los fármacos crizotinib y alectinib en ocho concentraciones seriadas de proporción (1:3), con una concentración máxima de 10 μ M y una mínima de 0 μ M. Después de 48 horas de tratamiento farmacológico, los modelos celulares fueron expuestos al reactivo CellTiter-Blue[®] al 10 %, incubados por tres horas y posteriormente monitoreados en un espectrofotómetro Multiskan Go (ThermoScientific[®]) a una longitud de onda de 490 nm. Los datos recolectados permitieron calcular la dosis máxima media inhibitoria (IC50).

Por otro lado, se procedió a determinar la apoptosis celular mediante citometría de flujo utilizando el kit de detección de apoptosis con anexina V eBioscience[™] (Thermo Fisher). Se cultivaron células Ba/F3 EML4-ALK^{WT}, BA/F3 EML4-ALK^{L1196M} y BA/F3 EML4-ALK^{G1202R} en placas de seis pocillos y se añadieron fármacos en las concentraciones de 100 nM crizotinib y 50 nM de alectinib. Después de 48 h de tratamiento, se recolectaron 500 000 células, se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 4 °C y se volvieron a suspender en 200 μ l de tampón de unión (1x). Se agregaron anexina V-FITC y yoduro de propidio (PI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis de citometría de flujo se realizó utilizando un citómetro de flujo Attune[™] NxT (ThermoFisher).

A continuación, se procedió a medir la expresión de proteínas mediante la técnica de western blot, que consistió en obtener lisados celulares mantenidos en laemly bufer (1X), los cuales fueron depositados en pocillos de gel de poliacrilamida SDS y transferidos a la membrana de nitrocelulosa. Luego, esta membrana fue bloqueada con leche libre de grasa (10 %) durante una hora, e inmediatamente después se inició el tratamiento con el anticuerpo primario anti-BCL2 (mouse) (Ab692, dilución 1:500 - abcam[®]) y anti-Actina (rabbit) (ab8227, dilución 1:1000 - abcam[®]) para dejar incubando por toda una noche a -4 °C. Al siguiente día, la membrana se expuso al anticuerpo secundario anti-mouse (ab190463, dilución 1:5000 - abcam[®]) y anti-rabbit (ab205718, dilución 1:5000 - abcam[®]), respectivamente, durante una hora; finalmente, fue revelada y expuesta en el Chemidoc Imaging Instrument (Bio Rad[®]), donde se evidenciaron las bandas de expresión.

Como último paso, se realizaron las simulaciones de acoplamiento molecular, donde en una primera etapa se importaron los códigos PDB 2YFX, 2YHV y 4ANS por separado en el programa YASARA[™] (17), como molde del sustrato, y los códigos PDB 3AOX y/o 600K como molde del ligando. A continuación, se superpusieron ambas estructuras y se procedió a eliminar todos los objetos, dejando solamente la estructura ALK^{L1196M} como sustrato y alectinib o ABT-199 como ligando. Seguidamente, se eligió el experimento de

minimización de energía, se procedió a unir los objetos sustrato-ligando y, por último, la energía de interacción calculada por el *software* fue medida en kcal/mol.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el *software* GraphPad Prism, versión 10.0.3. Para asegurar la reducción del sesgo estadístico, los experimentos se realizaron por triplicado y se tomó como dato de análisis el promedio aritmético \pm el error estándar. El cálculo del IC50 se realizó mediante una regresión no lineal paramétrica, ajustada a un intervalo de confianza del 95 %. Para la comparación por grupos múltiples de variables, se utilizó Anova y el test de Tukey, y se consideró estadísticamente significativo si $p < 0,05$ (* = 0,0332; ** = 0,0021; *** = 0,0002; **** \leq 0,0001) y no significativo si $p = 0,1234$.

Consideraciones éticas

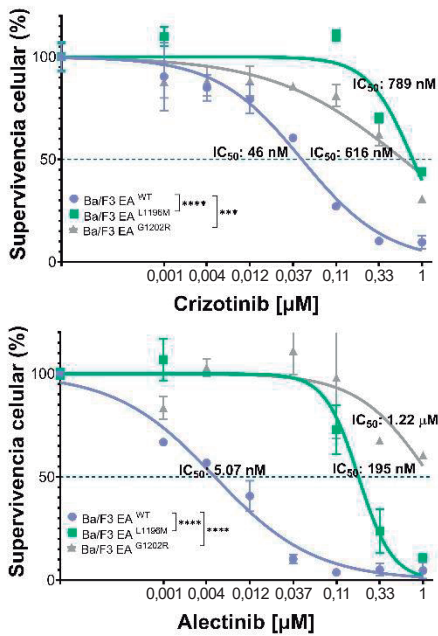
Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad de Piura (n.° PREMED0820219). No se requirió la intervención de seres humanos o muestras biológicas. Se desarrolló en los laboratorios de investigación Cultivo Celular, Inmunología y Biología Celular y Análisis de Proteína y Bioinformática de la Universidad de Piura.

RESULTADOS

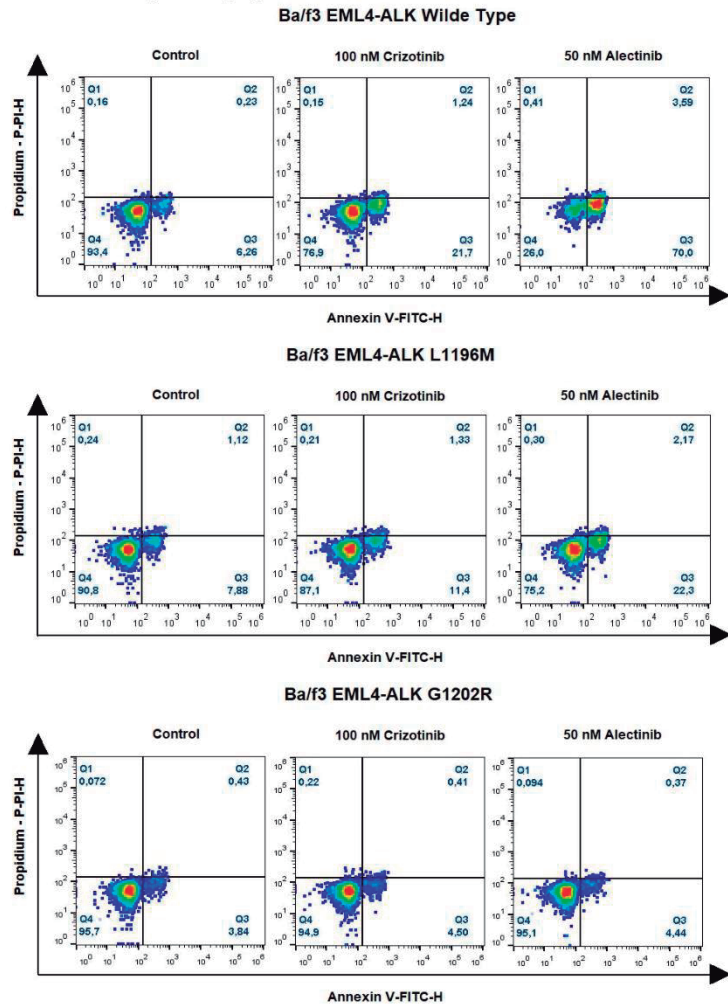
Sensibilidad heterogénea del modelo EML4-ALK^{L1196M} frente a los tratamientos con inhibidores ALK: crizotinib y alectinib

Los modelos celulares EML4-ALK^{WT}, EML4-ALK^{L1196M} y EML4-ALK^{G1202R} se expusieron a dosis-respuesta con los fármacos crizotinib y alectinib para evaluar su sensibilidad y resistencia (IC50 < 350 nM = sensible y IC50 > 350 nM = resistente, valores referenciales según Huan et al.) (18). El modelo EML4-ALK^{WT} mostró sensibilidad a crizotinib (IC50: 46 nM) y alectinib (IC50: 5,07 nM), EML4-ALK^{G1202R} mostró resistencia a crizotinib (IC50: 616 nM) y alectinib (IC50: 1,22 μ M), mientras que EML4-ALK^{L1196M} mostró resistencia a crizotinib (IC50: 789 nM) y sensibilidad a alectinib (IC50: 195 nM); este último mostró una sensibilidad heterogénea a los inhibidores de ALK (ver Figura 1a). Por otro lado, el ensayo de apoptosis expresado en porcentajes ratificó la sensibilidad del modelo EML4-ALK^{WT} (crizotinib: 23 %, alectinib: 74 %), la resistencia del modelo EML4-ALK^{G1202R} (crizotinib: 5 %, alectinib: 5 %) y la respuesta heterogénea del modelo EML4-ALK^{L1196M} (crizotinib: 12 %, alectinib: 25 %) (Figuras 1b y 1c). Nuestros resultados sugieren a estos modelos celulares como óptimos para el estudio de CPCNP.

a. Dosis-respuesta a inhibidores de ALK



b. Ensayo de apoptosis



c. Ratio de apoptosis

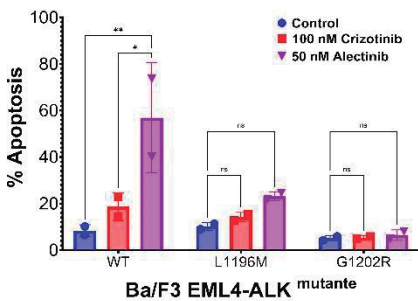


Figura 1. Susceptibilidad farmacológica y ensayo de apoptosis en los modelos celulares. 1a) Evaluación dosis-respuesta de los modelos celulares Ba/F3 EML4-ALK mutante (WT, L1196M, G1202R) a crizotinib y alectinib: WT muestra sensibilidad a crizotinib (IC₅₀: 46 nM) y alectinib (IC₅₀: 5,07 nM), L1196M muestra resistencia a crizotinib (IC₅₀: 789 nM) y sensibilidad a alectinib (IC₅₀: 195 nM) y G1202R muestra resistencia a crizotinib (IC₅₀: 616 nM) y alectinib (IC₅₀: 1220 nM). 1b) Ensayo de apoptosis donde se verifica la susceptibilidad farmacológica de los modelos celulares frente a los tratamientos con crizotinib y alectinib. 1c) Gráfico de barras donde se representa el ratio de apoptosis total.

Expresión relativa heterogénea de la proteína BCL2 en los modelos celulares EML4-ALK

Se procedió a medir la expresión de la proteína BCL2 en los modelos EML4-ALK^{WT}, EML4-ALK^{L1196M} y EML4-ALK^{G1202R} en tres condiciones diferentes: control = 0 nM (sin tratamiento), crizotinib = 100 nM y alectinib = 50 nM. Los resultados evidenciaron la sobreexpresión de la proteína BCL2 normalizada en los modelos EML4-ALK^{WT} (control: 1,91 ± 1,5; 100 nM crizotinib: 1,63 ± 0,23; 50 nM alectinib: 0,95 ± 0,27) y EML4-ALK^{G1202R} (control: 0,995 ± 0,12; 100 nM

crizotinib: 0,072 ± 0,6; 50 nM alectinib: 0,636 ± 0,446), mientras que el modelo EML4-ALK^{L1196M} (control: -0,196 ± 0,305; 100 nM crizotinib: -0,301 ± 0,27; 50 nM alectinib: 0,11 ± 0,04) mostró una expresión relativamente cercana al valor basal (Figura 2c). La expresión de BCL2 dentro de cada grupo celular no mostró diferencia significativa entre las condiciones sometidas de tratamiento, y el grupo celular que destacó fue EML4-ALK^{L1196M}, con una expresión relativa cercana a la basal (Figuras 2a y 2b).

Comportamiento de la proteína antiapoptótica BCL2 en modelos celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas frente a tratamientos con inhibidores ALK y su potencial inhibición dual BCL2-ALK

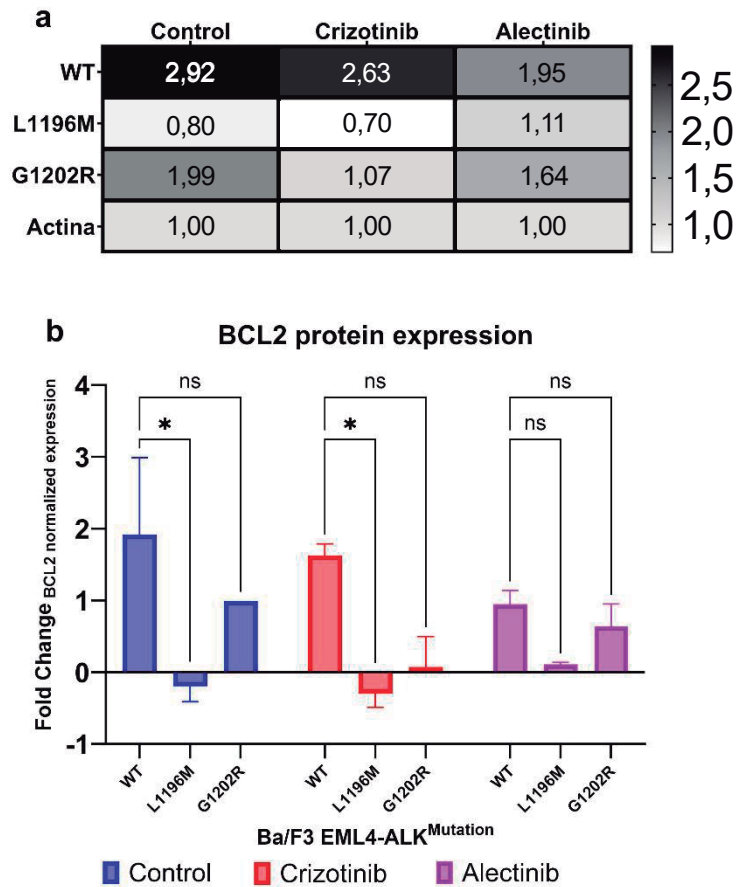


Figura 2. Expresión de la proteína BCL2 en los modelos celulares. 2a) Mapa de calor que representa la cuantificación de la expresión de la proteína BCL2 (valores superiores a 1: sobreexpresión; valores menores a 1: inhibición de la expresión). 2b) Gráfico de barras que muestra la expresión de BCL2 normalizada con el valor de la actina. Los modelos WT y G1202R exhiben la sobreexpresión de BCL2, L1196M exhibe la expresión de BCL2 cercana a la basal.

Actividad selectiva del ligando ABT-199 por la proteína BCL2

Se realizó una búsqueda del mejor ligando selectivo de la proteína BCL2. En la plataforma Uniprot, se introdujo el nombre de la proteína con el filtro de búsqueda en humanos. La molécula que cumplió estos parámetros fue identificada con el código P10415⁽¹⁹⁾. En el apartado de estructura se identificaron 28 estructuras PDB (difracción de rayos X: 22 estructuras; resonancia magnética nuclear: 6 estructuras) y una estructura predicha por la inteligencia artificial AlphaFold. El primer criterio de exclusión fue seleccionar aquellas estructuras que estén en interacción con un ligando y no porten alguna mutación en la proteína BCL2 (n = 11) (Figura 3a). El segundo criterio de exclusión

fue evaluar el nivel de resolución (alta resolución = valor cercano a 1Å), para lo cual se tomó como punto de corte a valores inferiores a 2Å. Las moléculas resultantes fueron identificadas con los códigos PDB 6O0K⁽²⁰⁾, 5VAU y 4LXD con ligandos identificados como ABT-199 (venetoclax), beclin 1 y navitoclax, respectivamente; este último no fue tomado en cuenta por no ser únicamente selectivo a BCL2, y tampoco beclin 1, por presentar un rol en la autofagia. ABT-199, también conocido como venetoclax, fue la única molécula que cumplió estos criterios, por tanto, se sugirió considerarla como un ligando selectivo de la proteína BCL2.

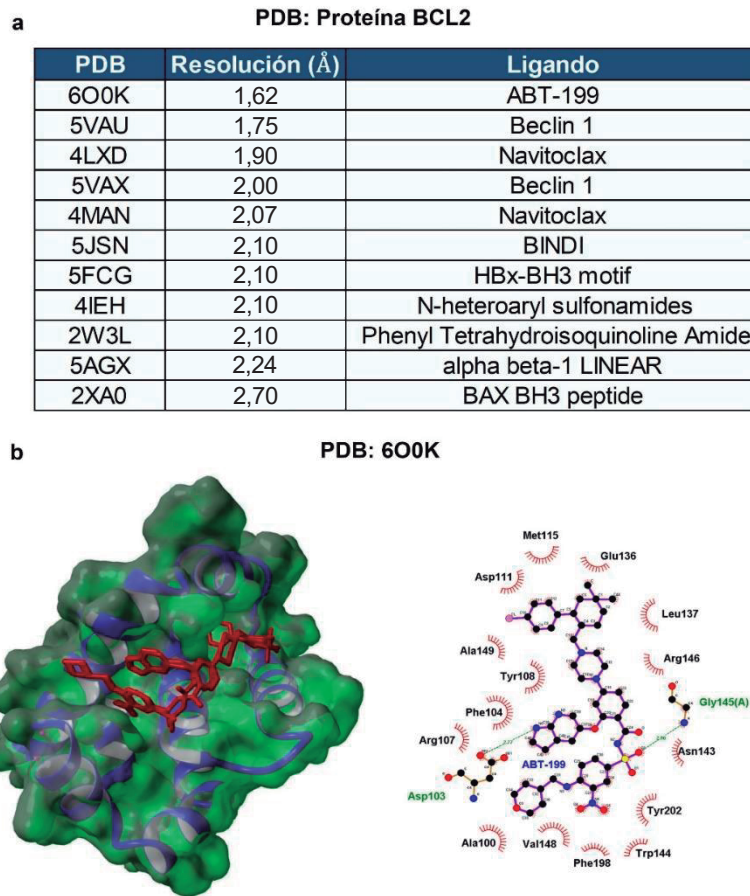


Figura 3. Proteína BCL2 (PDB: 6O0K) y su ligando ABT-199. 3a) Lista de PDB públicos descargados de la plataforma RSCB-PDB (<https://www.rcsb.org>), ordenados según el nivel de resolución. 3b) En la izquierda, la estructura tridimensional del PDB 6O0K (BCL2 en azul-verde, interactuando con el ligando ABT-199 en rojo), y en la derecha, la interacción bidimensional del ligando ABT-199 con aminoácidos específicos dentro del sitio catalítico de BCL2 (imagen generada en LigPlot).

Exhibición de mayor energía de interacción entre ABT-199 y ALK respecto a los inhibidores crizotinib y alectinib

Se identificó al modelo ALK^{L1196M} con una expresión basal de BCL2, por lo cual se eligió a este modelo para evaluar su interacción con ABT-199. Para ello, se realizó la búsqueda de la proteína ALK bajo el mismo protocolo de búsqueda para BCL2. La molécula ALK con estos parámetros, identificada con el código Q9UM73⁽²¹⁾, mostró una estructura predicha por AlphaFold y 77 estructuras PDB (microscopía electrónica: 1; resonancia magnética nuclear: 5; y por difracción de rayos X: 71). Se identificaron las estructuras con la mutación L1196M (n = 7 estructuras) y con el ligando crizotinib (n = 3), y se obtuvieron los siguientes códigos PDB con su energía de interacción molecular: 2YFX (31 1677 kcal/mol), 2YHV

(31 1674 kcal/mol)⁽²²⁾ y 4ANS (37 0791 kcal/mol). Por otro lado, se procedió a predecir los acoplamientos y medición de la energía de interacción de los PDB descritos al interactuar con alectinib (ligando de referencia alectinib del código PDB 3AOX⁽²³⁾), y con el ligando ABT-199 (ligando de referencia ABT-199 del código PDB 6O0K) (Figuras 4a y 4b). Nuestros resultados evidenciaron diferencias significativas entre la interacción de ALK^{L1196M} con ABT-199 con una energía de interacción superior a la obtenida con crizotinib y alectinib, los cuales son inhibidores directos de ALK, por lo que estos hallazgos lo sugieren como potencial ligando dual dirigido hacia la proteína BCL2 y ALK^{L1196M} (Figura 4c).

Comportamiento de la proteína antiapoptótica BCL2 en modelos celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas frente a tratamientos con inhibidores ALK y su potencial inhibición dual BCL2-ALK

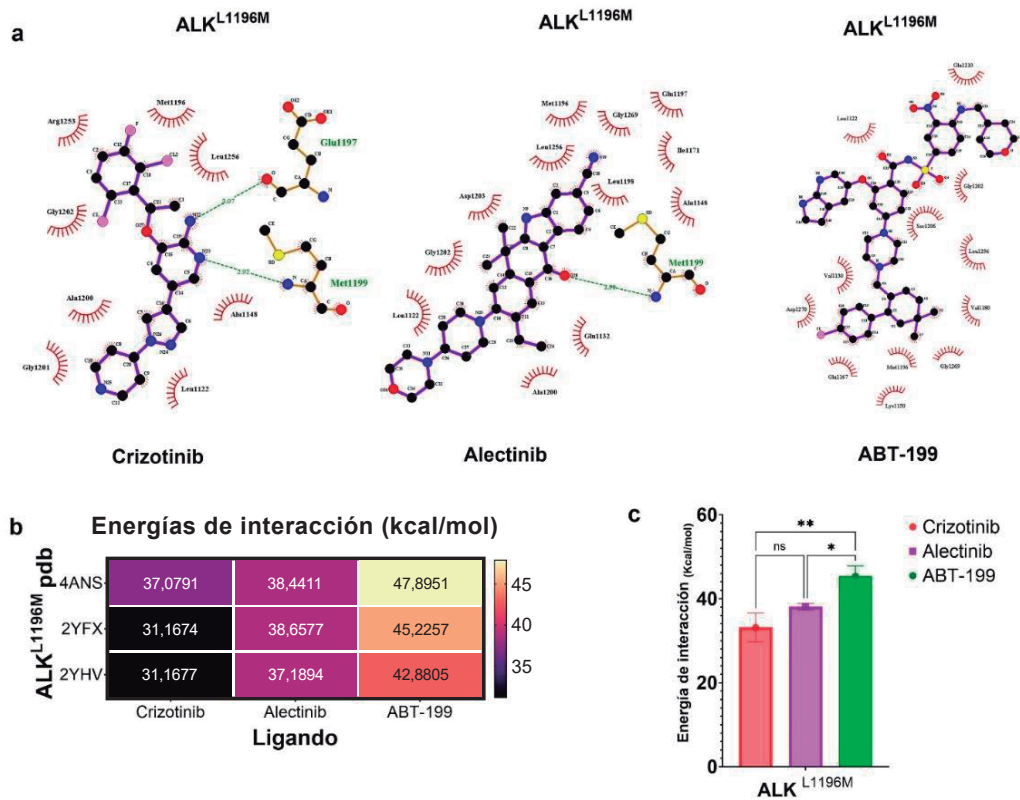


Figura 4. Energías de interacción evidencian a ABT-199 como candidato de unión al sitio activo de la proteína ALK^{L1196M}. 4a) Ligandos crizotinib, alectinib y ABT-199 interactúan con aminoácidos específicos del sitio activo de la proteína ALK^{L1196M} (imagen generada en LigPlot). 4b) Mapa de calor muestra las energías de interacción entre las estructuras de ALK^{L1196M} con crizotinib, alectinib y ABT-199. 4c) Gráfico de barras muestra el promedio de las energías de interacción, donde destaca ABT-199 con energía de interacción superior a crizotinib y alectinib.

DISCUSIÓN

Los tratamientos con los inhibidores de ALK (crizotinib y alectinib) en los modelos celulares EML4-ALK^{WT}, EML4-ALK^{L1196M} y EML4-ALK^{G1202R} evidenciaron sensibilidad y resistencia según lo reportado por la literatura, lo cual señala que estos modelos son óptimos para caracterizar la expresión de la proteína BCL2 durante los tratamientos (16,24,25). Por otro lado, estudios han revelado que la alta expresión de BCL2 en pacientes con CPCNP predice resultados favorables y podría considerarse como un marcador de buen pronóstico. En el presente estudio, los resultados evidenciaron a los modelos celulares EML4-ALK^{WT} y EML4-ALK^{G1202R} con una alta expresión de BCL2, por lo cual, según lo descrito previamente, serían buenos candidatos para ser sensibles a un inhibidor de BCL2, mientras que podría sostenerse la hipótesis de que la inhibición en el modelo EML4-ALK^{L1196M} con expresión basal de BCL2 podría ser más efectiva (26,27).

Actualmente, la sobreexpresión de BCL2 es considerada como una diana terapéutica oncológica mediante el uso de pequeñas moléculas inhibitorias mimetizadoras de la proteína en mención, dentro de las que destaca ABT-199, conocida también como venetoclax (13,28).

En nuestro estudio, la búsqueda de inhibidores dirigidos a la proteína BCL2 también apuntó a ABT-199 como la molécula que reúne todas las condiciones con características de ligando. Del mismo modo, según nuestros hallazgos bioinformáticos, las energías de interacción con ALK^{L1196M} son superiores a las interacciones con crizotinib y alectinib, respectivamente (22), por lo que se le sugiere como un ligando con potencial inhibición dual tanto para la proteína BCL2 como para ALK. Estos resultados son motivadores debido a que no se ha descrito a ABT-199 como un ligando dual; en la literatura lo refieren como un ligando selectivo de BCL2 ya aprobado por la FDA (13), mientras que

otros estudios sustentan que ABT-199 podría tener un rol protagónico en la terapia combinada^(29,30). A partir de este estudio, queda por dilucidar la expresión de ALK y BCL2 durante el tratamiento con ABT-199.

En conclusión, en los modelos celulares EML4-ALK^{WT}, EML4-ALK^{L1196M} y EML4-ALK^{G1202R} se evidenció susceptibilidad farmacológica a crizotinib y alectinib según lo descrito por la literatura. Esto también fue confirmado por los ensayos de apoptosis. Por otro lado, los modelos celulares WT y G1202R evidenciaron sobreexpresión de la proteína BCL2, mientras que L1196 exhibió una expresión cercana a la basal. Además, nuestros estudios bioinformáticos sugieren la potencial inhibición dual de ABT-199 dirigido a BCL2 y ALK por presentar energías de interacciones superiores a la calculada por ALK en interacción con crizotinib y alectinib. Finalmente, como recomendación sugerimos estudiar la expresión de BCL2 y ALK en los diferentes modelos celulares EML4-ALK mutante durante el tratamiento con ABT-199, con la finalidad de demostrar su potencial inhibición dual, el cual impactaría para su aplicabilidad clínica debido a que los tres fármacos (crizotinib, alectinib y ABT-199) ya están aprobados por la FDA.

Contribución de los autores: RZD y FST conceptualizaron el estudio, JFC y RZD realizaron la curación de los datos y el uso de *software* para el estudio y JFC, BMD, SIV, DF, LM y RZD realizaron el análisis formal del estudio. Además, SIV y RZD adquirieron el financiamiento de Concytec-Prociencia, RZD y JFC propusieron el método de la investigación y BMD realizó la gestión y proceso administrativo del proyecto. Asimismo, RZD se encargó de la redacción del borrador original y JFC, RZD y SIV realizaron la supervisión de la investigación. Todos los autores contribuyeron en la investigación y en la redacción, revisión y edición del artículo.

Fuentes de financiamiento: El Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (Concytec) financió esta investigación 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.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Society of Clinical Oncology. Lung Cancer - Non-Small Cell: Statistics [Internet]. Estados Unidos: ASCO; 2023. Disponible en : <https://www.cancer.net/cancer-types/lung-cancer-non-small-cell/statistics>
2. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2023;73(1):17-48.
3. Chevallier M, Borgeaud M, Addeo A, Friedlaender A. Oncogenic driver mutations in non-small cell lung cancer: past, present and future. *World J Clin Oncol* [Internet]. 2021;12(4):217-37.
4. Stella GM, Luisetti M, Pozzi E, Comoglio PM. Oncogenes in non-small-cell lung cancer: Emerging connections and novel therapeutic dynamics. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2013;1(3):251-61.
5. Du X, Shao Y, Qin H-F, Tai Y-H, Gao H-J, Yan-Hong Tai C. ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer(NSCLC) . *Thorac Cancer* [Internet]. 2018;9:423-30.
6. Hallberg B, Palmer RH. The role of the ALK receptor in cancer biology. *Ann Oncol* [Internet]. 2016;27(3):iii4-iii15.
7. Arbour KC, Riely GJ. Diagnosis and treatment of anaplastic lymphoma kinase-positive non-small cell lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2017;31(1):101-11.
8. Liao BC, Lin CC, Shih JY, Yang JCH. Treating patients with ALK-positive non-small cell lung cancer: latest evidence and management strategy. *Ther Adv Med Oncol* [Internet]. 2015;7(5):274-90.
9. 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;11:1-13.
10. Wang YW, Tu PH, Lin KT, Lin SC, Ko JY, Jou YS. Identification of oncogenic point mutations and hyperphosphorylation of anaplastic lymphoma kinase in lung cancer. *Neoplasia* [Internet]. 2011;13(8):704-15.
11. Hafezi S, Rahmani M. Targeting bcl-2 in cancer: Advances, challenges, and perspectives. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021;13(6):1-13.
12. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646-74.
13. Cang S, Iragavarapu C, Savooji J, Song Y, Liu D. ABT-199 (venetoclax) and BCL-2 inhibitors in clinical development. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2015;8(1):1-8.
14. Muenchow A, Weller S, Hinterleitner C, Malenke E, Bugl S, Wirths S, et al. The BCL-2 selective inhibitor ABT-199 sensitizes soft tissue sarcomas to proteasome inhibition by a concerted mechanism requiring BAX and NOXA. *Cell Death Dis* [Internet]. 2020;11(8):701.
15. Instituto Nacional del Cáncer. Terapia de combinación con venetoclax aprobada para LLC - NCI [Internet]. Estados Unidos: NIH; 2019. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/noticias/temas-y-relatos-blog/2019/venetoclax-obinutuzumab-fda-aprobacion-llc-llp>
16. 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.
17. Krieger E, Vriend G. YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations. *Bioinformatics* [Internet]. 2014;30(20):2981-2.
18. Huang F, Greer A, Hurlburt W, Han X, Hafezi R, Wittenberg GM, et al. The mechanisms of differential sensitivity to an insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor (BMS-536924) and rationale for combining with EGFR/HER2 inhibitors. *Cancer Res* [Internet]. 2009;69(1):161-70.
19. UniProt. BCL2 - Apoptosis regulator Bcl-2 - Homo sapiens (Human) [Internet]. Suiza: UniProt; 2017. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A1L4AQQ5/entry>
20. Birkinshaw RW, Gong J nan, Luo CS, Lio D, White CA, Anderson MA, et al. Structures of BCL-2 in complex with venetoclax reveal the molecular basis of resistance mutations. *Nat Commun* [Internet]. 2019;10(1):2385.
21. UniProt. ALK - ALK tyrosine kinase receptor - Homo sapiens (Human) [Internet]. Suiza: UniProt; 2010. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9UM73/entry>

Comportamiento de la proteína antiapoptótica BCL2 en modelos celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas frente a tratamientos con inhibidores ALK y su potencial inhibición dual BCL2-ALK

22. Huang Q, Johnson TW, Bailey S, Brooun A, Bunker KD, Burke BJ, et al. Design of Potent and Selective Inhibitors to Overcome Clinical Anaplastic Lymphoma Kinase Mutations Resistant to Crizotinib. *J Med Chem* [Internet]. 2014;57(4):1170-187.
23. Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S, Kodama T, Kobayashi T, Fukami TA, et al. CH5424802, a Selective ALK Inhibitor Capable of Blocking the Resistant Gatekeeper Mutant. *Cancer Cell* [Internet]. 2011;19(5):679-90.
24. 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):120-24.
25. Elshatlawy M, Sampson J, Clarke K, Bayliss R. EML4-ALK biology and drug resistance in non-small cell lung cancer: a new phase of discoveries. *Mol Oncol* [Internet]. 2023;17(6):950-63.
26. Anagnostou VK, Lowery FJ, Zolota V, Tzelepi V, Gopinath A, Liceaga C, et al. High expression of BCL-2 predicts favorable outcome in non-small cell lung cancer patients with non squamous histology. *BMC Cancer* [Internet]. 2010;10(1):1-11.
27. Zhang J, Wang S, Wang L, Wang R, Chen S, Pan B, et al. Prognostic value of Bcl-2 expression in patients with non-small-cell lung cancer: a meta-analysis and systemic review. *Onco Targets Ther* [Internet]. 2015;8:3361-9.
28. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* [Internet]. 2022;12(1):31-46.
29. Vogler M. Targeting BCL2-Proteins for the Treatment of Solid Tumours. *Adv Med* [Internet]. 2014;2014:1-14.
30. Shi Y, Ye J, Yang Y, Zhao Y, Shen H, Ye X, et al. The Basic Research of the Combinatorial Therapy of ABT-199 and Homoharringtonine on Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol* [Internet]. 2021;11:1-10.

Correspondencia:

Richard Zapata Dongo

Dirección: Calle Nuevo Mundo 204, La Victoria. Chiclayo, Perú.

Teléfono: +51 918366506

Correo electrónico: richard.zapata@udep.edu.pe

Recibido: 30 de octubre de 2023

Evaluado: 12 de enero de 2024

Aprobado: 12 de enero de 2024

© 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

Richard Zapata-Dongo

<https://orcid.org/0009-0006-2003-9481>

Diletta Fontana

<https://orcid.org/0000-0003-1633-6310>

Luca Mogni

<https://orcid.org/0000-0002-6365-5149>

Juan Faya-Castillo

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

Francesca Silva-Torres

<https://orcid.org/0000-0003-0239-8131>

Brenda Moy-Díaz

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

Stefany Infante-Varillas

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