



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ciencias Biológicas

Licenciatura en Biotecnología

“Diseño *in silico* de inhibidores de aminoésteres
esteroidales de la proteína BRAF^{V600E}
relacionada con el cáncer de tiroides”

Tesis para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

Jesús Eduardo Galicia Cortés

Director de tesis:

Dr. Jesús Sandoval Ramírez

Codirector de tesis:

M. en C. Alan Carrasco Carballo

Marzo 2022



Parte del presente trabajo se presentó y desarrollo en los siguientes programas:

Conferencia en Twitter LatinXChem en septiembre del 2021, una serie de exposiciones de posters científicos de diversos rubros relacionados con la química en la red social, donde se presentó el cartel titulado “Diseño *in silico* de aminoésteres esteroidales bisnorlactónicos con potencial inhibitorio contra BRAF (V600E) relacionada con el cáncer de tiroides” de la mano de los investigadores M. en C. Félix Luna, Dr. Jesús Sandoval Ramírez y en M. en C. Alan Carrasco Carballo.

Haciendo ciencia en la BUAP verano 2021, programa realizado por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP, con el proyecto titulado “Estudios *in silico* de esteroides bioactivos” bajo la dirección del Dr. Jesús Sandoval Ramírez.

Estancia Virtual del XXV Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico, en el periodo del **29 de junio al 14 de agosto de 2020**, donde se desarrolló el trabajo llamado “Selección de un hit a partir del análisis de derivados esteroidales en SwissADME”, asesorado por el Dr. Jesús Sandoval Ramírez.

Concurso Nacional de Carteles Estudiantiles, llevado a cabo por la Sociedad Química de México (SQM) en 54° Congreso Mexicano de Química organizado del **30 de septiembre al 03 de octubre del 2019**, con el proyecto titulado “Diseño y síntesis de derivados esteroidales de valina como inhibidores de la 7-deshidrocolesterol reductasa (DHCR7) y la 3 β -hidroxiesteroide- Δ^8 , Δ^7 -isomerasa (EPB)” bajo la tutela de los doctores Reyna Zeferino Díaz, Sara Montiel Smith, Jesús Sandoval Ramírez y del M. en C. Alan Carrasco Carballo.

DEDICATORIA

Este proyecto de tesis se lo quiero dedicar a toda mi familia, especialmente a mis padres que siempre me han apoyado con mis estudios y me han alentado para seguir adelante con mis proyectos y sueños, así como de haberme inculcado una gran educación y valores para intentar ser un miembro destacado en la sociedad.

Agradecimientos

Agradezco al M. en C. Alan Carrasco Carballo por haberme guiado y apoyado en la elaboración de mi tesis, además de que, en su momento, me permitió ingresar al Laboratorio de Elucidación y Síntesis Orgánica (LESQO), donde he tenido un crecimiento académico y personal más grande de lo que esperaba.

Doy las gracias al Dr. Jesús Sandoval Ramírez por ser mi asesor de este proyecto de tesis, y al mismo tiempo, para haber sido mi director de algunos trabajos relacionados con mi tema de tesis expuestos en estancias, congresos y carteles previamente mencionados.

Agradezco a los revisores de esta tesis, la Dra. Maricruz Anaya Ruíz y el Dr. Joel Luis Terán Vázquez, y a toda la comisión revisora por aceptar la verificación de este trabajo.

Me gustaría agradecer a todo el personal del laboratorio LESQO por todo su apoyo y asesoramiento para desarrollar este proyecto mediante los cursos, clases, pláticas con investigadores, conferencias, estancias de servicio social, material de apoyo, entre otros.

Por último, agradezco a la institución donde completé mis estudios de licenciatura, la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, en donde recibí una muy buena formación como biotecnólogo y también, a mi consideración, me ayudó en el camino a mejorar como persona y convertirme en un miembro funcional de la sociedad científica.

Índice

Símbolos y abreviaturas	9
Índice de Gráficos.....	11
Índice de figuras	12
Índice de tablas	14
RESUMEN	15
1 ANTECEDENTES	17
1.1 Características del cáncer.	17
1.2 Cáncer de tiroides.	18
1.3 Tipos del cáncer de tiroides.	18
1.3.1 Cáncer de tiroides papilar (PTC).	19
1.3.2 Cáncer tiroides folicular (FTC).	21
1.3.3 Cáncer de tiroides poco diferenciado (PDTC)	22
1.3.4 Cáncer de tiroides anaplásico (ATC).	23
1.3.5 Cáncer de tiroides medular (MTC)	23
1.4 Estadísticas del incremento del cáncer de tiroides en el mundo.	25
1.5 Factores genéticos causantes de la enfermedad.	27
1.5.1 Principales proteínas y oncogenes en el cáncer de tiroides.	27
1.5.2 Cambios en las vías metabólicas llevadas a cabo por la glándula tiroides. 30	
1.5.3 Efecto en el metabolismo hormonal.	32
1.6 Factores epigenéticos causantes de la enfermedad.	32
1.6.1 Incidencia del yodo en el desarrollo de la enfermedad	32
1.6.2 Efecto de la quimio y radioterapia.	34
1.6.3 Relación entre factores genéticos y ambientales con la incidencia de cáncer de tiroides	34
1.7 Proteína mutada BRAF^{V600E}	37
1.7.1 Familia de proteínas Raf	37
1.7.2 Función y participación de la proteína Braf en el metabolismo.	38
1.7.3 Mutación BRAF^{V600E}.	39
1.7.4 Efecto de BRAF^{V600E} en el metabolismo.	40
1.7.5 BRAF^{V600E} como marcador molecular	42

1.8	Diagnóstico y tratamientos empleados contra el cáncer de tiroides.....	42
1.8.1	Diagnóstico	42
1.8.2	Tratamiento sitio-dirigidos contra las proteínas cinasas.	44
1.8.3	Fármacos inhibidores de las tirosinas cinasas.	45
1.8.4	Fármacos desarrollados para inhibir la proteína BRAF ^{V600E}	46
1.9	Tratamiento con esteroides para el cáncer.....	49
1.9.1	Sapogeninas esteroidales.....	49
1.9.2	Derivados y bioconjugados esteroidales.....	49
1.10	Familias esteroideas.	51
1.10.1	Furostanos	52
1.10.2	Piranos	52
1.10.3	Espirostanos	53
1.10.4	Colestanos.....	54
1.10.5	Bisnorlactonas	54
1.10.6	Bioconjugados	55
1.11	Usos y aplicaciones del acoplamiento molecular.	56
1.11.1	Estudios de docking molecular involucrados con el cáncer y patologías relacionados con la glándula tiroides.....	57
1.11.2	Estudios de docking molecular con la proteína BRAF ^{V600E}	58
1.11.3	Estudios de docking molecular con esteroides con la proteína BRAF ^{V600E} . 59	59
2	OBJETIVOS	60
2.1	Objetivo general.....	60
2.2	Objetivos particulares	60
3	METODOLOGÍA.....	61
4	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	62
4.1	Resultados de energía de acoplamiento.	62
4.1.1	Familia colestánica	63
4.1.2	Familia espirostánica.....	64
4.1.3	Familia furostánica	65
4.1.4	Familia piránica.....	66

4.1.5	Familia bisnorlactónica	67
4.2	Análisis estadístico.	68
4.2.1	Prueba de normalidad.	68
4.2.2	Energía de afinidad vs Familia	70
4.2.3	Energía de afinidad vs Tipo de aminoácido	73
4.2.4	Energía de afinidad vs Aminoácido	75
4.3	Curvas ROC	78
4.3.1	Familia colestánica	79
4.3.2	Familia espirostánica	79
4.3.3	Familia furostánica	80
4.3.4	Familia piránica	81
4.3.5	Familia bisnorlactónica	81
4.4	Resultados de interacciones.	83
4.4.1	Fármacos	83
a)	Vemurafenib.....	83
b)	Sorafenib	83
c)	Dabrafenib.....	85
d)	Oxima	85
e)	XL281.....	86
4.4.2	Familia espírostánica	90
a)	Espirostano de histidina (E-His)	90
b)	Espirostano de prolina (E-Pro).....	90
c)	Espirostano de tirosina (E-Tyr).....	92
d)	Espirostano de triptófano (E-Trp)	92
4.4.3	Familia furostánica	95
a)	Furostano (Fur).....	95
b)	Furostano de tirosina (F-Tyr)	95
c)	Furostano de triptófano (F-Trp)	96
4.4.4	Familia piránica	99
a)	Pirano de fenilalanina.....	99
4.4.5	Familia bisnorlactónica	100

a)	Bisnorlactona de fenilalanina (B-Phe)	100
b)	Bisnorlactona de tirosina (B-Tyr)	101
c)	Bisnorlactona de triptófano (B-Trp).....	102
4.5	Estudio ADME.	105
4.5.1	Radares de biodisponibilidad	105
4.5.2	Propiedades fisicoquímicas	110
4.5.3	Lipofilicidad e hidrosolubilidad	111
4.5.4	Farmacocinética	113
4.5.5	“Druglikeness”	115
4.5.6	Boiledegg	118
5	CONCLUSIONES	120
6	Anexos	122
	Anexo 1: Energía de afinidad de los compuestos en CB-Dock	122
7	BIBLIOGRAFÍA	123

Símbolos y abreviaturas

- **Abreviaturas**

ADMET – Absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad

ALK – Linfoma quinasa anaplásico –

BPA – Bisfenol A

cAMP – AMP cíclico

CPTC – PTC convencional

CTNNB1 – β -catenina

DAPK – Proteína quinasa asociada a la muerte

EGFR – Factor de crecimiento epidérmico

FNA – Aspiración por aguja fina

FTA – Adenoma tiroideo folicular

FTC – Cáncer de tiroides folicular

Glut1 – Transportador de glucosa tipo 1

HCTC – Cáncer de tiroides de células de Hürthle

HIA – Absorción gastrointestinal humana pasiva

IDH1 – Isocitrato deshidrogenasa 1

MAPK – Proteína quinasa activada por mitógenos

MAPK – Vía MAP cinasa

MTC – Cáncer de tiroides medular

NDUFA13 – 1α subcomplejo 13

NIS – Cotransportador de yoduro de sodio

PAX8 – Gen caja emparejada 8

ATC – Cáncer de tiroides anaplásico

AUC – Área bajo la curva

BBB – Barrera hematoencefálica

PCB – Bifenilos policlorados

PDGF – Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDPK1 – Proteína quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositido

PDTC – Cáncer de tiroides poco diferenciado

PHAH – Hidrocarburos aromáticos polihalogenados

PPARG – Receptor activado por proliferador de peroxisomas- γ

PTC – Cáncer de tiroides papilar

PTC-FV – PTC con variante folicular

RAI – Enfermedad refractaria al yodo radiactivo

RARB2 – Receptor de ácido retinoico b2

RET/PTC – Formas quiméricas del receptor en PTC

ROS – Especies reactivas de oxígeno

RR-PTC – Cáncer de tiroides papilar refractario al yodo radiactivo

RTK – Receptor transmembranal de tirosina quinasa

SAACs – Conjugados de aminoácidos esteroides

SAR – Relaciones estructura-actividad

TCPTC – PTC de células elevadas

TG – Tiroglobulina

TG-I – TG yodados

TIMP3 – Metaloproteinasa de matriz-3

TKI – Inhibidores de la tirosina cinasa

TPO – Peroxidasa tiroidea

TSH – Hormona estimulante del tiroides

TSHR – Receptor de la hormona estimulante de la tiroides

VEGFR – Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Incidencia del cáncer de tiroides en Estados Unidos en los últimos años. Gráfica adaptado [28].	26
Gráfico 2. Número de casos en el 2018 de tipos de cáncer en mujeres de todas las edades en México [43].	35
Gráfico 3. Diagrama energético de la familia colestánica.	64
Gráfico 4. Diagrama energético de la familia espirostánica.	65
Gráfico 5. Diagrama energético de la familia furostánica.	66
Gráfico 6. Diagrama energético de la familia piránica.	67
Gráfico 7. Diagrama energético de la familia bisnorlactónica.	68
Gráfico 8. Prueba de normalidad de Anderson-Darling de los valores de energía de afinidad de las 105 moléculas evaluadas.	69
Gráfico 9. Gráfica de ICs simultáneos de 95% de Tukey de energía de afinidad (kcal/mol) vs familia.	72
Gráfico 10. Gráfica de intervalos de energía de afinidad (kcal/mol) vs familia.	72
Gráfico 11. Gráfica de ICs simultáneos de 95% de Tukey de energía de afinidad (kcal/mol) vs tipo de aminoácido.	75
Gráfico 12. Gráfica de intervalos de energía de afinidad (kcal/mol) vs tipo de aminoácido.	75
Gráfico 13. Gráfica de intervalos de energía de afinidad (kcal/mol) vs aminoácido.	78
Gráfico 14. Curva ROC de la familia colestánica. Solo logra verse la curva del vemurafenib porque todas están superpuestas.	80
Gráfico 15. Curva ROC de la familia espirostánica.	80
Gráfico 16. Curva ROC de la familia furostánica.	81
Gráfico 17. Curva ROC de la familia piránica.	82
Gráfico 18. Curva ROC de la familia bisnorlactónica.	82
Gráfico 19. Diagrama Boiled Egg de los aminoésteres esteroidales seleccionados.	118
Gráfico 20. Diagrama Boiled Egg de los fármacos de referencia.	119

Índice de figuras

Figura 1. Proceso celular del desarrollo del cáncer. [5]	17
Figura 2. Diagrama del proceso de diferenciación de una célula folicular de la glándula tiroidea hasta convertirse en una célula cancerígena. Figura modificada [9]	18
Figura 3. Secciones teñidas con hematoxilina y eosina que ilustran las diferentes histologías del cáncer de tiroides derivado de células foliculares. [11].....	19
Figura 4. Mutaciones activantes mutuamente excluyentes en BRAF, RAS y RTK presentes en carcinomas papilares de tiroides. Figura modificada [19].....	21
Figura 5. Representación esquemática de los histotipos del cáncer de tiroides y sus eventos genéticos causales. [22].....	22
Figura 6. Sintomatología del cáncer de tiroides anaplásico.	23
Figura 7. Metabolismo mediado por la glándula tiroide. [38].....	31
Figura 8. Esquema de cáncer de tiroides diferenciado estándar de pacientes refractarios a la RAI, Figura adaptada [8].....	33
Figura 9. Tasas de incidencia mundial estandarizadas por edad estimadas de cáncer de tiroides en 2018. [44].....	35
Figura 10. La vía de señalización de MAPK. Imagen adaptada. [20].	38
Figura 11. Mutación BRAF ^{V600E} . Figura adaptada [52].....	39
Figura 12. Maquinaria de manejo de yoduro en la célula tiroidea y su silenciamiento por BRAF ^{V600E} . Imagen adaptada [10].	41
Figura 13. Ejemplo de una ecografía de tiroiditis crónica [54]..	43
Figura 14. Metodología llevada a cabo en un análisis molecular para una evaluación diagnóstica positiva, indeterminada y negativa para tratar pacientes con nódulos tiroideos. Figura modificada [53].	44
Figura 15. Fármacos dirigidos en múltiples proteínas de las vías MAPK y PI3K-AKT. Imagen adaptada [56].	45
Figura 16. Estructuras químicas de fármacos inhibitorios contra BRAF ^{V600E}	47
Figura 17. Estructuras químicas de fármacos inhibitorios	48
Figura 18. Ejemplos de alcaloides esteroideos con actividad anticancerígena.	49
Figura 19. Ejemplos de derivados esteroideos anticancerígenos [72].....	51
Figura 20. Esqueletos de aglicona representativos de saponinas esteroideas. Imagen adaptada. [68].	52
Figura 21. Ejemplos de furostanos.	52
Figura 22. Derivado de pirano sustituido: un inhibidor de la quinasa Chk-1 humana [78].	53
Figura 23. Estructuras de espirostanos.	53
Figura 24. Ejemplos de colestanos.	55
Figura 25. Potenciales aplicaciones de los bioconjugados esteroideos. Figura modificada [72]	56
Figura 26. Resumen de un enfoque clásico de SBDD. Imagen adaptada. [88]–[90].	57

Figura 27. Alineación de los compuestos a, b y c respectivamente, en el sitio activo de BRAF ^{V600E} en un estudio de docking molecular [93].	58
Figura 28. Síntesis de los compuestos pirazólicos probados en BRAF ^{V600E} [49].	59
Figura 29. Diagrama de las moléculas diseñadas para el estudio in silico.	63
Figura 30. Diagrama de interacción de residuos del vemurafenib (I-Vem).	84
Figura 31. Diagrama de interacción de residuos del sorafenib (I-Sor).	84
Figura 32. Diagrama de interacción de residuos del drabafenib (I-Dra).	85
Figura 33. Diagrama de interacción de residuos de la oxima (I-Oxi).	86
Figura 34. Diagrama de interacción de residuos del XL281 (I-XL2).	87
Figura 35. Diagrama de interacción de residuos del espiroetano de histidina (E-His).	91
Figura 36. Diagrama de interacción de residuos del espiroetano de prolina (E-Pro).	91
Figura 37. Diagrama de interacción de residuos del espiroetano de tirosina (E-Tyr).	92
Figura 38. Diagrama de interacción de residuos del espiroetano de triptófano (E-Trp).	93
Figura 39. Diagrama de interacción de residuos del furoetano (Fur).	95
Figura 40. Diagrama de interacción de residuos del furoetano de tirosina (F-Tyr).	96
Figura 41. Diagrama de interacción de residuos del furoetano de triptófano (F-Trp).	97
Figura 42. Diagrama de interacción de residuos del pirano de fenilalanina (P-Phe).	100
Figura 43. Diagrama de interacción de residuos de la bisnorlactona de fenilalanina (B-Phe).	101
Figura 44. Diagrama de interacción de residuos de la bisnorlactona de tirosina (B-Tyr).	102
Figura 45. Diagrama de interacción de residuos de la bisnorlactona de triptófano (B-Trp).	103
Figura 46. Radar de biodisponibilidad del I-Vem.	105
Figura 47. Radar de biodisponibilidad del I-Sor.	106
Figura 48. Radar de biodisponibilidad del I-Dra.	106
Figura 49. Radar de biodisponibilidad del I-Oxi.	106
Figura 50. Radar de biodisponibilidad del I-XL2.	106
Figura 51. Radar de biodisponibilidad del E-His.	107
Figura 52. Radar de biodisponibilidad del E-Pro.	107
Figura 53. Radar de biodisponibilidad del E-Tyr.	107
Figura 54. Radar de biodisponibilidad del E-Trp.	108
Figura 55. Radar de biodisponibilidad del Fur.	108
Figura 56. Radar de biodisponibilidad del F-Tyr.	108
Figura 57. Radar de biodisponibilidad del F-Trp.	108
Figura 58. Radar de biodisponibilidad del P-Phe.	109
Figura 59. Radar de biodisponibilidad del B-Phe.	109
Figura 60. Radar de biodisponibilidad del B-Tyr.	109
Figura 61. Radar de biodisponibilidad del B-Trp.	109

Índice de tablas

Tabla 1. Características generales de los tipos de cáncer de tiroides.	24
Tabla 2. Mutaciones genéticas presentes en los tumores tiroideos	29
Tabla 3. Análisis de varianza por familias	70
Tabla 4. Medias por familia.....	70
Tabla 5. Prueba simultánea de Tukey por familias	71
Tabla 6. Análisis de varianza por tipo de aminoácido.....	73
Tabla 7. Medias por tipo de aminoácido.	73
Tabla 8. Prueba simultánea de Tukey por el tipo de aminoácido.....	74
Tabla 9. Análisis de varianzas por aminoácido	76
Tabla 10. Análisis de medias por aminoácido.	76
Tabla 11. Análisis de medias por aminoácido.	77
Tabla 12. Interacciones de los fármacos de referencia con BRAF ^{V600E}	87
Tabla 13. Interacciones de los aminoésteres espirostánicos con BRAF ^{V600E}	93
Tabla 14. Interacciones de los aminoésteres furostánicos con BRAF ^{V600E}	97
Tabla 15. Interacciones de los aminoésteres piránicos con BRAF ^{V600E}	99
Tabla 16. Interacciones de los aminoésteres bisnorlactónicos con BRAF ^{V600E}	103
Tabla 17. Radares de biodisponibilidad	105
Tabla 18. Propiedades fisicoquímicas.	110
Tabla 19. Lipofilicidad y solubilidad en agua	112
Tabla 20. Farmacocinética de los mejores compuestos.....	114
Tabla 21. Reglas empíricas de druglikeness.....	116
Tabla 22. Energía de afinidad de los aminoésteres esteroidales en CB-Dock.	122

RESUMEN

El oncogén BRAF^{V600E} es la segunda mutación más común en el cáncer y es el evento molecular más prevalente en el de tiroides, el cual es el cáncer endocrino más predominante, y su incidencia ha aumentado continuamente en las últimas tres décadas en todo el mundo. Los principales fármacos en el mercado que actúan como inhibidores de la proteína BRAF^{V600E} presentan diversos efectos secundarios durante el tratamiento del cáncer de tiroides. Por este motivo, en este trabajo se evaluó el efecto *in silico* de compuestos de aminoésteres esteroidales de 5 diferentes familias esteroidales (bisorlactónica, colestánica, espiroestánica, furostánica y piránica) para comprobar un posible efecto inhibitorio contra BRAF^{V600E}. Se realizó un estudio de docking molecular con 105 moléculas, además de 5 antagonistas de referencia, con la proteína diana, seguido de una serie de análisis estadísticos, energéticos, interaccionales y farmacocinéticos (ADME). Los resultados demostraron, en cuanto a la afinidad de los compuestos con BRAF^{V600E}, que en la mayoría de las familias los aminoésteres de fenilalanina, tirosina y triptófano reportaron energías de afinidad más elevadas, respaldadas por la prueba ANOVA de una vía que reafirmó esta tendencia con el análisis de medias, siendo la familia espiroestánica la mejor en cuanto a sus valores energéticos y la molécula más sobresaliente la *B-Trp* con -10.9 kcal/mol; por otro lado, las curvas ROC comprobaron que los datos de AUC más destacados le pertenecieron al *I-XL2*. A su vez, con el estudio interaccional se observó que los principales residuos correspondieron a VAL A:471, LEU A:514, ILE A:463, ALA A:481, PHE A:583, entre otros. Por último, el análisis ADME exhibió que los mejores aminoésteres esteroidales analizados son más liposolubles, la mitad de ellos tienen una absorción gastrointestinal alta, su peso molecular supera los 500 g/mol y la mayoría no son inhibidores de las isoenzimas de la familia citocromo P450.

ABSTRACT

The BRAF^{V600E} oncogene is the second most common mutation in cancer and is the greatest molecular event in thyroid cancer, which is the most predominant endocrine cancer, and its incidence has increased continuously in the last three decades around the world. The main drugs on the market that act as inhibitors of the BRAF^{V600E} protein have various side effects during the treatment of thyroid cancer. For this reason, in this work the *in silico* effect of steroidal aminoester compounds from 5 different steroidal families (bisnorlactonic, cholestatic, spirostannic, furostannic and pyranic) was evaluated to verify a possible inhibitory effect against BRAF^{V600E}. A molecular docking study was performed with 105 molecules, in addition to 5 reference antagonists, with the target protein, followed by a series of statistical, energetic, interactional and pharmacokinetic (ADME) analyses. The results showed, regarding the affinity of the compounds with BRAF^{V600E}, that in almost all the families the amino esters of phenylalanine, tyrosine and tryptophan reported higher affinity energies, supported by the one-way ANOVA test that reaffirmed this tendency with the analysis of means, with the spirostannic family being the best in terms of its energy values and the most outstanding molecule being *B-Trp* with -10.9 kcal/mol; furthermore, the ROC curves confirmed that the most notable AUC data belonged to *I-XL2*. By the other hand, with the interactional study it was observed that the main residues corresponded to *VAL A:471*, *LEU A:514*, *ILE A:463*, *ALA A:481*, *PHE A:583*, among others. Finally, the ADME analysis exhibited that the best steroidal aminoesters analyzed are more lipid soluble, half of them have a high gastrointestinal absorption, their molecular weight exceeds 500 g/mol and most are not inhibitors of the isoenzymes of the cytochrome P450 family.

1 ANTECEDENTES

1.1 Características del cáncer.

El cáncer es la segunda enfermedad grave más extendida en todo el mundo [1]. Clínicamente, se define como un gran número de enfermedades complejas, comportándose de formas distintas acorde a los tipos de células que lo originan. A nivel molecular, el cáncer se caracteriza por el crecimiento y división descontrolado de células anormales; pueden aparecer y propagarse prácticamente en cualquier lugar del cuerpo formándose un tumor [2], [3] (Figura 1). El cáncer es una enfermedad compleja que implica numerosos cambios temporo-espaciales en la fisiología celular, en una revisión de Hanahan y Weinberg sugirieron que seis alteraciones esenciales en la fisiología celular podrían ser la base del crecimiento de células malignas, dichas alteraciones ocurren en las células cancerosas independientemente del tipo de tejido de origen y se describieron como el sello distintivo de casi todos los cánceres. Inclúan: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento, evasión de la muerte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida y capacidad para invadir tejidos y hacer metástasis [4] [2].

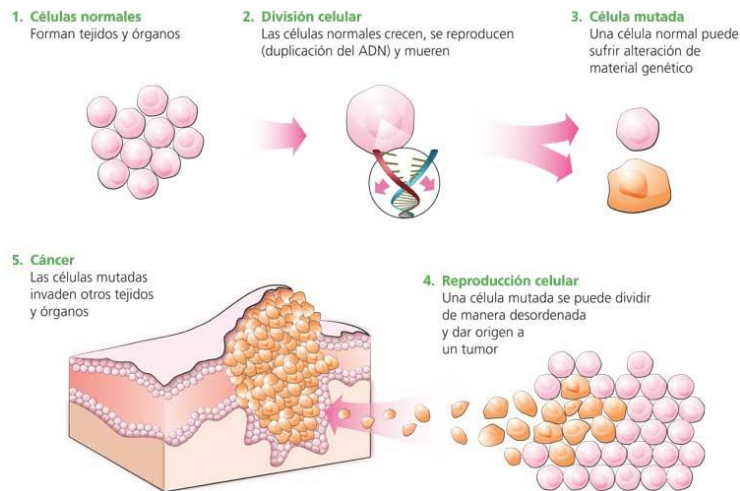


Figura 1. Proceso celular del desarrollo del cáncer. [5]

La masa tumoral es, sin duda, un proceso multifacético, donde diferentes tipos de células, incluyendo células neoplásicas, fibroblastos, endoteliales y células inmunocompetentes, se comunican entre sí mediante contacto directo o producción de citocinas y quimiocinas y actúan de manera autocrina y paracrina para controlar y dar forma al crecimiento tumoral. Es la expresión de varios mediadores y moduladores inmunes, así como la abundancia y el estado de activación de diferentes tipos de células en el microambiente tumoral, lo que determina en qué dirección se inclina el equilibrio y si la inflamación promueve el

crecimiento tumoral o la inmunidad antitumoral se producirá [4]. En los últimos años, el tratamiento del cáncer ha sido una importante empresa de investigación y desarrollo. Por lo que, la búsqueda de fármacos anticancerosos potentes y selectivos es necesaria debido a la limitación de los fármacos antineoplásicos disponibles [1].

1.2 Cáncer de tiroides.

El cáncer de tiroides es la neoplasia endocrina maligna más común y su incidencia ha experimentado un rápido aumento global en las últimas décadas, siendo la quinta neoplasia más frecuente de mujeres [6]. En los Estados Unidos de América, este aumento de incidencia es actualmente el más rápido entre todos los cánceres, con una incidencia estimada de 37.200 casos y una prevalencia de > 360.000 casos para el año de 2009. [4], [7].

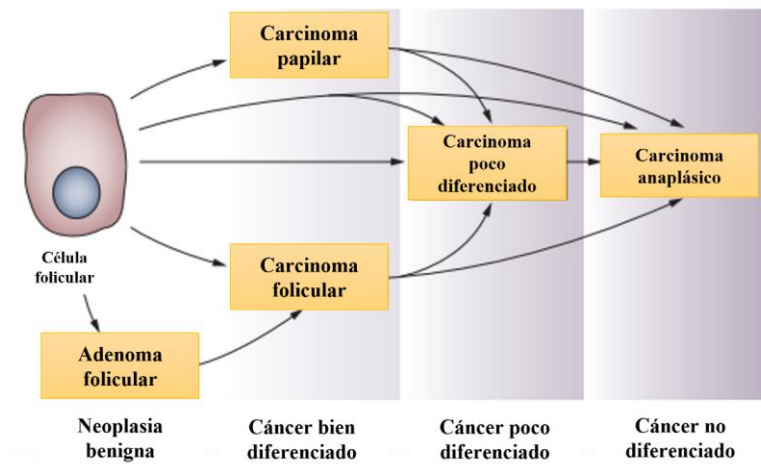


Figura 2. Diagrama del proceso de diferenciación de una célula folicular de la glándula tiroides hasta convertirse en una célula cancerígena. Figura modificada [9].

Los cánceres de tiroides exhiben una amplia gama de comportamientos clínicos, desde tumores indolentes con baja mortalidad en la mayoría de los casos, hasta neoplasias malignas muy agresivas, por ejemplo, cáncer de tiroides anaplásico. Por lo tanto, realizar un estudio diagnóstico adecuado antes de iniciar el tratamiento es fundamental para adaptar el tratamiento de forma adecuada [8]. En la Figura 2 se muestra un diagrama del proceso de diferencia del cáncer de tiroides en sus diversos subtipos [9].

1.3 Tipos del cáncer de tiroides.

Existen varios tipos y subtipos histológicos de cáncer de tiroides con diferentes orígenes celulares, características y pronósticos. Hay dos tipos de células tiroideas endocrinas, células tiroideas foliculares y células C parafoliculares, de las que se derivan los cánceres de tiroides.

Los tumores derivados de células tiroideas foliculares, incluidos el cáncer de tiroides papilar (PTC), el cáncer de tiroides folicular (FTC), el cáncer de tiroides poco diferenciado (PDTC) y el cáncer de tiroides anaplásico (ATC), representan la mayoría de los tumores malignos de tiroides [10]. Los tumores diferenciados (papilares o foliculares) son muy tratables y habitualmente curables. Los tumores indiferenciados (poco diferenciados y anaplásicos) son mucho menos frecuentes, agresivos, hacen metástasis precozmente y tienen un pronóstico mucho más precario [4]. Las características histológicas de los 4 principales subtipos de cáncer están en la Figura 3, en el siguiente orden: (a) Cáncer papilar de tiroides; (b) cáncer de tiroides folicular; (c) cáncer de tiroides poco diferenciado; (d) cáncer de tiroides anaplásico. [11]

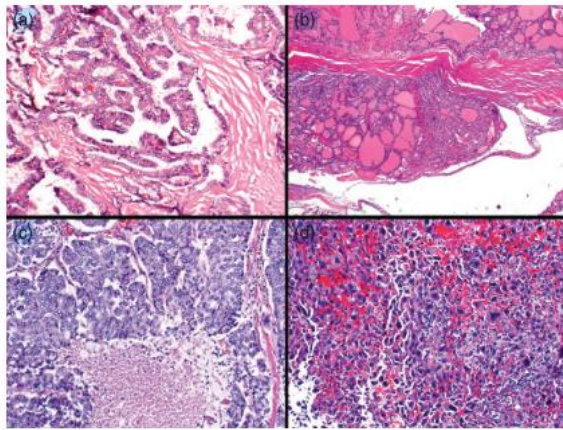


Figura 3. Secciones teñidas con hematoxilina y eosina que ilustran las diferentes histologías del cáncer de tiroides derivado de células foliculares. [11]

El cáncer de tiroides diferenciado es el cáncer de tiroides más común, representa más del 95% de los casos y se origina en las células epiteliales foliculares tiroideas. El cáncer papilar de tiroides es el subtipo más común y tiene el mejor pronóstico general. Las metástasis afectan con mayor frecuencia a los ganglios linfáticos cervicales y, con menor frecuencia, a los pulmones. El cáncer de tiroides folicular, el cáncer de tiroides de células de Hürthle y los cánceres de tiroides poco diferenciados son cánceres de alto riesgo que tienen tendencia a metastatizar hematógicamente a sitios distantes, en particular, a pulmón y huesos [8], [12], [13]

1.3.1 Cáncer de tiroides papilar (PTC).

El PTC representa del 80 al 90% de todos los cánceres de tiroides [12], siendo el tipo más frecuente de carcinoma de tiroides humano [14], su incidencia casi se ha duplicado en los últimos 30 años y se cree que se debe en parte a un diagnóstico más temprano [12] [15] [4]. Sin embargo, una pequeña parte de pacientes con PTC desarrolla cáncer recurrente y/o

metastásico, finalmente sucumbiendo a la enfermedad [16]. La tasa de cáncer de tiroides papilar entre las mujeres es casi tres veces mayor que la de los hombres, la tasa de incidencia específica por edad aumenta drásticamente al comienzo de los años reproductivos, con un pico de edad en aumento entre los 40 y 49 años, mientras que en los hombres el pico es entre los 60 y 69 años [12]. La mayoría de los pacientes tienen un pronóstico relativamente bueno, ya que la enfermedad puede manipularse con cirugía, tratamiento con yodo radiactivo (I^{131}) y supresión de la hormona estimulante del tiroides (TSH). Sin embargo, la tasa de supervivencia a 10 años de los pacientes con la enfermedad refractaria al yodo radiactivo localmente avanzada o metastásica, es decir que puede llegar a desarrollarse a lo largo de la enfermedad en histotipos bien diferenciados o aparecer en las primeras fases en los subtipos poco y/o no diferenciados, desciende a menos del 10%, lo que constituye la principal causa de muerte específica por cáncer de tiroides [15].

Cuatro lesiones genéticas, que son mutuamente excluyentes, están asociadas con PTC, incluyen aberraciones cromosómicas dirigidas a los receptores de tirosina quinasa RET o TRKA y mutaciones puntuales en genes RAS o BRAF. Estos genes codifican activadores de la cascada de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Los oncogenes RET / PTC se detectan con alta frecuencia en PTC pequeñas clínicamente silenciosas, lo que confirma que pueden ser eventos tempranos en la tumorigénesis tiroidea. Por otro lado, las mutaciones puntuales activantes en las pequeñas GTPasas de RAS se encuentran aproximadamente en el 10% de las PTC, principalmente en las que pertenecen a la variante folicular (PTC-FV), mientras que las mutaciones puntuales en BRAF son las lesiones genéticas más comunes encontradas en PTC. [4], [10], [17], [18]. En la Figura 4 se muestra las 3 fallas genéticas más comunes en los genes BRAF^{V600E}, RTK y RAS. RTK mutantes, RAS y BRAF activan la señalización de MAPK, pero lo hacen en diferentes grados. La salida de señalización impulsada por BRAF V600E es la más alta, porque esta oncoproteína emite señales como monómero y no responde a los efectos de retroalimentación negativa de ERK activada en la entrada río arriba de la vía. Por el contrario, el flujo de señalización de MAPK que se evoca por fusión de proteínas RTK o por RAS mutado es amortiguado por retroalimentación negativa. La expresión de genes necesarios para la captación y el metabolismo de yoduro, que son características del estado diferenciado de las células foliculares tiroideas, es inhibida por la señalización de MAPK. Esto es consecuente, porque la capacidad de respuesta a la terapia con yodo radiactivo requiere la conservación de la función diferenciada de tiroides. [19].

El PTC es una neoplasia endócrina común que con frecuencia alberga la mutación oncogénica T1799A BRAF. En PTC, la mutación *BRAF* está estrechamente asociada con la extensión extratiroidea, metástasis en los ganglios linfáticos, estadios tumorales avanzados, recurrencia de la enfermedad e incluso la mortalidad del paciente [7], [14]. La prevalencia de mutaciones BRAF dentro de PTC tiene un patrón específico de subtipo, de modo que las mutaciones BRAF son más comunes en PTC de células altas, un poco menos comunes en PTC convencional y rara vez se encuentran en PTC de variante folicular. [20]. [21].

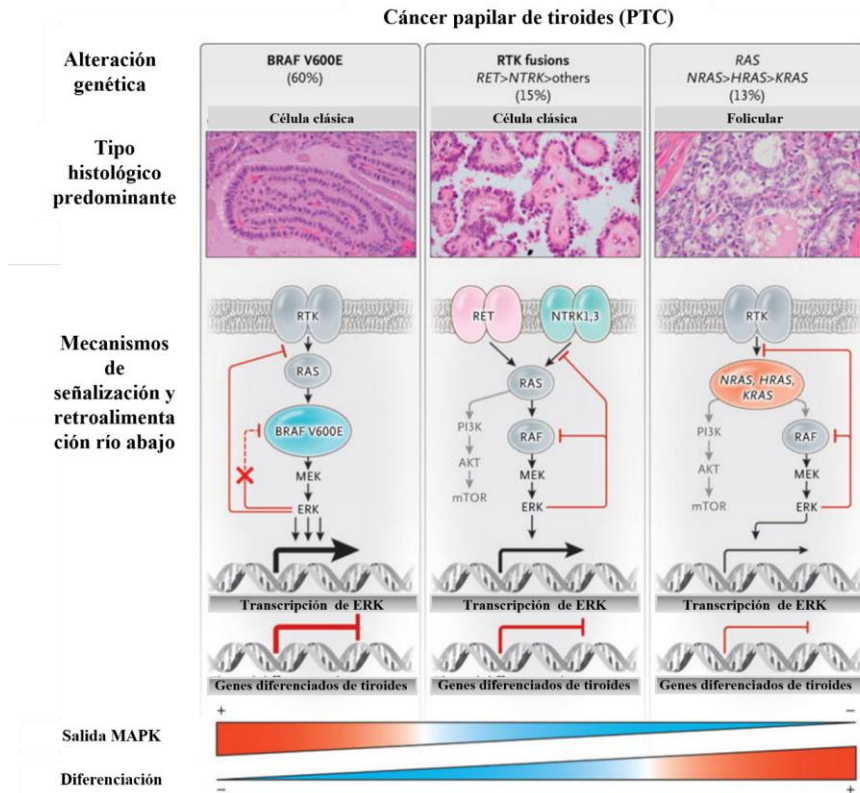


Figura 4. Mutaciones activantes mutuamente excluyentes en BRAF, RAS y RTK presentes en carcinomas papilares de tiroides. Figura modificada [19].

1.3.2 Cáncer tiroides folicular (FTC)

El cáncer folicular de tiroides (FTC) representa el 10-15% de los cánceres de tiroides y su incidencia aumenta en áreas de deficiencia de yodo en la dieta, este se presenta como nódulos únicos que pueden estar bien circunscritos (mínimamente invasivos) o muy infiltrantes (con infiltración de tejido tiroideo y vasos sanguíneos adyacentes).

En este carcinoma la presencia de mutaciones RAS es bastante común. Además, se ha demostrado que una proporción bastante alta de FTC lleva el reordenamiento PAX8 / PPAR γ . La proteína de fusión resultante tiene una actividad negativa dominante sobre PPAR γ de tipo salvaje (Figura 5) [4]. Los cambios genéticos que se encuentran con mayor frecuencia en FTC son mutaciones puntuales de RAS (aproximadamente el 45% de los casos) y reordenamientos de PAX8 / PPAR γ (aproximadamente el 35% de los casos) [14]. Además,

deleciones del gen supresor de tumores *PTEN* son las alteraciones genéticas clásicas que activan la vía PI3K-AKT presentes en el FTC [4], [10], [17], [18].

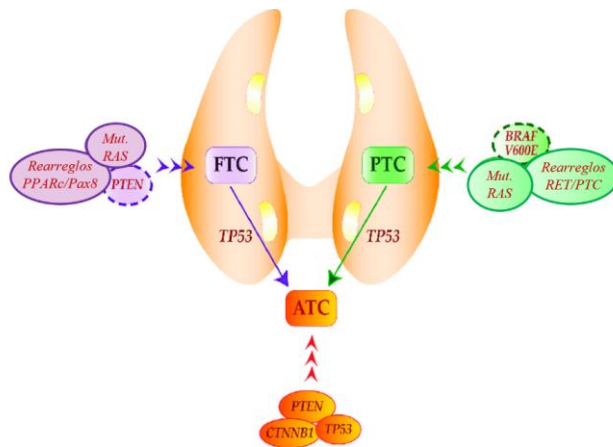


Figura 5. Representación esquemática de los histotipos del cáncer de tiroides y sus eventos genéticos causales. [22].

1.3.3 Cáncer de tiroides poco diferenciado (PDTC)

El tipo de cáncer poco diferenciados (PDTC), a menudo superpuesto con PTC y FTC; posee una agresividad intermedia entre los cánceres de tiroides diferenciados e indiferenciados [10]. Los PDTC, al igual que el ATC, se creen que se derivan de tumores diferenciados preexistentes, no acumulan yodo radiactivo y responden mal al tratamiento médico y quirúrgico [23]. En el mismo sentido, PDTC y ATC pueden derivar de tipos de cáncer de tiroides bien diferenciados (WDTC) preexistentes.

Hablando sobre los eventos genéticos que pueden desencadenarlo, las mutaciones puntuales de RAS y la mutación $BRAF^{V600E}$ son frecuentes en este subtipo. [23], [24]. También, las mutaciones de PIK3CA, que codifica la subunidad catalítica p110 α de PI3K, presente en la activación la vía PI3K-AKT es bastante común en PDTC, además de otros genes importantes que están mutados en la tumorigénesis tiroidea incluyen CTNNB1, TP53, IDH1, linfoma quinasa anaplásico (ALK) y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), donde la ocurrencia preferencial de estas mutaciones en PDTC y ATC, que son los cánceres de tiroides más agresivos, sugiere que pueden tener un papel en la progresión y agresividad del cáncer de tiroides [10]. Los PDTC varían en su comportamiento biológico en función de si están encapsulados o no. Los PDTC encapsulados son comparativamente indolentes y, a menudo, se asocian con mutaciones de NRAS. Por el contrario, el PDTC no encapsulado sigue un curso más agresivo y se asocia con mayor frecuencia a mutaciones BRAF [11].

1.3.4 Cáncer de tiroides anaplásico (ATC)

El carcinoma anaplásico de tiroides (ATC), junto con el PDTC, representan el 2-5% de las neoplasias malignas de tiroides; este carcinoma es muy maligno y marcadamente invasivo y está compuesto por células indiferenciadas que retienen marcadores de linaje epitelial [4], tiene una incidencia entre 1 y 2 % [25] que generalmente se presenta como una masa en el cuello de rápido crecimiento. Aun así, es una de las principales causas de muerte en pacientes con cáncer de tiroides debido a su comportamiento agresivo y resistencia al tratamiento [25].

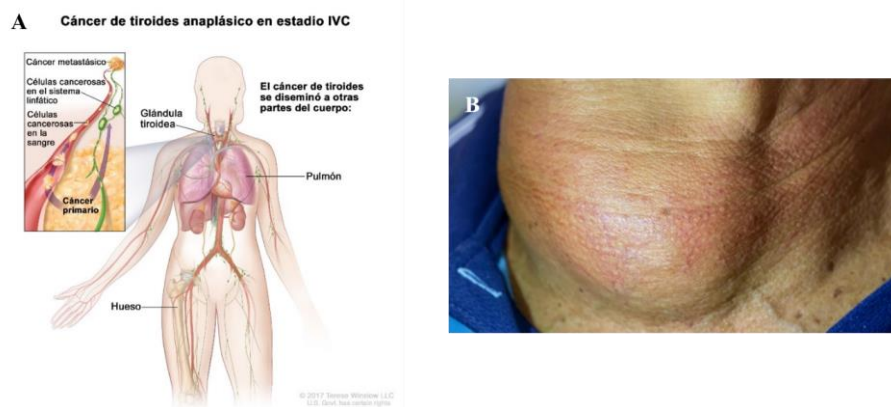


Figura 6. Sintomatología del cáncer de tiroides anaplásico.

Los pacientes a menudo desarrollan ronquera, disfagia y disnea. El sitio más común de enfermedad metastásica a distancia son los pulmones, seguidos de los huesos y el cerebro. El cáncer de tiroides anaplásico a menudo surge y puede coexistir con el cáncer de tiroides diferenciado, pero también puede ocurrir de *novo*. La patología clínica del ATC se caracteriza por un rápido crecimiento celular y la capacidad de hacer metástasis en otros órganos del cuerpo, especialmente pulmones, huesos y cerebro. Se recomienda la derivación a un centro con experiencia en el tratamiento del cáncer de tiroides anaplásico, ya que estos son tumores raros que tienen mal pronóstico debido al rápido crecimiento tumoral [8]. Las mutaciones puntuales de RAS y BRAF son frecuentes en PDC y ATC; así como las mutaciones de p53 y amplificaciones de PIK3CA a menudo ocurren en ATC (Figura 5). [4], [10]. En la Figura 6A se muestra un esquema de la propagación del cáncer de tiroides a otros órganos del cuerpo, como los pulmones, los huesos y sus transporte por la sangre [26]; y en la 6B se encuentra una fotografía de un tumor anaplásico en la glándula tiroidea de un paciente [27].

1.3.5 Cáncer de tiroides medular (MTC)

El cáncer de tiroides medular es poco común y representa 1 a 2% de todos los cánceres de tiroides, a diferencia del cáncer de tiroides diferenciado, el cáncer de tiroides medular se origina en las células neuroendocrinas parafoliculares de la tiroides, se presenta con mayor

frecuencia como un nódulo tiroideo solitario en pacientes de la cuarta a la sexta década de la vida. El 70% de los pacientes que se presentan con un cáncer de tiroides medular palpable tienen evidencia de metástasis en los ganglios cervicales en la cirugía [8].

Alrededor del 25% de los MTC son hereditarios [11]. Se cree que las mutaciones en el protooncogén RET son la causa de la mayoría de los casos de cáncer de tiroides medular, mientras que una pequeña proporción es causada por mutaciones esporádicas de RAS [24]. Las mutaciones de la línea germinal en RET pueden predisponer a los pacientes al desarrollo temprano de cáncer de tiroides medular como un componente de los síndromes de neoplasias endocrinas múltiples de tipo 2A y 2B [8]. En la Tabla 1 se resumen las características principales de los subtipos de tiroides explicados en este apartado.

Tabla 1. Características generales de los tipos de cáncer de tiroides.

Características generales de los tipos de cáncer de tiroides [10].				
Tipo de tumor	Célula de origen	Prevalencia (% de cánceres de tiroides)	Atención estándar y pronóstico	Características
FTA	Células tiroideas foliculares (que producen hormona tiroidea y tiroglobulina)	Esta es una lesión benigna.	Vigilancia conservadora; tiroidectomía si es sintomático	Tumor benigno común de tiroides; arquitectura similar a FTC, pero típicamente encapsulada; sin invasión capsular o vascular; sin metástasis; sin características nucleares de PTC
PTC	Células tiroideas foliculares	80–85	Tiroidectomía y, en casos seleccionados, ablación con yodo radiactivo (fármacos nuevos para la enfermedad resistente); buen pronóstico general	Bien diferenciados, con arquitectura papilar y rasgos nucleares característicos que incluyen agrandamiento, forma ovalada, elongación, superposición y limpieza, inclusiones y surcos; propensión a la metástasis linfática; Los subtipos de PTC incluyen PTC convencional (CPTC), PTC de variante folicular (FVPTC), PTC de células grandes (TCPTC) y algunas variantes raras
FTC	Células tiroideas foliculares	10–15	Tiroidectomía y ablación con yodo radiactivo (fármacos novedosos para casos resistentes); buen pronóstico general	Patrones microfoliculares hiper celulares bien diferenciados, sin características nucleares de PTC; invasión vascular o capsular; propensión a la metástasis a través del torrente sanguíneo; El cáncer de tiroides de células de Hürthle es un subtipo único de FTC que representa del 2 al 3 % de los cánceres de tiroides y se caracteriza por células oncócicas grandes ricas en mitocondrias y núcleos y nucléolos densos, así como

				una alta propensión a la metástasis y un mal pronóstico
PDTC	Células tiroideas foliculares	5–10	Cirugía, yodo radiactivo (en casos seleccionados), quimioterapia, radioterapia, nuevos fármacos; mal pronóstico	Pobremente diferenciado, a menudo superpuesto con PTC y FTC; agresividad intermedia entre los cánceres de tiroides diferenciados e indiferenciados
ATC	Células tiroideas foliculares	2–3	Cirugía, quimioterapia, radioterapia, nuevos fármacos, cuidados paliativos; alta y rápidamente letal	Indiferenciado; mezcla de células fusiformes, gigantes pleomórficas y epitelioides; extremadamente invasivo y metastásico; altamente letal; puede ocurrir <i>de novo</i> o derivar de PTC, FTC o PDTC
Cáncer medular de tiroides	Células C parafoliculares (que producen calcitonina)	2–3	Cirugía, quimioterapia, radioterapia, nuevos fármacos (por ejemplo, vandetanib)	Agresividad moderada, alta propensión a la metástasis linfática; mutación <i>RET</i> ; que ocurren en formas familiares, MEN2 o esporádicas
Linfoma primario de la glándula tiroides	Linfocitos	<1	Quimioterapia	Tipo inusual y poco común de linfoma
Cáncer metastásico de otros órganos	Origen no tiroideo	<1	Tiroidectomía en casos seleccionados; tratamiento del cáncer original	Más comúnmente metástasis de cánceres renales y de mama; características del cáncer original

1.4 Estadísticas del incremento del cáncer de tiroides en el mundo.

El cáncer de tiroides es el cáncer endocrino más común, y su incidencia ha aumentado continuamente en las últimas tres décadas en todo el mundo.[28] [29] [8]. Se calcula que para el 2022 se diagnosticarán alrededor de 43,800 nuevos casos de cáncer de tiroides (11,860 en hombres y 31,940 en mujeres) y alrededor de 2,230 personas morirán a causa de cáncer de tiroides (1,070 hombres y 1,160 mujeres), esto solo en Estados Unidos [30]. En el Gráfico 1 se esquematiza la tendencia de casos de cáncer de tiroides en EE. UU. en los últimos años: (a) La tendencia en la incidencia de cáncer de tiroides en la población de América del Norte de 1999 a 2008, subdividida por género y (b) por la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico; (c) la tendencia en la incidencia de cáncer de tiroides en los Estados Unidos de 1980 a 2009 por histotipo [28].

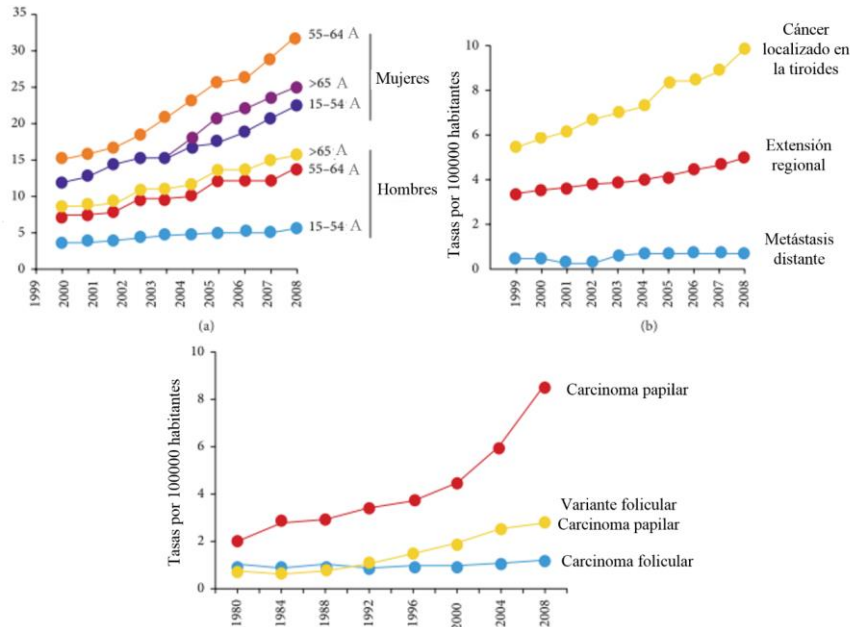


Gráfico 1. Incidencia del cáncer de tiroides en Estados Unidos en los últimos años. Gráfico adaptado [28].

En cualquier caso, la tasa de cáncer de tiroides en continuo aumento es independiente de las tasas de incidencia subyacentes, el aumento se debe casi exclusivamente a aumentos en la incidencia del histotipo papilar, sin cambios significativos para los histotipos folicular, medular o anaplásico, este se refiere principalmente a los tumores pequeños, aunque también han aumentado los tumores grandes [28].

Se ha concluido que este aumento en la incidencia se debe a un aumento en el diagnóstico de cánceres tiroideos subclínicos, en contraposición a un aumento en la ocurrencia de cáncer de tiroides, debido a un mayor uso de la ecografía guiada. biopsias por aspiración con aguja fina, dichas técnicas de diagnóstico avanzadas permiten la detección de tumores que miden 1 cm o menos y que, de lo contrario, permanecerían inactivos y pasarían desapercibidos. [29], [31], [32]. El sobrediagnóstico ha contribuido al aumento sustancial de la incidencia del cáncer de tiroides, fomentando y brindando oportunidades adicionales para la detección del cáncer de tiroides [33]. Además, la conexión entre el aumento de la incidencia de cáncer de tiroides y un estatus socioeconómico más alto, a menudo asociado con un acceso más fácil y frecuente al sistema de salud, es un argumento adicional para el aparente aumento del cáncer de tiroides debido al sobrediagnóstico [34].

A pesar del aumento constante de la incidencia, la mortalidad por cáncer de tiroides se mantiene estable en aproximadamente 0,5 casos por 100.000 personas, pero la tasa de

mortalidad por cáncer de tiroides no disminuye, sino que aumenta ligeramente, a diferencia de los otros tipos. [28]. Aunque la incidencia aumenta constantemente, la mortalidad por cáncer de tiroides ha cambiado mínimamente durante las últimas cinco décadas [8]. Por otro lado, también se ha reportado que la tasa de mortalidad ha aumentado ligeramente desde 2009 hasta 2018 (alrededor de 0.6% por año), pero parece haberse estabilizado en años recientes [30].

Por último, hablando de la situación en México, los reportes disponibles no son recientes y se limitan a estudios realizados en el centro del país [35]. Se registraron 2,361 casos de cáncer tiroideo en el 2012, 2.22% del total de tumor malignos, teniendo una mayor tasa de mortalidad en hombres [36]. Se registró una incidencia de hasta 20% de cáncer tiroideo en pacientes con patología quirúrgica tiroidea y corresponde al 10% de las malignidades de cabeza y cuello, con una mortalidad de 24% en el 2014 [35].

1.5 Factores genéticos causantes de la enfermedad.

1.5.1 Principales proteínas y oncogenes en el cáncer de tiroides.

La mayoría de los cánceres de tiroides albergan mutaciones a lo largo de la vía de señalización celular de la proteína quinasa MAPK, esta vía transmite señales de crecimiento desde la membrana plasmática al núcleo y juega un papel central en la regulación de la proliferación celular [8], en gran porcentaje de las modificaciones genéticas se deben a mutaciones somáticas y arreglos cromosomales. Los tres tipos más comunes de mutaciones somáticas observadas en el cáncer de tiroides papilar se reorganizan en los reordenamientos de los carcinomas de tiroides papilares / transformación (*RET/PTC*) y del receptor de neurotrofina-tirosina quinasa (*NTRK 1*), y una mutación de activación en la proteína de señalización mitógena *BRAF*. Estas alteraciones genéticas están presentes en aproximadamente dos tercios de los cánceres de tiroides papilar y son específicas del cáncer de tiroides papilar. Las mutaciones *RET/PTC* y *NTRK* son reordenamientos cromosómicos que involucran receptores de tirosina quinasa [12].

1.5.1.1 Translocaciones cromosómicas

Las translocaciones cromosómicas son reordenamientos genómicos que conducen a la expresión de nuevos oncogenes de fusión que inician eventos en muchos cánceres de tiroides [14]. La translocación de genes que da como resultado reordenamientos oncogénicos en el cáncer de tiroides se ejemplifica mejor con *RET-PTC*. Hay más de 10 tipos de translocación *RET-PTC*, según lo determinado por los tipos de genes asociados, y los tipos más comunes son *RET-PTC1* y *RET-PTC3* [10].

1.5.1.1.1 Mutaciones en los genes *RET/RTK*

El gen *RET* codifica un receptor transmembranal de un solo paso tirosina quinasa (RTK) que se expresa principalmente en células precursoras de la cresta neural y tracto urogenital [24], [37]. Los reordenamientos cromosómicos, principalmente inversiones intracromosómicas, que vinculan los promotores y los dominios *N*-terminales de genes no relacionados con el

dominio quinasa de RET dan como resultado la producción aberrante de formas quiméricas del receptor (RET/PTC) que son constitutivamente activos. Se han informado doce formas de RET/PTC, que se diferencian por el socio de fusión aguas arriba de RET. RET/PTC1 y RET/PTC3 son los más comunes y se forman por fusión de RET con los genes H4 (D10S170) o NCOA4 (ELE1), respectivamente [11]. La familia de translocaciones de cáncer de tiroides papilar RET que se dirigen al oncogén RET ocurre en aproximadamente el 7% de los casos de cáncer de tiroides papilar [8].

1.5.1.1.2 Reordenamientos *PAX8 / PPAR γ* .

El gen de fusión de la caja emparejada 8 (*PAX8*), receptor activado por proliferador de peroxisomas- γ (*PPARG*) (*PAX8-PPARG*) es otro oncogén recombinante destacado en el cáncer de tiroides, que se presenta en hasta el 60 % de FTC y FVPTC. *PAX8-PPARG* también ocurre en FTA, aunque, al igual que *RET - PTC*, su prevalencia es baja en tumores tiroideos benignos y su papel oncogénico no está claro [10].

Los reordenamientos de *PAX8 / PPAR γ* son el resultado de una fusión entre el extremo 5' del factor de transcripción *PAX8* y el extremo 3' de *PPAR γ* , un miembro de la superfamilia de receptores de hormonas nucleares, expresado constitutivamente en los tirocitos [14]. *PAX8-PPAR γ* ejerce un efecto negativo dominante sobre el supresor de tumores de tipo salvaje *PPAR γ* y también transactiva ciertos genes que responden a *PAX8* [10].

1.5.1.2 Mutaciones en los genes *Braf*.

BRAF es una serina / treonina quinasa que media la respuesta celular a la señalización de crecimiento y diferenciación. La mutación puntual *BRAF V600E* representa más del 97% de las mutaciones *BRAF* en el cáncer de tiroides papilar. La mutación *BRAF* está presente en aproximadamente el 40% de los cánceres de tiroides papilar, de la cual se abordará con mayor profundidad en los siguientes apartados [12]. Las mutaciones del gen *RAS* activan las rutas mitogénica *MAPK* y *PI3K* [14].

1.5.1.3 Mutaciones en los genes *Ras*.

En segundo lugar, en prevalencia de mutaciones, después de *Braf*, son las correspondientes a *RAS*. *RAS* está en su estado activo cuando se vincula con GTP. La GTPasa intrínseca de *RAS* hidroliza GTP y convierte *RAS* en un estado unido a GDP inactivo, terminando así la señalización de *RAS*. Las mutaciones de *RAS* provocan la pérdida de su actividad de GTPasa, lo que bloquea a *RAS* en un estado unido a GTP constitutivamente activo. Hay tres isoformas de *RAS*: *HRAS*, *KRAS* y *NRAS*, y *NRAS* está predominantemente mutado en los tumores de tiroides, principalmente en los codones 12 y 61. Las mutaciones de los tres oncogenes *RAS* están presentes en cánceres de tiroides diferenciados con la siguiente jerarquía: *NRAS*>*HRAS*>*KRAS* [11]. Aunque *RAS* es un activador dual clásico de las vías *MAPK* y *PI3K-AKT*, las mutaciones de *RAS* parecen activar la vía *PI3K-AKT* en la tumorigénesis de la tiroides, como sugiere la asociación preferencial de mutaciones de *RAS* con la fosforilación de *AKT* en los cánceres de tiroides [10].

En contraste con la mutación *BRAF*, las mutaciones en *Ras* y los reordenamientos *RET* / *PTC*, que también son las alteraciones genéticas comunes en PTC, fueron mucho menos comúnmente asociadas con alguna patogénesis agresiva de PTC en pacientes adultos o alteraciones moleculares relevantes, lo que sugiere que aunque estos oncogenes son, como la mutación *BRAF*, convencionalmente conocidos por estar acoplados a la vía MAP quinasa, es probable que sean menos potentes que la mutación *BRAF* en la activación de esta vía y la promoción de la agresividad de PTC [7]. Las mutaciones RAS ocurren con mayor frecuencia en el cáncer de tiroides folicular y en el cáncer de tiroides papilar variante folicular [8]. En la Tabla 2 se resumen las principales mutaciones genéticas explicado, incluyendo algunos oncogenes menos comunes, pero igualmente presentes en el cáncer de tiroides.

Tabla 2. Mutaciones genéticas presentes en los tumores tiroideos

Mutaciones genéticas presentes en los tumores tiroideos [10].				
Mutaciones	Tipos de tumores de tiroides	Prevalencia aproximada (%) *	Principales vías de señalización afectadas	Impacto funcional sobre la proteína y el tumor.
<i>BRAF</i> ^{V600E}	CPTC	45	MAPK	Activador; promover la tumorigénesis, invasión, metástasis, recurrencia y mortalidad
	FVPTC	15		
	TCPTC	80–100		
	ATC	25		
<i>BRAF</i> ^{K601E}	FVPTC	5	MAPK	Activador; probablemente similar a <i>BRAF</i> ^{V600E}
<i>HRAS</i> , <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i>	FTA	20–25	MAPK y PI3K–AKT	Activador; promover la tumorigénesis, invasión y metástasis de PDTC y FTC
	FTC	30–45		
	FVPTC	30–45		
	PDTC	20–40		
	ATC	20–30		
<i>PTEN</i> (mutación)	FTA	0	PI3K–AKT	Inactivando el gen pero activando la vía PI3K; promover la tumorigénesis y la invasividad
	FTC	10–15		
	ATC	10–20		
	PTC	1–2		
<i>PTEN</i> (supresión)	FTC	30	PI3K–AKT	Inactivando el gen pero activando la vía PI3K; promover la tumorigénesis y la invasividad
<i>PIK3CA</i>	FTA	0–5	PI3K–AKT	

	FTC	5–15		Activando; promover la tumorigénesis y la invasividad
	ATC	15–25		
	PTC	1–2		
<i>AKT1</i>	Cáncer metastásico	15	PI3K–AKT	Poco claro; parece favorecer la metástasis
<i>CTNNB1</i>	PDTC	25	WNT– β -catenina	Activando; promover la progresión del tumor
	ATC	60–65		
<i>TP53</i>	PDTC	25	Vías acopladas a p53	Inactivando; promover la progresión del tumor
	ATC	70–80		
<i>IDH1</i>	FTC	5–25	Vías metabólicas asociadas a IDH1	Inactivando; el impacto en los tumores no está claro
	FVPTC	20		
	CPTC	10		
	ATC	10–30		
<i>ALK</i>	ATC	10	MAPK y PI3K–AKT	Activando; probablemente promoviendo la progresión del tumor
<i>EGFR</i>	CPTC	5	MAPK y PI3K–AKT	Activando; el impacto en los tumores no está claro
<i>NDUFA13</i> (también conocido como <i>GRIM19</i>)	HCTC	15	Componente del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial	Probablemente inactivando; afectando el metabolismo mitocondrial y la muerte celular

* Los valores representan la prevalencia general estimada de las mutaciones indicadas.

1.5.2 Cambios en las vías metabólicas llevadas a cabo por la glándula tiroides.

La glándula tiroides está compuesta por 2 tipos de células productoras de hormonas: las células foliculares, que incorporan yodo para producir la hormona tiroidea, y las células parafoliculares (o células C), que son mucho menos prevalentes y producen calcitonina, una hormona que regula el calcio [20]. Hablando un poco sobre el metabolismo mediado por la tiroides (Figura 7), comienza cuando la hipófisis libera la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en respuesta a la estimulación del hipotálamo. La TSH estimula la tiroides para aumentar su captación del yodo presente en la sangre y producción de hormonas tiroideas (T4 y T3). Cuando la función tiroidea disminuye, la hipófisis libera más TSH para incrementar su estimulación de la tiroides. En las células de muchos tejidos, especialmente del hígado, la T4 es transformada en su forma activa, la T3. La Figura 7 enfatiza que para la producción de la hormona T4 se necesitan nutrientes como la L-tirosina y yodo. Para pasar

de T4 a T3, la glándula tiroides requiere minerales como el zinc, cobre y selenio, así como vitaminas A y E [38].

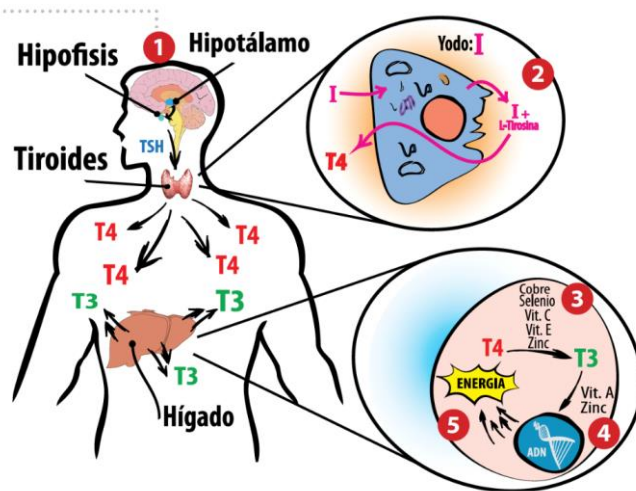


Figura 7. Metabolismo mediado por la glándula tiroide. [38].

Aunado con el metabolismo, el receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSHR) juega un papel clave en la captación de yoduro por el cotransportador de yoduro de sodio (NIS), la oxidación de yoduro, la organificación por peroxidasa tiroidea, la producción de tiroglobulina y la expresión disminuida o ausente de TSHR se ha encontrado previamente que es común en los cánceres epiteliales de tiroides. La hipermetilación del promotor que da como resultado la supresión de estas moléculas metabolizadoras de yoduro de la tiroides da como resultado la pérdida de la capacidad de las células cancerosas para concentrar yodo, lo que hace que los tumores sean insensibles a la terapia con yodo radioactivo [39]. El NIS media la captación activa de yoduro en la membrana basolateral de la célula folicular de la tiroides y juega un papel crucial en el éxito de la terapia con yodo radiactivo. El TSHR regula positivamente el NIS y los procesos moleculares relacionados. El principal mecanismo del cáncer de tiroides refractario a RAI es el silenciamiento anormal del gen NIS y TSHR en las células cancerosas de tiroides. El NIS está regulado negativamente por la vía MAPK en el cáncer de tiroides, en el que la mutación BRAF^{V600E} juega un papel importante [40]. Sin embargo, la expresión del gen NIS metabolizador de yoduro se reduce en el cáncer de tiroides, lo que resulta en la reducción de la acumulación de yoduro en las células tiroideas, particularmente en el carcinoma no diferenciado. La disminución del nivel de expresión de NIS conduce directamente a la reducción de la capacidad de acumulación de yodo en las células de la glándula tiroides y la resistencia a la terapia con yodo radiactivo, lo que conduce al fracaso del tratamiento [40].

1.5.3 Efecto en el metabolismo hormonal.

La diferencia entre hombres y mujeres está en las hormonas sexuales y su influencia en los diversos sistemas del cuerpo, se ha planteado la hipótesis de que la fluctuación de las hormonas sexuales durante el ciclo menstrual y el embarazo de una mujer es la razón de la disparidad de género en el cáncer de tiroides papilar. Por otro lado, los factores reproductivos, menstruales y ambientales pueden explicar esta disparidad entre ambos sexos, pero se sabe muy poco acerca de qué factores moleculares explican esta diferencia [12].

Los efectos de las hormonas sexuales están mediados por receptores nucleares específicos de hormonas que regulan la expresión génica y la biología de las células tumorales. Los receptores de estrógenos α y β median el efecto de los estrógenos y se expresan en el cáncer de tiroides papilar. Se ha planteado la hipótesis de que el polimorfismo en los receptores de estrógenos podría ser un factor de riesgo de cáncer de tiroides. Se ha demostrado que, aunque las células de cáncer de tiroides papilar tienen niveles bajos de receptor de estrógeno α , con la estimulación fisiológica de estrógenos, el nivel del receptor se regula significativamente al alza y se promueve la proliferación celular, los efectos del estrógeno en las líneas celulares de cáncer de tiroides dependen del tipo de cáncer de tiroides, y el estrógeno aumenta drásticamente los niveles de receptor de estrógeno α en el cáncer de tiroides papilar, mientras que en el cáncer de tiroides anaplásico y el cáncer de tiroides folicular los niveles de receptor no se alteran significativamente [12], [39], [41].

Para el caso de la TSH, un papel importante de esta hormona en la progresión del cáncer de tiroides está indicado por la disminución de la tasa de recurrencia y la mejora de la supervivencia en los pacientes con cáncer de tiroides tratados con L-T4 supresora de TSH. Un estudio reciente indica que, tanto en análisis univariados como multivariados, el riesgo de tener un cáncer de tiroides y también de tener un cáncer en un estadio avanzado aumenta en pacientes con niveles séricos de TSH más altos, por el contrario, el riesgo de cáncer se redujo en pacientes hipertiroideos con nódulos tiroideos autónomos y una TSH sérica baja, lo que sugiere que los niveles de TSH, independientemente del mecanismo subyacente, se correlacionan positivamente con el riesgo de cáncer de tiroides [28].

1.6 Factores epigenéticos causantes de la enfermedad.

1.6.1 Incidencia del yodo en el desarrollo de la enfermedad

La deficiencia de yodo es un factor de riesgo bien establecido para desarrollar cáncer de tiroides folicular, y la suplementación con yodo se ha implementado en la mayoría de las regiones con bocio endémico. Por el contrario, el exceso de yodo se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer de tiroides papilar [12]. La deficiencia de yodo provoca un aumento de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), un factor de crecimiento importante para las células foliculares tiroideas [34]. Los experimentos con animales demostraron un claro aumento de cáncer de tiroides después de una deficiencia prolongada de yodo que conduce a

un aumento de TSH. Sin embargo, este efecto no está demostrado en humanos residentes de áreas deficientes en yodo [28].

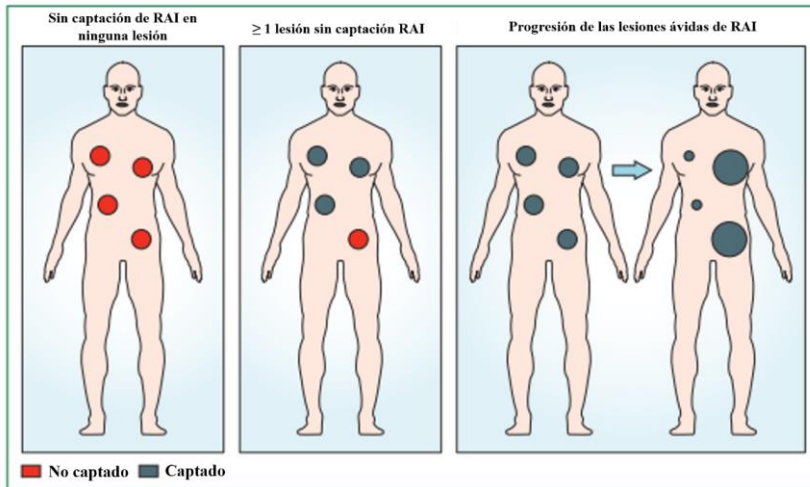


Figura 8. Esquema de cáncer de tiroides diferenciado estándar de pacientes refractarios a la RAI, Figura adaptada [8].

Aunque no se ha demostrado una relación causal entre la ingesta de yodo y la mutación de BRAF, el aumento mundial de la ingesta de yodo y el aumento paralelo de la prevalencia de PTC BRAF-positivos están de acuerdo con un posible papel del aumento de la ingesta de yodo en el aumento de PTC incidencia. [28].

Por otro lado, se ha reportado que los pacientes con cáncer de tiroides diferenciado podrían tener una enfermedad refractaria al yodo radiactivo (RAI), los cuales no son capaces de captar ni metabolizar el RAI [8], y presentan lesiones metastásicas que no captan y/o tampoco progresan la RAI, como se indica en la Figura 8. La terapia con RAI aprovecha esta captación de yoduro mediada por NIS para tratar cánceres de tiroides como el PTC que se originan a partir de estas células. Sin embargo, los cánceres de tiroides agresivos o avanzados a menudo tienen una expresión de NIS drásticamente reducida y son refractarios a RAI. El cambio asociado con yodo de un histotipo folicular a uno papilar puede deberse a la frecuencia de la mutación BRAF^{V600E} [40].

1.6.1.1 Hipermetilación de TSHR.

Como se había comentado brevemente en los subtemas anteriores, se ha identificado la hipermetilación de múltiples genes en asociación con la vía PI3K/AKT en los cánceres foliculares de tiroides y de la vía MAPK en los cánceres papilares de tiroides. El promotor del gen TSHR con frecuencia está hipermetilado en el carcinoma de tiroides, con metilación preferencial en el carcinoma indiferenciado. Por el contrario, el promotor del gen TSHR no

está metilado en la tiroides normal y en los tumores benignos (adenoma tiroideo). La hipermetilación del promotor de TSHR se informa en el 34-59 % de los pacientes con cáncer papilar de tiroides [10], [39].

La mutación BRAF^{V600E} se asocia con características clínicas agresivas y disminución de la expresión de los genes NIS y TSHR; a su vez, también se asocia con una expresión disminuida de ARNm para el NIS y el receptor de TSH, que se consideran marcadores secundarios de la diferenciación tiroidea [39].

1.6.2 Efecto de la quimio y radioterapia.

La exposición a la radiación ionizante es un factor de riesgo de cáncer bien documentado. La radiación ionizante promueve la rotura de la doble cadena del ADN e induce el reordenamiento de RET/PTC1 en determinadas condiciones experimentales. Tanto la exposición a la radiación como el yodo generan especies reactivas de oxígeno (ROS), que inducen estrés oxidativo y daño al ADN en las células foliculares de la tiroides, lo que aumenta la tasa de mutación espontánea [42].

La tiroides puede irradiarse más que otros tejidos debido a su posición en el cuerpo y su capacidad para concentrar yodo [28]. Debido a que un tercio de todas las tomografías computarizadas se realizan en la región de la cabeza / cuello, la tiroides está particularmente expuesta a la radiación. Además, el uso de agentes de contraste yodados aumenta la radiación absorbida por la tiroides hasta en un 35% porque el yodo bloquea los fotones, aumentando la energía de radiación local. Otra fuente específica de irradiación de la tiroides son las imágenes de la tiroides con I¹³¹ que se ha utilizado en gran medida para el diagnóstico de enfermedades de la tiroides. El uso terapéutico de I¹³¹ para el hipertiroidismo ha continuado o incluso aumentado, y se ha observado un pequeño aumento del cáncer de tiroides en estos pacientes adultos. Un metaanálisis reciente concluyó que el uso de RAI para el hipertiroidismo aumenta efectivamente el riesgo de cáncer de tiroides y de estómago y también se observó un efecto de dosis para la tiroides a dosis diagnósticas > 1 Gy. Además, la radioterapia para las neoplasias malignas de cabeza y cuello es una fuente adicional de irradiación tiroidea [28].

1.6.3 Relación entre factores genéticos y ambientales con la incidencia de cáncer de tiroides

La exposición diferencial a los factores de riesgo también puede causar diferencias en el aumento de la incidencia de cáncer de tiroides por raza y etnia. Los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de tiroides incluyen el sexo femenino, exposición a radiaciones ionizantes, y la deficiencia o exceso de yodo. Los factores de riesgo menos comprendidos incluyen las hormonas femeninas y la obesidad [29]. En el Gráfico 2 se reportan los números casos de cáncer más frecuentes en México durante el 2018, donde se puede observar que está presente con un 9.7% del total de casos, siendo el segundo cáncer más común después de presente en la glándula mamaria [43].

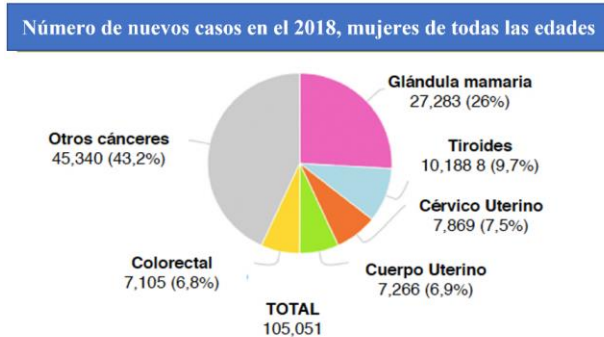


Gráfico 2. Número de casos en el 2018 de tipos de cáncer en mujeres de todas las edades en México [43].

1.6.3.1 Raza étnica

Diversos informes indican tendencias específicas por edad similares por grupos raciales/étnicos. Aunque las tasas más bajas de cáncer de tiroides se observan en personas de raza negra, la mayor tasa de aceleración del cáncer de tiroides papilar se produce en las mujeres de raza negra. El cambio porcentual anual de hombres y mujeres fue de 6.3% y 7.1% para pacientes blancos, 4.3% y 8.4% para negros, 4.2% y 6.7% para hispanos y 3.4% y 6.4% para pacientes asiáticos / PI (isleños del Pacífico) respectivamente [28]. En el cáncer de tiroides, se han observado similitudes en la detección y el manejo en países de ingresos altos, en comparación con países de ingresos medios o bajos. La variabilidad global en la incidencia del cáncer de tiroides se ha atribuido a múltiples causas, como las diferencias en las prácticas de diagnóstico, los sistemas de atención de la salud, las exposiciones ambientales y los factores de riesgo individuales [44]. (Figura 9).

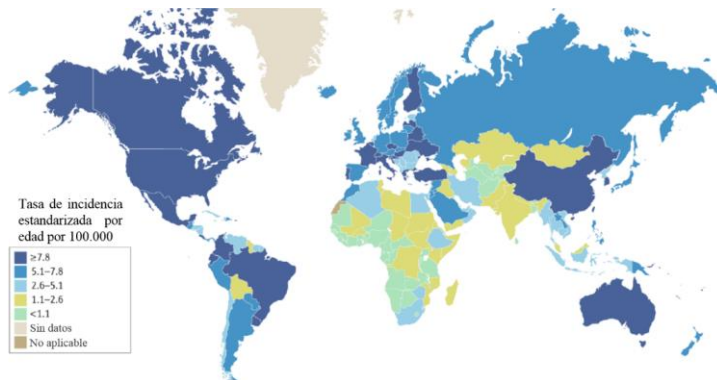


Figura 9. Tasas de incidencia mundial estandarizadas por edad estimadas de cáncer de tiroides en 2018. [44].

1.6.3.2 Edad

La mediana de edad en el momento del diagnóstico es más joven para el cáncer de tiroides que para la mayoría de los otros tipos principales de cáncer, con una mediana de edad en el momento del diagnóstico en los EE. UU. de 49 años para las mujeres y 54 años para los hombres [33], [45]. Los factores tumorales incluyen ciertas variantes histológicas, como variante de células altas, tumor de gran tamaño, presencia de metástasis en los ganglios linfáticos, extensión extratiroidea y metástasis a distancia. Variables del paciente incluyen edad avanzada en la presentación inicial, la presencia en los niños de ≤ 10 años, y el sexo masculino [21]. Una investigación señaló que la presencia de la mutación BRAF está estrechamente relacionada con la edad del paciente; por lo tanto, puede haber efectos sinérgicos que conduzcan a un mal pronóstico [46].

1.6.3.3 Obesidad

Se ha demostrado una fuerte correlación entre la obesidad y el riesgo de cáncer y la mortalidad para varias neoplasias malignas [34]. Análisis en poblaciones de daneses sugirieron que la altura y el peso pronunciados en la niñez (a la edad de 7 a 13 años) se asocian positivamente con el riesgo de cáncer de tiroides en la edad adulta. En cuanto a su explicación metabólica, existe una creciente evidencia de estudios de laboratorio que sugieren que la obesidad podría promover el desarrollo de cáncer de tiroides a través de vías complejas que involucran efectos independientes y sinérgicos de resistencia a la insulina, factor de crecimiento similar a la insulina 1, adipoquinas (por ejemplo, leptina), estrógeno y TSH78 [33]. Un estudio respalda la posibilidad de que la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia (una característica típica de la obesidad), más que un trastorno metabólico, puedan ser un factor de riesgo de cáncer de tiroides. La insulina regula la expresión génica de la tiroides y estimula la proliferación, diferenciación y transformación de los tirocitos. La hiperinsulinemia, por tanto, puede ser un factor de riesgo de cáncer de tiroides, pero su efecto sobre la tiroides debería ser similar al observado en otros órganos donde la incidencia de cáncer no ha aumentado [28].

1.6.3.4 Dieta y estilo de vida

Las influencias de la dieta, el estilo de vida y la contaminación en la iniciación del cáncer de tiroides nunca se han estudiado detenidamente. Las evidencias de un posible efecto de nutrientes / alimentos o contaminantes ambientales sobre el cáncer de tiroides son débiles y no están confirmadas [47]. Algunos contaminantes alimentarios industrializados, por ejemplo, los nitratos, pueden competir con la absorción de yodo por la tiroides y pueden comportarse como posibles disruptores y carcinógenos de la función tiroidea [34]. Un nivel medio alto de nitratos en los suministros de agua se asocia con un mayor riesgo de cáncer de tiroides [28]. Aunado a este último punto, han indicado que los cambios en la fortificación y la suplementación con yodo podrían haber tenido un papel en el aumento de la incidencia de PTC, así como diversas sustancias químicas bloqueadoras endocrinas también podrían haber contribuido debido a sus efectos conocidos sobre la síntesis de la hormona tiroidea [33].

Otro factor importante que se sospecha que contribuye al aumento de la incidencia del cáncer de tiroides es el tabaquismo, que se ha asociado constantemente con un riesgo reducido de ~30 a 40% de desarrollar esta enfermedad. Existe cierta plausibilidad biológica para esta asociación, ya que el tabaquismo actual se ha asociado con niveles reducidos de TSH, T3 y T4, menor prevalencia de autoanticuerpos tiroideos séricos, mayor riesgo de enfermedad de graves, hipertiroidismo y niveles reducidos de estrógeno [33].

1.6.3.5 Condiciones ambientales

En las últimas décadas, la población ha estado más expuesta a contaminantes ambientales como asbesto, benceno, formaldehído, pesticidas, bisfenol A (BPA), bifenilos policlorados (PCB) e hidrocarburos aromáticos polihalogenados (PHAH), todos compuestos que pueden actuar como carcinógenos genotóxicos o no genotóxicos. Es posible que algunos productos tengan un efecto cancerígeno específico sobre la tiroides, ya sea directamente o actuando como disruptores endocrinos. [28]. Igualmente, el ambiente volcánico puede estar asociado con un aumento en la incidencia de cáncer de tiroides. [28].

1.7 Proteína mutada BRAF^{V600E}

1.7.1 Familia de proteínas Raf

RAF, una proteína cinasa de serina-treonina citoplasmática, es miembro de la vía de señalización celular RAS-RAF-MEK-ERK [también conocida como vía MAP cinasa (MAPK)], y juega un papel esencial en la mediación de la diferenciación celular proliferación, senescencia y supervivencia en respuesta a señales extracelulares [20] [48] (Figura 10). A su vez, la vía MAPK puede hiperactivarse en aproximadamente el 30% de los cánceres humanos por muchas membranas diferentes, receptores unidos, 2 como BRAF, las proteínas G pequeñas de la familia RAS, y tirosina quinasas receptoras [49].

La regulación de esta vía es compleja porque existen múltiples isoformas de cada proteína de la vía, cada una codificada por genes diferentes y con funciones distintas y superpuestas. Hay 3 isoformas de RAF: ARAF, BRAF y CRAF (también conocidas como Raf-1). El gen *BRAF*, que se encuentra en el cromosoma 7, es el activador de la vía MAPK más fuerte y el oncogén humano mutado con mayor frecuencia en la superfamilia de quinasas. Existe otra variante de Braf denominada BRAF^{D594V} o "quinasa muerta" ya que el BRAF es catalíticamente inactivo, sin embargo, se ha encontrado en múltiples cánceres. Se ha demostrado que este BRAF sin quinasa o BRAF de tipo salvaje que ha sido inhibido químicamente se une a CRAF y potencia las mutaciones oncogénicas de Ras, estimulando así aún más la cascada de señalización de MAPK y dando como resultado un mayor crecimiento tumoral [20].

1.7.2 Función y participación de la proteína Braf en el metabolismo.

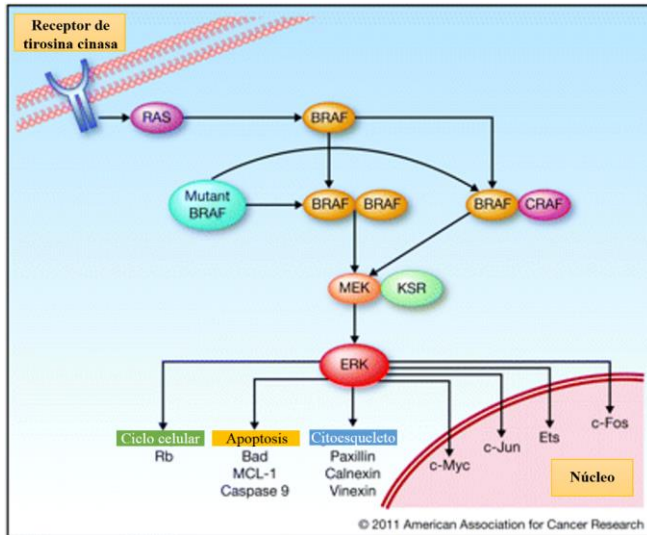


Figura 10. La vía de señalización de MAPK. Imagen adaptada. [20].

Esta proteína quinasa involucrada en la transducción de señales mitogénicas desde la membrana celular al núcleo. Además, fosforila MAP2K1 y, por lo tanto, activa la vía de transducción de señales de MAP quinasa [50]. La activación fisiológica de esta vía ocurre típicamente a través de una variedad de receptores de la membrana plasmática que activan Ras, una proteína G pequeña unida a la membrana. Ras activado recluta a Raf a la membrana plasmática para su activación. Posteriormente, Raf fosforila y activa la quinasa MAP-ERK (MEK), que fosforila y activa la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK). Después de la translocación nuclear, Erk puede fosforilar directamente múltiples factores de transcripción, incluidos c-Myc, c-Jun, Ets y c-Fos. Se ha demostrado que estos factores de transcripción, a su vez, regulan el ciclo celular, el crecimiento y la supervivencia [49] [51]. Erk también fosforila muchas proteínas citosólicas, incluidas proteínas del ciclo celular como el retinoblastoma, proteínas apoptóticas como Bad, MCL-1 y caspasa 9, y proteínas del citoesqueleto como paxilina, calnexina y vinexina [20].

Además de su actividad en la vía MAPK, también Braf está relacionada con otros procesos biológicos como la respuesta celular al Ca^{+2} , está implicada en la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico, en la regulación positiva de la cascada ERK1 y ERK2, regulación negativa del proceso apoptótico, como inductor de la fosforilación de la peptidil-serina, regulador positivo del transporte transmembrana de glucosa, en la morfogénesis de órganos animales, entre otras [50].

1.7.3 Mutación BRAF^{V600E}.

El oncogén *BRAF* es un potente activador de esa vía y se ha implicado en varios cánceres humanos, incluidos el melanoma maligno, los carcinomas colorrectales y los sarcomas. Se ha informado que *BRAF* está mutado en muchos tipos de tumores humanos, observándose con mayor frecuencia en el 50-70% de las líneas celulares y tumores en el melanoma, en el 36-69% de los cánceres papilares de tiroides, menor frecuencia en el cáncer colorrectal (5 a 12%) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (1 a 4%) [49].

La mutación de una sustitución de aminoácidos en la posición 600 en *BRAF*, de una valina (V) a un ácido glutámico (E) (BRAF^{V600E}), es la segunda mutación más común en el cáncer y es el evento molecular más prevalente en el cáncer de tiroides. En la Figura 11 se esquematiza esta mutación: (A) una transversión de T → A en el exón 15 en el nucleótido 1799 (T1799A) del gen *BRAF* conduce a un reemplazo valina → ácido glutámico en la posición 600; (B) el resultado de secuenciación de Sanger muestra la mutación BRAF^{V600E} en una muestra de cáncer de tiroides papilar. BRAF^{V600E} se observa en el 60-70% de los carcinomas papilares de tiroides (PTC) y en el 45% de los ATC, y la incidencia es aún mayor en los PTC recurrentes o metastásicos [6]; no ocurre en FTC, cáncer de tiroides medular y tumores tiroideos benignos. Mediante la activación aberrante y constitutiva de la vía Ras → Raf → MAP quinasa / ERK (vía MAP quinasa), la quinasa BRAF V600E mutante resultante es potencialmente oncogénica [7] [20].

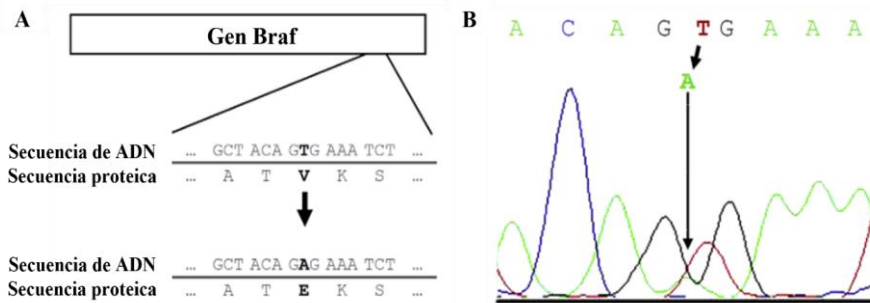


Figura 11. Mutación BRAF^{V600E}. Figura adaptada [52].

BRAF se encuentra en el cromosoma 7q24 y codifica una serina-treonina quinasa. Después de la activación por RAS, la fosforilación de *BRAF* desencadena una serie de eventos de activación a lo largo de la cascada MAPK [16]. En su conformación de tipo salvaje, los residuos G597 a V601 forman una interacción hidrófoba con los residuos G465 a V472 en el lado de unión a ATP (bucle P), manteniéndolo inactivo. El BRAF^{V600E} la mutación interrumpe la interacción hidrófoba, lo que permite que la quinasa *BRAF* se pliegue en una formación catalíticamente activa, lo que da como resultado un aumento de casi 500 veces en la actividad de la quinasa [20]. En la mayoría de los trastornos moleculares responsables promovidos por, o asociados con, *BRAF* se han identificado mutaciones, incluida la

sobreexpresión de genes promotores de tumores, la supresión de genes supresores de tumores y el silenciamiento de genes que manipulan el yoduro de tiroides, lo que da como resultado un deterioro o pérdida de la avidéz del yodo radiactivo y, por tanto, el fracaso del tratamiento con yodo radiactivo. Una estrecha asociación entre la mutación $BRAF^{V600E}$ y la metilación aberrante de varios genes supresores de tumores en PTC, incluidos los genes del inhibidor tisular de la metaloproteínasa de matriz-3 (TIMP3), la proteína quinasa asociada a la muerte (DAPK) y el receptor de ácido retinoico b2 (RARb2), el gen TSHR ha sido reportado [7], [39].

1.7.4 Efecto de $BRAF^{V600E}$ en el metabolismo.

En las células cancerosas, $BRAF^{V600E}$, es tentativamente 500 veces más activo que el tipo salvaje proteína, estimula la actividad constitutiva de ERK e impulsa la proliferación y la supervivencia, proporcionando así funciones esenciales de crecimiento y mantenimiento tumoral, aumentan su capacidad fosforilante y, con ello, la actividad de diversos genes claves para el metabolismo, proliferación y apoptosis celular; además de que contribuye a la neoangiogénesis al estimular la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular [41], [49], [51].

Varios mecanismos están involucrados en el fenotipo agresivo de PTC que es promovido por la mutación $BRAF^{V600E}$. La mutación activadora se localiza en el exón 15 de la isoforma B del gen de la quinasa Raf, lo que da como resultado un estado activo constitutivo de actividad quinasa y promueve la tumorigénesis a través de la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). La iniciación del tumor por la mutación oncogénica $BRAF^{V600E}$ hace que las células tiroideas sean susceptibles a la transición epitelio-mesenquimal inducida por el factor de crecimiento transformante beta, a través de un proceso dependiente de MAPK. La mutación $BRAF^{V600E}$ también puede aumentar la producción de moléculas que promueven el cáncer, como las proteínas de la matriz extracelular, la trombospondina-1, y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas [21]. Al mismo tiempo, la expresión específica de la tiroidea de $BRAF^{V600E}$ suprime la peroxidasa tiroidea y los niveles de ARNm de tiroglobulina, mientras que los niveles del transportador de glucosa tipo 1 (Glut1) aumentan [24], [37].

Se ha demostrado que la presencia de $BRAF^{V600E}$ está relacionada con genes involucrados en el metabolismo del yodo, sobre todo los que tienen que ver con la captación de yodo por las células, para la síntesis de hormonas tiroideas (Mondragón-Terán et al., 2016). Esta mutación se asocia con la pérdida de un simportador de sodio / yodo (NIS) y la posterior enfermedad metastásica refractaria al radioyodo (RAI). NIS codifica una proteína transmembrana responsable de la absorción de iones de yoduro de la sangre en los tirocitos para la producción de hormona tiroidea [40].

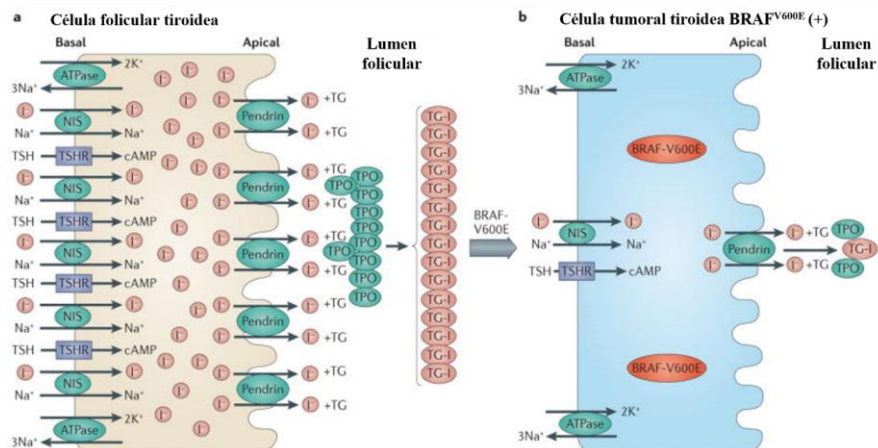


Figura 12. Maquinaria de manejo de yoduro en la célula tiroidea y su silenciamiento por BRAF^{V600E}. Imagen adaptada [10].

Profundizando en el metabolismo del I^- y NIS, en las células foliculares el Na^+ se transporta a la luz folicular a través de la pendrina en la membrana apical donde es oxidada por la peroxidasa tiroidea (TPO) e incorporada a los residuos de aminoácidos de tirosina en la tiroglobulina (TG) para formar TG yodados (TG-I) para la síntesis de hormonas en la glándula tiroides. Todo el proceso está regulado al alza por la señalización de AMP cíclico (cAMP) que se desencadena por la unión de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) a su receptor (TSHR) en la membrana. Con expresión y función normales de este sistema, el I^- se capta y acumula abundantemente en la célula tiroidea folicular y en la luz folicular. Cuando aparece la mutación BRAF^{V600E} en la vía MAPK en el cáncer de tiroides, provoca el silenciamiento de los genes específicos de la tiroides y apaga la maquinaria de manejo de yoduro. En consecuencia, la captación de I^- se reduce en la célula tiroidea y se acumula escasamente en la luz folicular [10]. En la Figura 12 A), se muestra una célula tiroidea folicular que expresa abundantemente las moléculas involucradas en la captación y el metabolismo del yoduro (I^-), incluido el NIS en la membrana basal, que transporta I^- junto con Na^+ al interior de la célula del compartimento extracelular; mientras que en el B), se observa la detención del transporte de sodio y yoduro debido al silenciamiento de genes por la mutación BRAF^{V600E} [10].

El uso de inhibidores de BRAF^{V600E} podría restaurar parcialmente la expresión de NIS y la captación de yoduro mediante la inhibición de la vía MAPK. Varios estudios han demostrado que BRAF^{V600E} reprime la expresión de NIS, pero restaura la expresión de NIS en las células tiroideas cuando se inhibe la vía BRAF^{V600E} / MEK o se silencia la expresión de BRAF^{V600E}. Desafortunadamente, los ensayos clínicos de tamaño de muestra pequeño con inhibidores de MEK o BRAF no cumplieron con las expectativas [40].

Comentado [ACC1]: Lo de a y b pasarlo al texto

1.7.5 BRAF^{V600E} como marcador molecular

La mutación Braf se puede analizar fácilmente en muestras de biopsia por aspiración con aguja fina de tiroides, con altas probabilidades de predicción preoperatoria de resultados clínico-patológicos de PTC [7], [9], [20]. La detección de mutaciones Braf en el ADN sérico también es de interés, ya que las células cancerosas a veces pueden desprenderse de un tumor y circular periféricamente en la sangre. Se ha indagado que la sensibilidad de detección era insuficiente; sin embargo, con el uso de una técnica de amplificación por PCR específica de alelo mutante, la detección de mutaciones de Braf en el ADN plasmático, por ejemplo, en pacientes con cáncer de colon, completándose con una sensibilidad del 100% [7], [9], [20]. Por su parte, se ha utilizado tanto la secuenciación directa del ADN como un método colorimétrico de detección de genes para llevar a cabo el análisis de mutación BRAF en la citología [16].

1.8 Diagnóstico y tratamientos empleados contra el cáncer de tiroides

1.8.1 Diagnóstico

El diagnóstico precoz es crucial para el tratamiento del cáncer de tiroides. Hay varios pasos para diagnosticar la enfermedad que comienza con un análisis de sangre para verificar los niveles de hormonas tiroideas. La detección de algunas anomalías en los niveles sanguíneos, como los niveles de TSH, los niveles de calcio, los niveles de tiroglobulina, los niveles de hormonas T3 y T4, se ha visto influenciada por la detección temprana de cáncer de tiroides [53].

El uso más frecuente de procedimientos de diagnóstico sensibles, que incluyen ultrasonido, examen Doppler, técnicas de imagen como tomografía computarizada resonancia magnética o tomografía por emisión de positrones y marcadores bioquímicos, ha aumentado la detección de muchos tipos de cáncer. En lo que respecta a la tiroides, los exámenes de ecografía y citología [53] han identificado un número creciente de cánceres de tiroides pequeños y asintomáticos [28]. A su vez, el muestreo de nódulos tiroideos mediante biopsia de aspiración por aguja fina (FNA) con el examen citológico posterior de las células recolectadas es la herramienta de diagnóstico más precisa y ampliamente utilizada en los últimos años [9]. Específicamente, la aplicación de la ecografía ha potenciado la detección de pequeños nódulos tiroideos que habrían pasado desapercibidos en la práctica clínica (solo el 40% de los nódulos tiroideos menores de 1,5 cm de diámetro máximo se descubren durante un examen físico). El examen Doppler de los vasos del cuello y otros procedimientos de imagen como la PET, por ejemplo, han aumentado la detección de tumores tiroideos incidentales. Por su parte, el descubrimiento incidental de tumores tiroideos preclínicos en el examen anatomopatológico puede ser más frecuente debido al mayor uso de la escisión quirúrgica ampliada (tiroidectomía total o subtotal) para las enfermedades tiroideas no malignas. [28]. En la Figura 13 se nota un corte longitudinal de un lóbulo tiroideo con un pseudonódulo. La foto izquierda en modo B y la foto derecha, Doppler color del mismo sector [54].

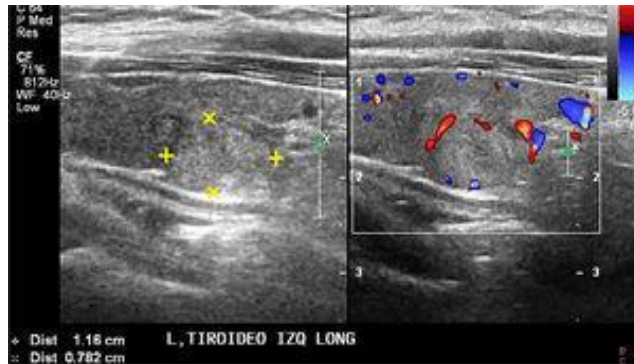


Figura 13. Ejemplo de una ecografía de tiroiditis crónica [54].

Al mismo tiempo, el uso de marcadores moleculares para la detección de oncogenes clave ha venido a revolucionar el análisis clínico clásico, pues son muy prometedores para mejorar el diagnóstico de cáncer en pacientes con nódulos tiroideos, a los cuales se les pueda ahorrar los estudios y cirugías innecesarias con estas pruebas moleculares. La mayoría de los estudios se han centrado en BRAF^{V600E}, explicado en el subtema pasado, así como mutaciones puntuales BRAF y RAS y reordenamientos RET/PTC y PAX8/PPAR γ , con la posible adición del reordenamiento TRK, para el análisis de muestras de FNA de tiroides, y proteínas como calcitonina y el antígeno carcinoembrionario [53]. Además de las mutaciones genéticas, también se ha explorado la expresión de marcadores de mRNA y miRNA para la evaluación diagnóstica de muestras de FNA de tiroides [9]; seguido de la integración de datos multiómicos y mapeos de expresión de ARNm genes involucrados en el PTC.

Igualmente, es importante destacar que la combinación del examen citológico y análisis molecular para tratar nódulos tiroideos es muy utilizada. Los nódulos positivos para mutaciones indican un alto riesgo de cáncer; por lo tanto, los pacientes con estos nódulos pueden tratarse mediante tiroidectomía total. Los pacientes con nódulos que arrojan un diagnóstico indeterminado en la citología, pero son negativos para mutaciones pueden requerir una FNA repetida y una lobectomía diagnóstica. Las pruebas moleculares de nódulos que resultan negativos para malignidad mediante citología disminuyen la tasa de resultados citológicos falsos negativos. Las pruebas moleculares de muestras clasificadas como malignas por citología pueden identificar tumores positivos para BRAF, que pueden requerir una cirugía más extensa que los tumores negativos para BRAF [9]. En la Figura 14 se muestra este proceso descrito para pruebas clínicas y moleculares [53].

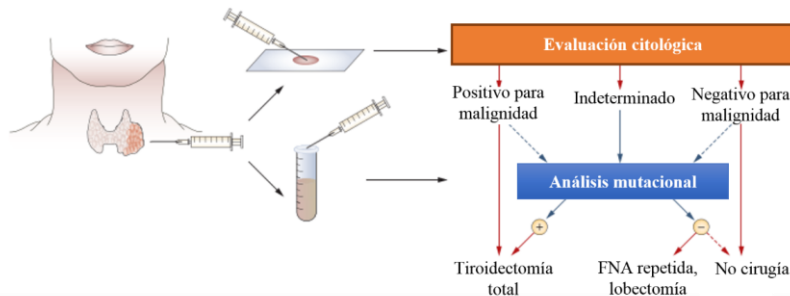


Figura 14. Metodología llevada a cabo en un análisis molecular para una evaluación diagnóstica positiva, indeterminada y negativa para tratar pacientes con nódulos tiroideos. Figura modificada [53].

En EE. UU. y muchos países europeos, los tratamientos estándar para PTC consisten en tiroidectomía quirúrgica en prácticamente todos los pacientes, seguida de ablación con yodo radiactivo en muchos pacientes. El último tratamiento aprovecha la avidéz única de yodo radiactivo de las células tiroideas a través de su capacidad para absorber y concentrar el yoduro como sustrato para la síntesis de la hormona tiroidea, un proceso que requiere la función normal de varios genes que manejan el yoduro de la tiroides. Aunque con estos tratamientos los pacientes con PTC generalmente tienen una baja mortalidad, la enfermedad puede reaparecer y, a menudo, progresar a una enfermedad incurable que es quirúrgicamente inoperable y carece de avidéz por el yodo radiactivo.

1.8.2 Tratamiento sitio-dirigidos contra las proteínas cinasas.

Se ha informado anteriormente de que dirigirse a la vía MAPK utilizando inhibidores de MEK podría aumentar la expresión génica de la tiroides y la captación de yodo radiactivo en las células de cáncer de tiroides y el melanoma [40].

Las quinasas controlan diversos eventos biológicos interpretando y propagando señales a través de un dominio estructural altamente conservado. Una característica clave de este dominio es su capacidad para cambiar entre estados activo e inactivo ante una señal determinada, lo que permite la dinámica requerida en los sistemas de señalización biológica, este interruptor generalmente implica movimientos coordinados de dos elementos estructurales, el segmento de activación (AS) y la hélice C (α C), donde las quinasas inactivas comúnmente tienen un AS compactado y una conformación desplazada "hacia afuera" de α C de manera que se rompe un puente salino entre la lisina catalítica de la hebra β 3 y un glutamato de α C; tras la activación (a menudo desencadenada por la fosforilación del AS), la conformación inactiva se interrumpe, lo que permite que tanto el AS adopte la posición requerida para la catálisis (el estado "DFG-in") y que α C cambie "hacia adentro" para formar el puente salino catalítico [55].

Los eventos oncogénicos evitan el proceso de activación de la quinasa a través de una variedad de mecanismos, incluidas mutaciones (p. ej., $BRAF^{V600E}$, $EGFR$ L858R), deleciones

o inserciones en marco (p. ej., *deleciones del exón 19 de EGFR* o inserciones del exón 20), amplificaciones (p. ej., *ERBB2*) y fusiones de genes (p. ej., fusiones *BCR-Abl*, *BRAF*). Las mutaciones recurrentes en las familias HER y RAF (*EGFR L858R* y *BRAF^{V600E}*) se agrupan en regiones estructuralmente homólogas dentro de sus AS. Las sustituciones cargadas de estos residuos interrumpen la conformación inactiva impulsada hidrofóbicamente, desplazando el equilibrio conformacional hacia la conformación activa *BRAF^{V600E}* también hace que la quinasa sea independiente de la activación y dimerización de RAS para la actividad [55].

Durante las últimas décadas, se han probado los inhibidores de la tirosina cinasa (TKI) *in vitro* e *in vivo* para el cáncer de tiroides papilar refractario al yodo radiactivo (RR-PTC), no solo para inhibir la progresión tumoral, sino también con el objetivo de promover la expresión del NIS y hacer que las lesiones respondan al radiofármaco teranóstico I^{131} [15]. Los inhibidores multicinasas, que actúan sobre múltiples componentes de la vía MAPK, han demostrado ser muy prometedores en el tratamiento de neoplasias malignas que albergan una mutación BRAF [20].

1.8.3 Fármacos inhibidores de las tirosinas cinasas.

En los últimos años, se ha realizado una considerable investigación dedicada al cáncer de tiroides diferenciado, lo que ha llevado a la aprobación de diversos inhibidores de quinasas para su uso en el cáncer de tiroides diferenciado, los cuales son antagonistas de las multicinasas con propiedades antiangiogénicas, aunque se han estudiado otras clases de fármacos en el cáncer de tiroides diferenciado y son prometedoras para el tratamiento de pacientes con enfermedad avanzada y ampliamente metastásica [8] (Figura 15).

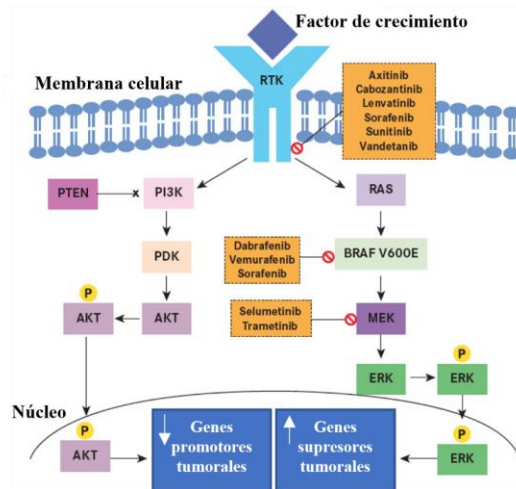


Figura 15. Fármacos dirigidos en múltiples proteínas de las vías MAPK y PI3K-AKT. Imagen adaptada [56].

Se ha desarrollado una amplia gama de inhibidores para tratar cánceres impulsados por BRAF, EGFR y HER2, incluidos *vemurafenib*, *erlotinib*, *gefitinib*, *lapatinib*, entre otros. Hasta la fecha, su eficacia se limita a subconjuntos de alteraciones oncogénicas [40].

Muchos de estos medicamentos son empleados en el tratamiento de distintos tipos de cáncer de tiroides. Por ejemplo, el vemurafenib, uno de los fármacos principales, ha sido aprobado para melanomas metastásicos *BRAF*^{V600E}, si bien los tumores que albergan fusiones de *BRAF* han sido resistentes preclínicamente a esta clase de inhibidores, otra clase de inhibidores de RAF, como sorafenib, muestra eficacia contra estas alteraciones oncogénicas [55]. Se ha informado que dirigirse a la vía MAPK usando inhibidores de MEK podría aumentar la expresión génica de la tiroides y la captación de yodo radioactivo en células de cáncer de tiroides y melanoma [40]. El selumetinib, un inhibidor de MEK para el cáncer de tiroides diferenciado refractario al yodo radiactivo (RR-DTC), ha demostrado aumentar la captación tumoral de ¹²⁴I en pacientes y, en otros ensayos, se mostró un aumento de la captación de ¹³¹I después de la administración de inhibidores de BRAF y MEK en la terapia [15]. En el mismo sentido, el dabrafenib y sorafenib han expuesto el mismo mecanismos en la captación de yodo [40].

1.8.3.1 Efectos secundarios.

Todos los TKI tienen efectos secundarios notables, como hipertensión, proteinuria, los dos efectos secundarios más comunes, seguidos de arritmia, trombosis, hemorragia y disfunción renal [57]. Los efectos adversos comunes asociados con sorafenib y lenvatinib son hipertensión, reacción cutánea de manos y pies, diarrea, erupción cutánea, fatiga, pérdida de peso y estomatitis, el aumento de la concentración de TSH también es común y es particularmente preocupante para los pacientes con cáncer de tiroides diferenciado, que deben tener TSH suprimida [8].

En adición, también existen los casos donde el tratamiento con el uso de inhibidores contra las tirosinas cinasas, como BRAF, puede provocar el desarrollo de resistencia al inhibidor que restringe su uso. Cuando sucede en el melanoma (metastásico), una forma de cáncer particularmente peligrosa que tiene un pronóstico muy malo y es resistente a muchas terapias estándar contra el cáncer, esto ayuda a estas células cancerosas a evadir el sistema inmunológico [58].

1.8.4 Fármacos desarrollados para inhibir la proteína BRAF^{V600E}.

1.8.4.1 Vemurafenib

Vemurafenib (PLX4032) [59] inhibe la serina-treonina quinasa BRAF^{V600E} al unirse selectivamente a su sitio de unión a ATP y mejora la supervivencia entre los pacientes con cánceres mutantes BRAF^{V600E} (Figura 16 B). Aunque vemurafenib desempeña un papel fundamental en la tumorigénesis impulsada por mutantes de BRAF, no todos los tipos de tumores responden de manera uniforme a la terapia dirigida de BRAF para, por ejemplo, ATC y cáncer de colon [60]. Este fármaco es usado para el melanoma (metastásico) y está

bajo consideración para los cánceres de tiroides y colorrectal, caracterizándose por ser un medicamento antimetastático y antimelanoma extremadamente importante debido a su inhibición explícita de BRAF^{V600E} [58].

Los ensayos clínicos de vemurafenib en el carcinoma de tiroides también han demostrado efectos antitumorales en pacientes con BRAF^{V600E}-PTC metastásicos o irresecables mutantes refractarios al yodo radiactivo. Sin embargo, la tasa de respuesta general para vemurafenib en el carcinoma de tiroides es mucho menor (29%) en comparación con el melanoma BRAF^{V600E} positivo y otros cánceres no melanoma BRAF^{V600E} positivos [6].

1.8.4.2 Sorafenib

El sorafenib (BAY 43-9006) [61] es uno de estos agentes terapéuticos que se dirige a los receptores 1 a 3 de BRAF, CRAF, VEGF, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y las quinasas RET para inhibir la proliferación tumoral y la angiogénesis [20]. Es aplicado para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, entre los que se encuentran el carcinoma hepatocelular, el carcinoma de células renales avanzado y el carcinoma de tiroides avanzado resistente al yodo radiactivo [58], [62] (Figura 16 A).

A pesar de su eficacia en el tratamiento del cáncer de tiroides, sorafenib tiene una serie de efectos secundarios que deben considerarse antes de iniciar la terapia. Los eventos adversos más comunes reportados incluyen diarrea, hipertensión, fatiga y síndrome mano-pie, como se había mencionado anteriormente [20]. Además, se ha demostrado que el efecto de sorafenib es similar al de la eliminación de ARN de interferencia (ARNip) de BRAF, inhibiendo la señalización intracelular mediada por BRAF^{V600E} *in vitro* en modelos de xenoinjerto y en células de carcinoma de tiroides, pero con efectos mínimos sobre los tirocitos normales [20].

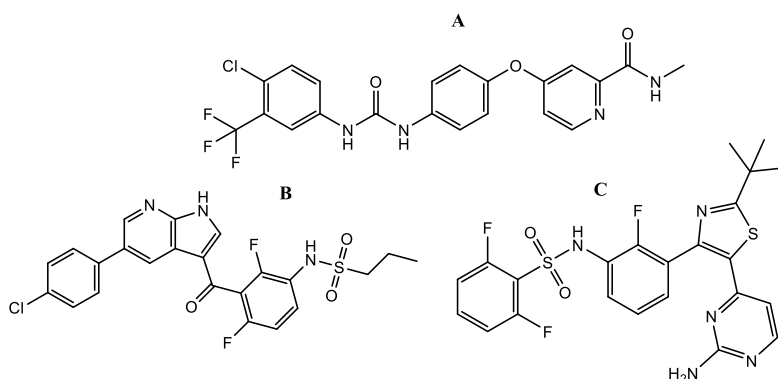


Figura 16. Estructuras químicas de fármacos inhibitorios contra BRAF^{V600E}.

1.8.4.3 Dabrafenib

Dabrafenib (GSK2118436) [63], un potente inhibidor competitivo de ATP de la cinasa BRAF, es selectivo para BRAF mutante en el cribado de paneles de cinasas, líneas celulares y xenoinjertos [64]. Recientemente, se reportó que el dabrafenib puede inducir parcialmente la captación de yodo radioactivo en pacientes con cáncer de tiroides refractarios a RAI [40] (Figura 16 C).

Se ha exhibido como este inhibidor es bien tolerado y activo contra el cáncer de tiroides diferenciado con mutación BRAF [64]. Igualmente, se ha investigado la combinación del dabrafenib con otros fármacos, donde en un estudio se concluyó que este antagonista más trametinib, es una nueva terapia dirigida de combinación altamente prometedora para pacientes con ATC mutado en BRAF^{V600E}, que demuestra una alta tasa de respuesta general, una duración prolongada de la respuesta y una supervivencia prolongada con toxicidad manejable [65].

1.8.4.4 Otros fármacos.

Existen otros fármacos que se han desarrollado para la inhibición de Braf y otras proteínas cinasas de la vía MAPK. Aquí se expondrán dos compuestos que fueron analizados *in silico* con BRAF^{V600E} para este proyecto. El primero de ellos es la oxima de (1E)-5-(1-piperidin-4-il-3-piridin-4-il-1h-pirazol-4-il)-2,3-dihidro-1h-inden-1-ona, la cual pertenece a los fenilpirazoles. Estos son compuestos que contienen un esqueleto de fenilpirazol, que consiste en un pirazol unido a un grupo fenilo. Se dirige a la proteína serina / treonina-proteína quinasa Braf [66] (Figura 17 A).

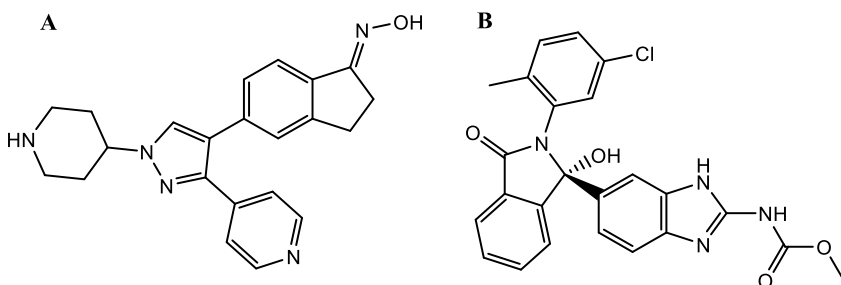


Figura 17. Estructuras químicas de fármacos inhibitorios

El segundo es el XL281, un nuevo compuesto anticancerígeno diseñado para inhibir potentemente la vía de señalización RAS/RAF/MEK/ERK. La activación mutacional de RAS ocurre en aproximadamente el 30% de todos los tumores humanos, incluido el cáncer de pulmón de células no pequeñas, pancreático y de colon. XL281 es un inhibidor específico de las quinasa RAF, incluida la forma mutante de BRAF, que se activa en el 60% de los melanomas, entre el 24 y el 44% de los cánceres de tiroides y en el 9% de los cánceres de colon [67] (Figura 17 B).

1.9 Tratamiento con esteroides para el cáncer.

1.9.1 Saponinas esteroidales.

Las saponinas constituyen una gran clase de glucósidos triterpénicos y esteroides anfifílicos, los cuales han exhibido un amplio espectro de actividades biológicas y farmacológicas, incluidos efectos citotóxicos, inmunostimuladores, anticancerígenos y antimicrobianos [68]. Diversos grupos o familias de las saponinas, como los esteroides espirostánicos, furostánicos y colestánicos, han mostrado actividades anticancerígenas muy relevantes para la farmacología, de los cuales se profundizará más adelante.

Además, otros metabolitos secundarios como los alcaloides esteroideos, los terpenos, los compuestos fenólicos, los flavonoides y las cumarinas se conocen como metabolitos secundarios han sido expuestos como potenciales agentes anticancerígenos. Entre sus mecanismos de acción más reportados están la inducción de la apoptosis, arresto del ciclo celular, efectos antiproliferativos y antimetastásicos. Entre los alcaloides más estudiados por su actividad antagonista en el cáncer son los siguientes: tomatidina, solamargina, solasonina, solasodina, ciclopamina, α -chaconina, entre otros [69]. En la Figura 18 se indican las estructuras de los siguientes alcaloides: A) tomatidina, B) ciclopamina y C) solamargina).

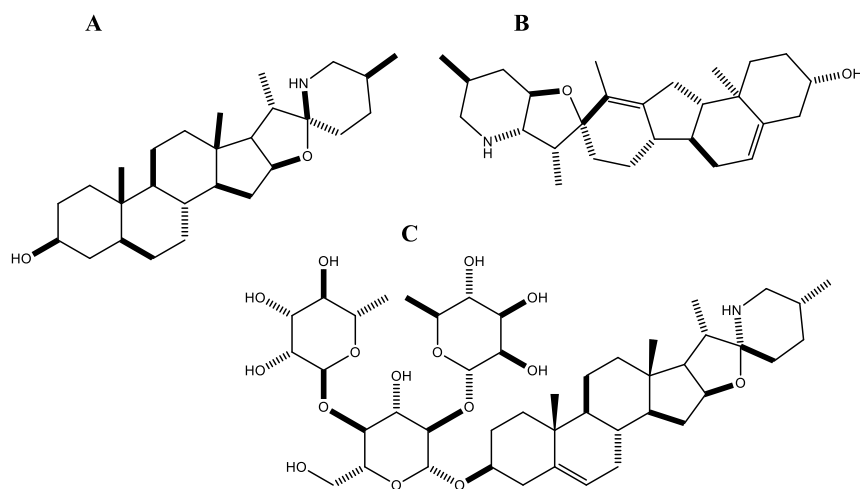


Figura 18. Ejemplos de alcaloides esteroideos con actividad anticancerígena.

1.9.2 Derivados y bioconjugados esteroidales.

Se han investigado diferentes derivados de esteroides contra diferentes tipos de cáncer, incluidos los de hígado, mama, próstata y tumor cerebral. El mecanismo de acción de los derivados esteroides como fármacos contra el cáncer es amplio, ya que pueden actuar como inhibidores de enzimas, como los inhibidores del CYP17 para la terapia avanzada del cáncer de próstata, los inhibidores de la 5α -reductasa para el tratamiento de la hiperplasia prostática

benigna, o como inhibidores de la aromatas y sulfatas para el tratamiento del cáncer de mama [70].

Por citar algunos ejemplos, estudios anteriores informaron que las sapogeninas esteroideas modificadas de cadena lateral (mostraron actividad citotóxica contra un amplio espectro de líneas celulares cancerosas. Sandoval, et al., encontraron que mientras que la diosgenina exhibía actividad citotóxica contra la línea celular de carcinoma cervical HeLa y CaSki, la oxima de 23-acetildiosgenina mostró una actividad aumentada contra HeLa y CaSki. Por otro lado, Santillán y colaboradores, describieron un conjunto de transformaciones en la cadena lateral SS que resultó en la síntesis de una familia de 23-etiliden-26-hidroxi-22-oxo-colestanos que exhibían actividad citotóxica contra las células CEM [71]. Debido a la gran diversidad estructural de los esteroides citotóxicos, encontrar uno preciso es una tarea complicada, si no imposible. Sin embargo, la evidencia recopilada de actividades anticancerígenas permite la asociación de la citotoxicidad con la presencia de ciertas subestructuras. Fuchs, et al., sugirieron que los iones oxocarbenio, formados como resultado de la escisión de restos espirocetales, pueden actuar como agentes alquilantes de biomoléculas nucleófilas y que esto subyace a la citotoxicidad observada en cefalostatinas y ritterazinas. Aunque esta hipótesis aún no está confirmada, el gran número de espirocetales esteroides citotóxicos, así como la relación inversa entre la citotoxicidad y la entalpía de la formación de iones oxocarbenio sugieren que esta supuesta explicación puede estar, al menos, bien orientada [71].

Pasando con las investigaciones con bioconjugados, Yan, et al., sintetizaron la biblioteca de conjugados 82 y 84 de aminoácido N-estradiol protegidos mediante el acoplamiento de 17 β -aminoéster 1,3,5(10)-trien-3-ol 81 o 17 β -hidrazonoestra-1,3,5(10)-trien-3-ol con diferentes aminoácidos como alanina, fenilalanina, leucina, ácido aspártico y lisina mediante catálisis usando subtilisina Carlsberg. Los estudios *in vitro* revelaron que las afinidades de unión entre los receptores de estrógeno y los conjugados de estradiol eran afectados por las propiedades de los aminoácidos conjugados, pero el cambio en las propiedades de unión no alteró la actividad biológica contra las líneas celulares MCF-7 y HeLa [72].

En otro intento, Li, et al., sintetizaron varios conjugados diméricos de ácido biliar-aminoácido mediante el acoplamiento de ácido cólico y desoxicólico con aminoácidos como L-cistina dimetil éster diclorhidrato y L -clorhidrato de éster metílico de lisina en DMF usando HBTU como reactivo de acoplamiento y trietilamina como base. Se realizó una desprotección adicional del éster metílico usando LiOH para obtener ácidos carboxílicos. Todos los compuestos sintetizados se seleccionaron para determinar su actividad anticancerígena contra la línea celular MCF-7 de cáncer de mama humano mediante el ensayo MTT estándar. Se encontró que algunos análogos desprotegidos eran menos activos contra MCF-7 con IC₅₀ > 50 μ M, lo que puede atribuirse a la interferencia del grupo ácido carboxílico con el exterior lipofílico, alterando así las conformaciones anfífilas intercaladas responsables de la actividad deseada [72].

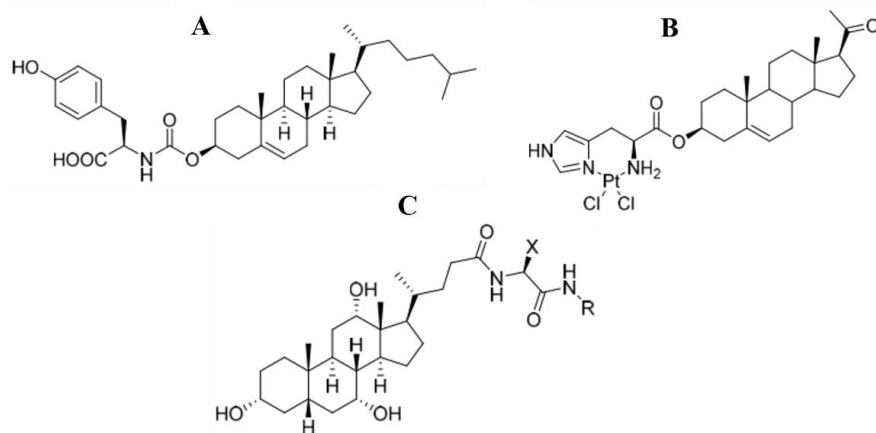


Figura 19. Ejemplos de derivados esteroideos anticancerígenos [72].

Agarwal, et al., sintetizaron amidas aromáticas / heteroaromáticas de ácidos biliares unidas a través de aminoácidos usando EDCI, HOBt como reactivos de acoplamiento y las probaron contra tres líneas celulares de cáncer humano HT29 (colon), MDAMB231 (mama), U87MG (glioma) y una línea celular humana normal HEK293T (riñón). Algunos compuestos que contienen fenilo, benzotiazol y 4-metilfenilo, respectivamente, mostraron potente actividad anticancerígena contra líneas celulares de cáncer de mama humano con respecto al cisplatino. La actividad observada fue comparable con respecto a la doxorubicina. Entre los derivados sintetizados de ácidos cólico y desoxicólico, se encontró que los compuestos que contienen un grupo arilo en la cadena lateral son más activos que los derivados sustituidos con arilo o heteroarilo. Se encontró que la mayoría de los compuestos eran seguros contra la línea celular humana normal HEK293T a una concentración de 25 μM [72]. En la Figura 19 se muestran algunos ejemplos de los derivados esteroideos: (A) Conjugados de tirosina-colesterol. (B) Complejo esteroide-platino. (C) Amidas aromáticas/heteroaromáticas de ácidos biliares unidas a aminoácidos

1.10 Familias esteroideas.

Las saponinas esteroideas comprenden una clase diversa de glucósidos vegetales que poseen una amplia gama de actividades biológicas interesantes. De acuerdo con la estructura de las saponinas, las saponinas esteroideas se pueden dividir en tres clases: las saponinas colestánicas, las espirostánicas y las furostánicas [73] (Figura 20).

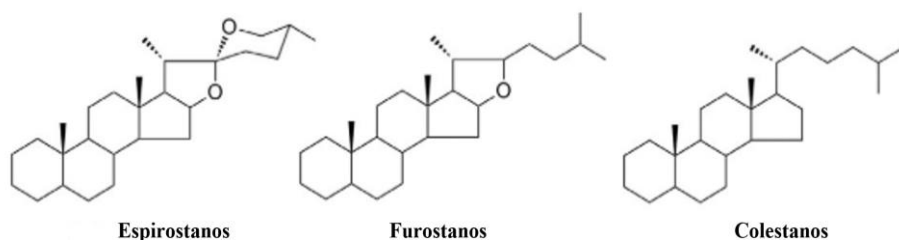


Figura 20. Esqueletos de aglicona representativos de saponinas esteroidales. Imagen adaptada. [68].

1.10.1 Furostanos

El nombre furostano se usa para compuestos con configuraciones en todos los centros asimétricos en su estructura excepto la posición 5, 22 y, si se sustituye la posición 26, también 25 [74]. Las saponinas furostánicas tienen un sustituyente beta-D-glucopiranososa en el 26-OH y otra cadena de azúcar unida, generalmente, en el 3-OH con pocas excepciones, el residuo 26-O-glucopiranosilo se escinde fácilmente por las enzimas presentes en las plantas y en condiciones ácidas de aislamiento, esto conduce al cierre del anillo F. Por lo tanto, las saponinas de furostano se consideran precursoras de las de los espirostanos correspondientes en las plantas. Ésta es también la razón por la que el reconocimiento de su existencia fue mucho más tardío que el de las saponinas de colestano y espirostano [73], [75]. En la Figura 21 A se dibujó la estructura del 5 β -furostano y la 21 B la del (25R)-5 α -Furost-20(22)-ene-3 β ,26-diol o por su nombre común: pseudotigogenina [76].

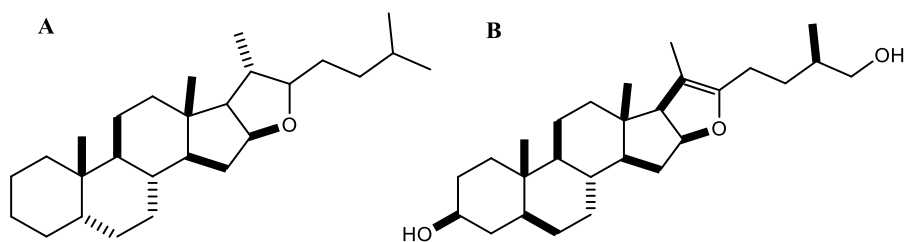


Figura 21. Ejemplos de furostanos.

1.10.2 Piranos

El pirano se caracteriza por un sistema de anillos de seis miembros, como motivo estructural importante, también se encuentra en una amplia gama de compuestos biológicamente activos y se sabe que tiene amplias aplicaciones en química médica [77]. Los derivados del pirano son de considerable interés tanto en la industria como en el mundo académico debido a sus potenciales actividades biológicas y medicinales, como analgésicas, anticancerígenas, antiinflamatorias, antibacterianas y también sirven como inhibidores potenciales de la quinasa Chk-1 humana (Figura 22). Además, las aplicaciones de los esteroides de la familia

piránica no solo se encuentran en ingredientes farmacéuticos y agroquímicos biológicos, sino que también constituyen una unidad estructural de varios productos naturales [78].

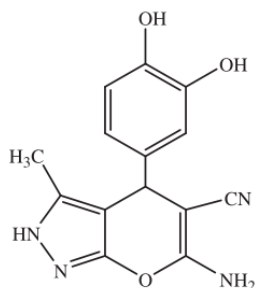


Figura 22. Derivado de pirano sustituido: un inhibidor de la quinasa Chk-1 humana [78].

Investigaciones han explorado el potencial de los oxindoles y los piranos, resaltando la importancia de los oxindoles esteroidales para conferir actividades citotóxicas. En el artículo de Yu, et al., se diseñaron una serie de híbridos de pirano-oxindol esteroidales, incorporando andamios clave tanto de oxindol como de 2-imino-3-ciano pirano, con el objetivo de obtener agentes citotóxicos potentes y selectivos. Además, también se exploraron los efectos sobre el ciclo celular y el posible mecanismo de inducción de la apoptosis [77].

1.10.3 Espirostanos

En los espirostanos, tanto los derivados 25R como los 25S se encuentran en la naturaleza, por lo que también debe especificarse la configuración C-25 [79] (Figura 23A, 5 β -espiroetano). Se ha relacionado estos compuestos con una amplia gama de actividades metabólicas, como la citotóxica y anticancerígena, en especial en un compuesto de esta familia: la diosgenina.

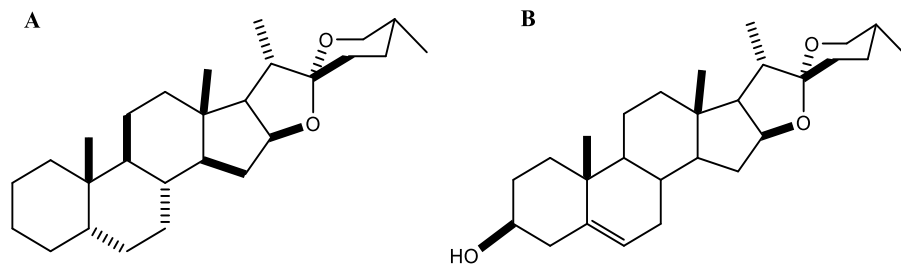


Figura 23. Estructuras de espirostanos.

La diosgenina (Figura 23B) es una saponina esteroidea espirocetal C27 disponible en abundancia en la naturaleza. Está presente principalmente en forma de saponina en las plantas, incluidas las especies *Trigonella*, *Dioscorea*, *Costus* y *Smilax*. En la medicina tradicional, se utiliza como agente antihipercolesterolemia, antihipertriacilglicerolemia,

antidiabetes y antihiper glucemia [80] [81]. Se ha demostrado que la diosgenina se dirige a múltiples vías de tumorigénesis, que incluye proliferación, apoptosis, angiogénesis, invasión e inmunosupresión inducida por tumores en diversas células tumorales y modelos de cáncer *in vivo*. Sin embargo, no existen informes en la literatura que elaboren el efecto de la diosgenina en la cascada de señalización ROS-ASK1-MAPK en células HepG2; aunque, se ha investigado la participación de ASK1 en el proceso apoptótico de las células HepG2 tratadas con diosgenina, actuando como un agente quimiopreventivo. Se ha demostrado que la diosgenina generó fuertemente ROS y este estrés oxidativo indujo la apoptosis a través de la activación de ASK1, que son señales ascendentes críticas para la activación de p38 MAPK / JNK en células cancerosas HepG2 [81].

1.10.4 Colestanos

Los brasinoesteroides se derivan del esqueleto de carbono 5α -colestano. Sus variaciones estructurales ocurren debido a la sustitución en los anillos A y B, así como en la cadena lateral C-17 [82].

Pasando a la actividad biológica asociada con los colestanos, en el estudio de Chen y colaboradores, se analizó la actividad anticancerígena de diversas sapogeninas colestánicas de la planta *Ornithogalum saundersiae Baker*. Se han aislado muchos compuestos colestánicos de esta planta, varios de los cuales tienen una potente actividad citotóxica contra las células tumorales [83], entre ellas la saponina OSW-1 del glucósido de colestano, siendo este un compuesto muy activo contra un amplio espectro de células cancerosas [84], obteniéndose buenos resultados de citotoxicidad específica hacia la línea celular MCF 7 [83]. Por otro lado, en el artículo de Rárová y su equipo, se encontró que dos derivados funcionalizados de colestano activos influyen fuertemente en la viabilidad celular, la proliferación, la distribución del ciclo celular, la apoptosis y las vías moleculares responsables de estos procesos en líneas celulares de cáncer de mama sensibles/insensibles a hormonas [85]. Algunas de las estructuras químicas más conocidas de esta familia se encuentran en la Figura 24: (A) 4,4,14-trimetil- 5α -colestano o lanostano y (B) 4,4,14-trimetil-9,19-ciclo- $5\sim 9\sim$ colestano o cicloartano.

1.10.5 Bisnorlactonas

Las lactonas son estructuras químicas constituidas por ésteres carboxílicos cíclicos. Las lactonas naturales y sintéticas exhiben un amplio espectro de actividades biológicas tales como actividades antihelmínticas, antimicrobianas, antiinflamatorias y antitumorales [86]. En el reino vegetal, las lactonas esteroidales se presentan como glucósidos, compuestos que consisten en un resto de azúcar unido a una aglicona esteroide. Las lactonas bisnorcolánicas constan de cinco anillos condensados, con un total de 22 átomos de carbono. Entre esas moléculas, existen variaciones en las estructuras, específicamente, diferente estereoquímica en la unión del anillo A/B (5α - y 5β -esteroides), doble enlace C5-C6, funcionalización 12 oxo, etc. Estas bisnorlactonas también pueden ser producidas por las reacciones de las sapogeninas esteroidales [84].

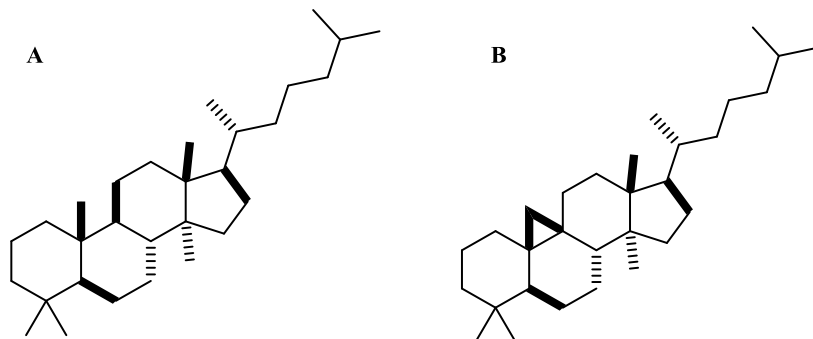


Figura 24. Ejemplos de colestanos.

En el estudio de Sato y colaboradores, se aislaron varios bisnor- y norditerpenoides con potentes actividades citotóxicas contra las células de leucemia murina P388 y se determinaron sus estructuras [87].

1.10.6 Bioconjugados

Se ha demostrado que las moléculas esteroidales dependen de las características estructurales del sistema de anillos de esteroides o de la cadena lateral, por lo que esta modificación química del esteroide proporciona una forma de alterar los grupos funcionales y se han establecido numerosas relaciones estructura-actividad por tales alteraciones sintéticas [78]. Las modificaciones químicas del sistema de anillos de esteroides y la cadena lateral proporcionan una forma de alterar los grupos funcionales y se han establecido numerosas relaciones estructura-actividad mediante tales alteraciones sintéticas [78]. Los bioconjugados formados por la conjugación de dos o más de tales moléculas bioactivas han mostrado una variedad de aplicaciones en biología, microelectrónica, ciencias de los materiales y ciencias farmacéuticas. Se sabe que los bioconjugados híbridos, conjugados de estructuras esteroides tienen un amplio perfil de actividad biológica [72] (Figura 25).

Se sabe que los conjugados esteroideos con poliaminas, aminoácidos, carbohidratos, heterociclos bioactivos y conjugados bis-esteroideos con diversas características estructurales muestran inmensas aplicaciones farmacológicas. Entre los diversos conjugados de este armazón bioactivo tetracíclico, los conjugados de aminoácidos esteroides (SAAC) son excepcionalmente atractivos debido a la posibilidad de un ajuste fino de la anfifilicidad con la posición, orientación y naturaleza de los aminoácidos. Los SAAC son moléculas anfifílicas naturales y sintéticas; la estrategia de conjugación proporciona un acceso fácil para alterar las propiedades fisicoquímicas de estas moléculas. Recientemente, se han explorado los SAAC por sus aplicaciones como antimicrobianos, antioxidantes, agentes antiarrítmicos, agentes anticancerosos y se sabe que actúan como agentes neuroprotectores en la enfermedad de Alzheimer, así como imitadores de factores transcripcionales [72].

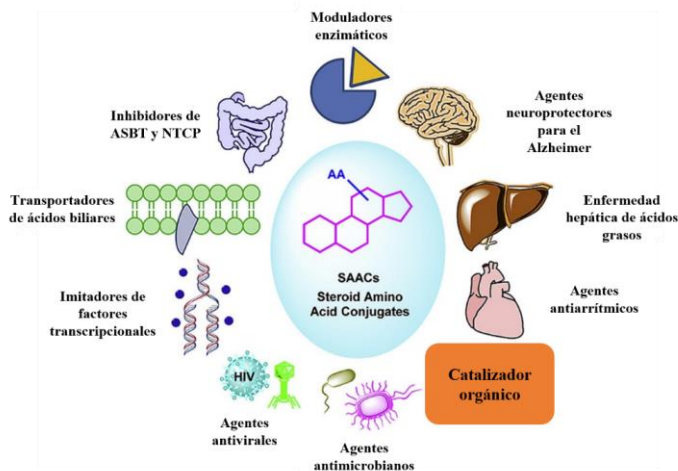


Figura 25. Potenciales aplicaciones de los bioconjugados esteroidales. Figura modificada [72]

1.11 Usos y aplicaciones del acoplamiento molecular.

La industria farmacéutica basada en la investigación ha empleado cada vez más métodos modernos de química médica, incluido el modelado molecular, como herramientas poderosas para el estudio de las relaciones estructura-actividad (SAR). Además de los datos farmacodinámicos (p. Ej., potencia, afinidad, eficacia, selectividad), también se han estudiado las propiedades farmacocinéticas (ADMET: absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) mediante la aplicación de estas metodologías [88]. Estos enfoques se han aplicado como valiosas herramientas de descubrimiento de fármacos tanto en la academia como en la industria, debido a su versatilidad y carácter sinérgico (Figura 26). La integración de estos enfoques se ha empleado con éxito en una serie de investigaciones de datos estructurales, químicos y biológicos [88]–[90].

El docking o acoplamiento molecular es un procedimiento computacional que intenta predecir la unión no covalente de macromoléculas o, más frecuentemente, de una macromolécula (receptor) y una molécula pequeña (ligando) de manera eficiente, a partir de sus estructuras no unidas, estructuras obtenidas de simulaciones de MD o modelos de homología, etc. [88]–[90]. El objetivo es predecir las conformaciones ligadas y la afinidad de unión, jugando un papel importante al colocar una molécula en el sitio activo de la macromolécula objetivo, por medio del análisis de la conformación y la orientación (denominadas en conjunto como la "pose"). [90]–[92].

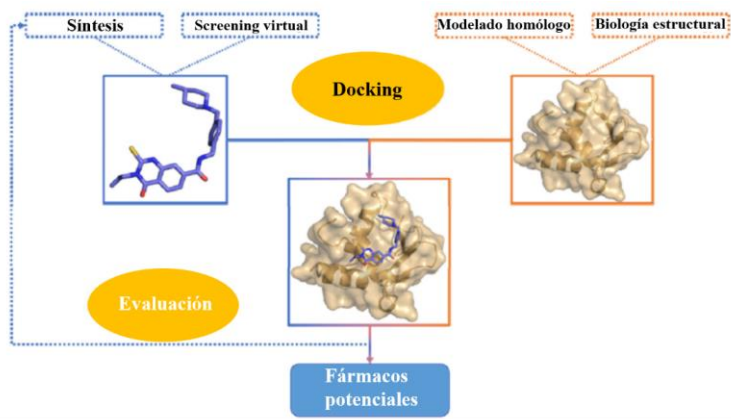


Figura 26. Resumen de un enfoque clásico de un análisis de acoplamiento molecular. Imagen adaptada. [88]–[90].

1.11.1 Estudios de docking molecular involucrados con el cáncer y patologías relacionados con la glándula tiroides.

Debido al incremento de casos de cáncer de tiroides a nivel mundial, la síntesis de nuevos agentes terapéuticos ha ido en aumento, habiendo cada día más investigaciones de candidatos a fármacos para tratar esta enfermedad. La publicación del equipo de Valarmathi DFT sobre la molécula de 1-amino-5-cloro-antraquinona (ACAQ) reportó, en el análisis de acoplamiento molecular, que la molécula ACAQ inhibe la acción de la proteína c-Met quinasa, que está asociada con el cáncer de tiroides, allanando el camino para el desarrollo de nuevos fármacos en el tratamiento del cáncer de tiroides [1].

Por otro lado, un ensayo multiómico para elucidar los biomarcadores involucrado en el PTC aplicó simulaciones de reposicionamiento de fármacos y acoplamiento molecular revelando que 5 fármacos (proclorperazina, meclizina, rottlerina, cefalina y tretinoína) pueden ser útiles en el tratamiento del PTC [53]. Aunado al anterior artículo citado, en el estudio de Sa y colaboradores, se demostró que un lector de m6A, IGF2BP2, estaba anormalmente regulado al alza y la señalización de ERBB se activó específicamente en células PTC con resistencia adquirida a selumetinib, un inhibidor de MEK del cáncer de tiroides diferenciado refractario al yodo radiactivo. Mecánicamente, IGF2BP2 promovió la expresión de la proteína ERBB2 al reconocer los sitios de metilación de m6A del mRNA-CDS de ERBB2, que moduló positivamente la eficiencia de traducción de ERBB2 y exacerbó la activación constitutiva de las vías de señalización involucradas en el proceso de dediferenciación de PTC [15].

Por su parte, para combatir otros subtipos de cáncer de tiroides, como el ATC, se ha evaluado la actividad terapéutica potencial de nuevos taxoides en células ATC; usando ensayos de

polimerización de tubulina y análisis de acoplamiento molecular. Se encontró que los taxoides DFV promovieron una polimerización más rápida de β -tubulina que paclitaxel, un fármaco quimioterapéutico muy empleado para tratar el cáncer de tiroides [25].

1.11.2 Estudios de docking molecular con la proteína BRAF^{V600E}.

Se han probado diversas moléculas con propiedades anticancerígenas para inhibir a BRAF^{V600E}. Por poner algunos ejemplos, en el protocolo de Ui-Haq y colaboradores se realizó una simulación de acoplamiento molecular y QSAR 3D para evaluar las interacciones del ligando dentro de los sitios activos de BRAF^{V600E}. Se seleccionaron de la literatura tres conjuntos de datos diferentes de diferentes estructuras centrales y la nueva serie seleccionada de compuestos exhibió una mayor potencia inhibidora como antagonistas de BRAF^{V600E} en comparación con los compuestos informados en otros estudios *in silico* [93]. En la Figura 27 se exhiben las imágenes del estudio de docking del estudio previamente citado, con BRAF^{V600E}.

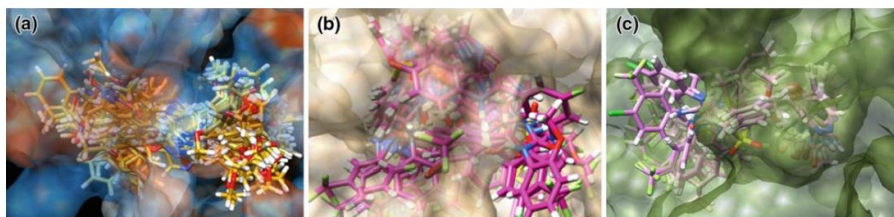


Figura 27. Alineación de los compuestos a, b y c respectivamente, en el sitio activo de BRAF^{V600E} en un estudio de docking molecular [93].

La 4H6TP es un tipo de deshidrochalcona, una especie de derivado flavonoide, el cual es reconocido principalmente por sus propiedades anticancerígenas, antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias; además, estudios recientes han indicado que el 4H6TP juega un papel importante al poseer potentes efectos anticancerígenos a través de varias vías de señalización molecular. En un artículo de Govindammal, et al., de docking molecular se determinó la naturaleza inhibidora de la molécula 4H6TP se muestra por los resultados de acoplamiento molecular que es contra la proteína mutante Braf que puede actuar como un posible fármaco para agentes anti-NSCLC con una energía de unión más baja de - 7.39 kcal / mol [48].

En adición, otro ejemplo de síntesis de inhibidores de Braf mutante es la síntesis varios 4-acetamidoalquilpirazoles nuevos para su evaluación como posibles inhibidores de COX-2 y BRAF mediante estudios de acoplamiento molecular, consiguiendo productos con la potencia de los efectos inhibidores de Braf y COX-2 con una mayor afinidad de unión a la primera de ellas que a la proteína COX-2 [94].

1.11.3 Estudios de docking molecular con esteroides con la proteína BRAF^{V600E}.

En resumen, se diseñó, preparó y probaron una serie de nuevos inhibidores de BRAF que contienen un núcleo de 4,5-dihidropirazol, para determinar su actividad inhibidora contra BRAF. Los resultados mostraron que estos compuestos poseían una potente actividad antiproliferativa contra la línea celular de melanoma humano BRAF y WM266.4, con valores inhibidores de IC₅₀ y GI₅₀ en un rango micromolar bajo. El modelo QSAR también se construyó con los datos de actividad y las conformaciones de unión para proporcionar una herramienta confiable para el diseño racional de nuevos inhibidores BRAF [49]. En la Figura 28 se colocó la ruta de síntesis orgánica de los compuestos 1–35, donde los reactivos y condiciones en la fase, para a) fueron EtOH; en la b) NH₂-NH₂-H₂O, EtOH y reflujo; mientras que en la parte c) se empleó EDC-HCl, Cl₂H₂ y reflujo [49].

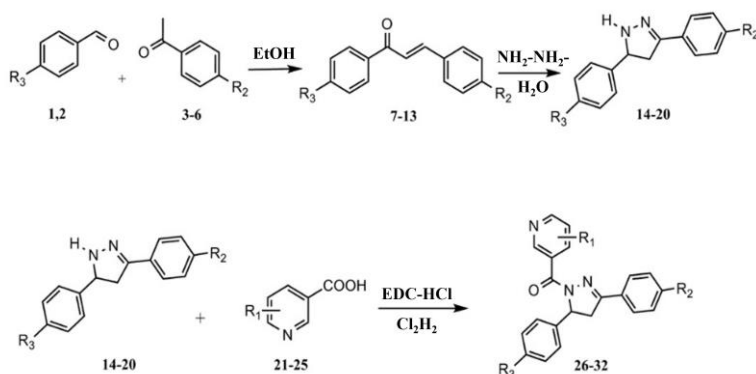


Figura 28. Síntesis de los compuestos pirazólicos probados en BRAF^{V600E}[49].

Comentado [ACC2]: Agregar las estructuras que se analizaron en esta referencia

Comentado [ACC3]: Agregar las estructuras que se analizaron en esta referencia

Comentado [ACC4]: Agregar las estructuras que se analizaron en esta referencia

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar si el efecto *in silico de* compuestos de aminoésteres esteroideos presentan un potencial poder inhibitorio con la proteína BRAF^{V600E} relacionada con el cáncer de tiroides.

2.2 Objetivos particulares

- I. Diseñar moléculas formadas a partir de la estructura de 5, familias esteroideas (familia piránica, furostánica, colestánica, espirostánica y bisnorlactónica) y de los 20 aminoácidos.
- II. Analizar, por medio de un estudio de docking molecular, la energía de afinidad, así como los principales residuos y los tipos de interacciones que se estén formando, de cada molécula diseñada contra la proteína BRAF^{V600E}.
- III. Desarrollar un estudio de farmacocinética, mediante un análisis ADME, con las moléculas que hayan presentado los mejores resultados en su energía de acoplamiento con BRAF^{V600E}.

3 METODOLOGÍA

La metodología que se asumió para desarrollar el estudio *in silico* en que se sustenta esta tesis es la siguiente:

1. Diseño de aminoésteres esteroideos de 5 familias distintas (bisorlactónica, colestánica, espirostánica, furostánica y píranica) en ChemDraw.
2. Búsqueda en la literatura sobre las principales oncogenes y proteínas relacionadas con el cáncer de tiroides, hasta la selección de la proteína BRAF^{V600E}.
3. Selección de una estructura cristalográfica en el Protein Data Bank (PDB) perteneciente a la proteína elegida para el estudio *in silico*: el cristal de BRAF^{V600E}, verificando su estructura terciaria y ligandos endógenos.
4. Verificación de las estructuras químicas de los fármacos inhibidores de BRAF^{V600E} mayormente estudiados y/o aplicados en la quimioterapia contra el cáncer de tiroides, eligiendo 5 inhibidores para tomarlos como referencia (vemurafenib, sorafenib, dabrafenib, XL281 y una oxima pirazólica) para los estudios consiguientes.
5. Preparación de la macromolécula y ligandos para su análisis en AutoDock Vina y CB-Dock; además de aplicar otros softwares de modelamiento molecular como Chem 3D y Quimera para reducir la energía conformacional de las moléculas y obtener las salidas en formatos .pdb, .mol2 y .pdbqt.
6. Obtención de las respectivas energías de afinidad por medio de un estudio de docking molecular en Autodock Vina de los compuestos diseñados, así como el de los fármacos de referencia, empleando 10 repeticiones por molécula.
7. Análisis de los valores energéticos otorgados por Vina elaborando diagramas de energía de afinidad por familia.
8. Estudio estadístico de ANOVA de una vía y de Tukey de todo el conjunto de datos.
9. Análisis comparativo de los resultados del docking molecular entre Vina y CB-Dock, tomando de referencia los inhibidores elegidos.
10. Diseño de las curvas ROC con el cálculo de sensibilidad y especificidad para cada conjunto de moléculas, al igual el AUC de cada curva para validar los test.
11. Prueba de interacción entre las mejores moléculas consideradas y los residuos aminoacídicos más relevantes de BRAF^{V600E} mediante el programa Discovery Studio.
12. Comprobación de las características fisicoquímicas y farmacocinéticas de los mejores compuestos seleccionados por medio de la plataforma SwissADME.

4 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos se dividieron en 5 grupos:

- **Energéticos**, en donde se evaluó la energía de acoplamiento de cada molécula con BRAF^{V600E}.
- **Estadísticos**, comparando los valores reportados para estimar los mejores grupos y moléculas.
- **Curvas ROC**, mostrando un análisis comparativo con la energía de afinidad con la plataforma CB-Dock.
- **Interaccionales**, en los cuales se analizaron las principales interacciones de los mejores compuestos con los residuos de la proteína diana.
- **ADME**, comprobando las características físicoquímicas, biológicas y farmacocinéticas, principalmente, de las moléculas candidatas para su uso como fármacos suministrados por vía oral.

En la Figura 29, se muestra el diagrama general de las moléculas utilizadas en este estudio *in silico*. Para esto, se diseñaron 105 moléculas en ChemDraw, un programa para el dibujo de moléculas, tomando como base 5 estructuras esteroidales, reconocidas por formar 5 diferentes familias dentro de las sapogeninas: (1) Bisnorlactona, (2) colestano, (3) espirostando, (4) furostando y (5) pirano. Los esqueletos de los 5 esteroides previamente descritos fueron enlazados con cada uno de los 20 aminoácidos a través del grupo hidroxilo en C3, formando más de una centena de bioconjugados para su posterior evaluación bioinformática, para su estudio a niveles energéticos, interaccional y de sus propiedades ADMET.

4.1 Resultados de energía de acoplamiento.

El primer estudio realizado consistió desarrollar un análisis de docking molecular de los más de 100 agentes inhibidores presentados anteriormente con la proteína diana. Se seleccionó la estructura cristalina **5JT2** [95], la cual pertenece a la proteína mutada BRAF^{V600E} formando un complejo con la Vem-BisAmida-2, un compuesto que contiene dos moléculas de vemurafenib conectadas por un enlazador bis amida. En la investigación se demostró que Vem-BisAmida-2 tiene una potencia inhibidora comparable como vemurafenib a BRAF^{V600E} tanto *in vitro* como en células, pero promueve un BRAF^{V600E} dimerico incapaz de someterse a transactivación [96].

El acoplamiento molecular de cada de molécula se llevó a cabo en software Autodock Vina [90], en donde el sitio de interacción de este inhibidor probado experimentalmente se tomó como punto de referencia para ubicar los compuestos probados en el análisis de afinidad, además de que con ayuda de la herramienta de “Grid Box” en Vina se fijaron la coordenadas para interaccionar directamente con el sitio activo de Braf. Los resultados sobre el docking molecular aparecen en los siguientes subtemas.

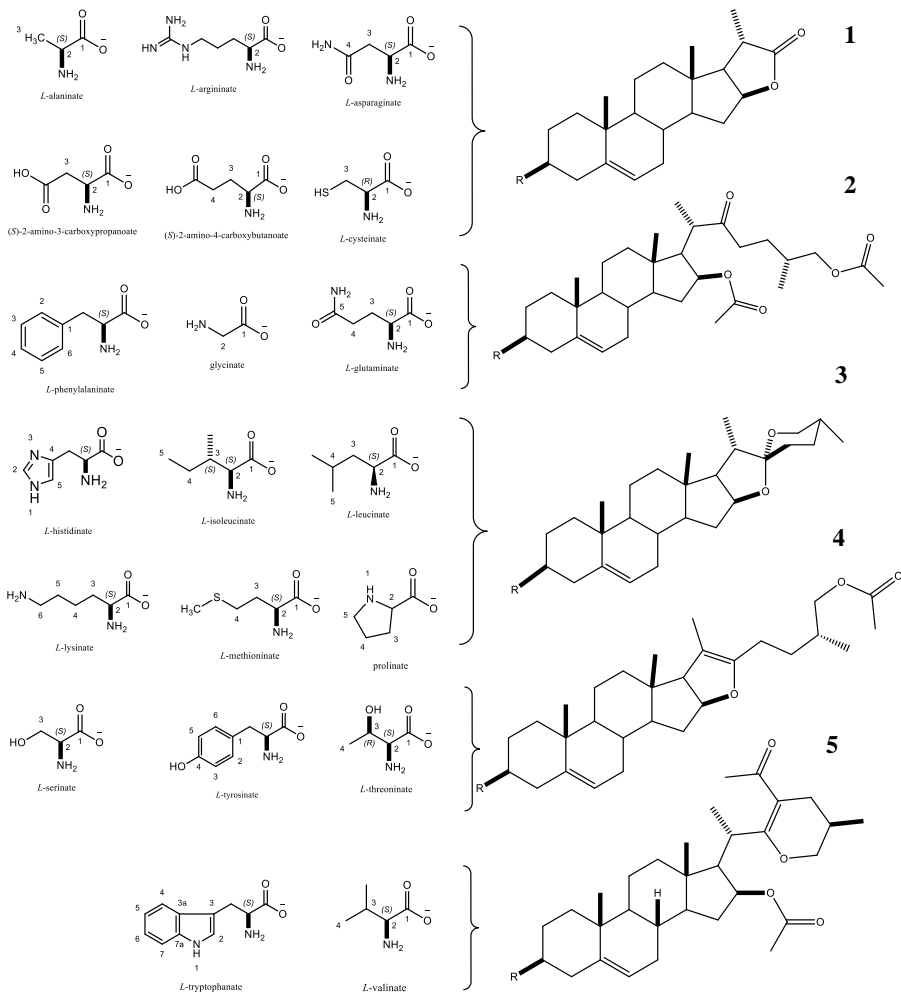


Figura 29. Diagrama de las moléculas diseñadas para el estudio in silico.

4.1.1 Familia colestánica

Los resultados de energía de afinidad para esta familia mostraron ser en su mayoría bajos, estando la mayoría entre -6.5 y -7.5 kcal/mol, en donde los valores más altos fueron para el **C-Tyr** y **C-Trp** con -8.5 kcal/mol para ambos casos, así como el **C-Phe**, con -8.7 kcal/mol, siendo esta molécula la más elevada en su energía de acoplamiento. Como se observa en el diagrama, estos dos compuestos no consiguieron alcanzar al I-XL2, el cual es el fármaco de referencia con la energía libre de Gibbs (ΔG°) más baja (Gráfico 3). La gráfica demuestra las

energías de afinidad obtenidas en AutoDock Vina para inhibidores (barras verdes) y los aminoésteres colestánicos evaluados (barras anaranjadas) con la proteína BRAF^{V600E} (5JT2) [95]. Las líneas verticales son una referencia del valor energético de los fármacos I-XL2, I-Dra e I-Vem. Estas líneas de referencia se mantuvieron en los diagramas de todas las familias.

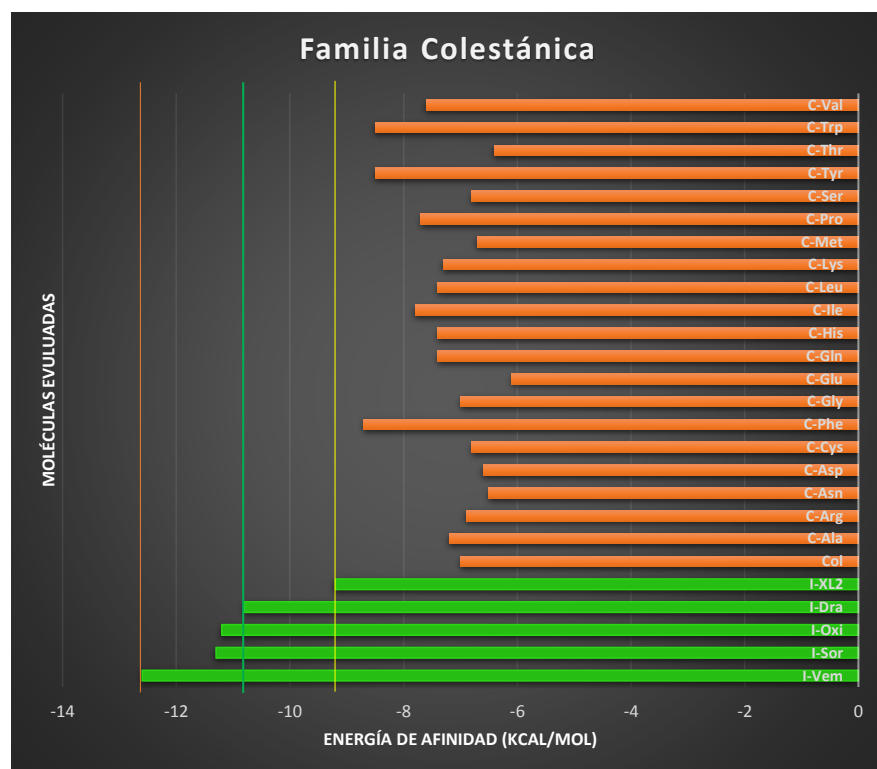


Gráfico 3. Diagrama energético de la familia colestánica.

4.1.2 Familia espiroestánica

La familia espiroestánica obtuvo valores de afinidad más altos a comparación de los aminoésteres colestánicos, con resultados que oscilan entre -8 y -9 kcal/mol, sobresaliendo 4 moléculas con alta energía: la *E-His* y la *E-Pro*, con **-9.4 kcal/mol**; y la *E-Tyr* y *E-Trp*, con **-10.1 kcal/mol** para ambas. También es de trascendencia que estos 4 compuestos superaron al inhibidor I-XL2, habiendo una mayor diferencia entre los esteroides de tirosina y triptófano. En el Gráfico 4 se indican las energías de afinidad obtenidas en AutoDock Vina para inhibidores (barras anaranjadas) y los aminoésteres espiroestánicos evaluados (barras amarillas) con la proteína BRAF^{V600E} (5JT2) [95].

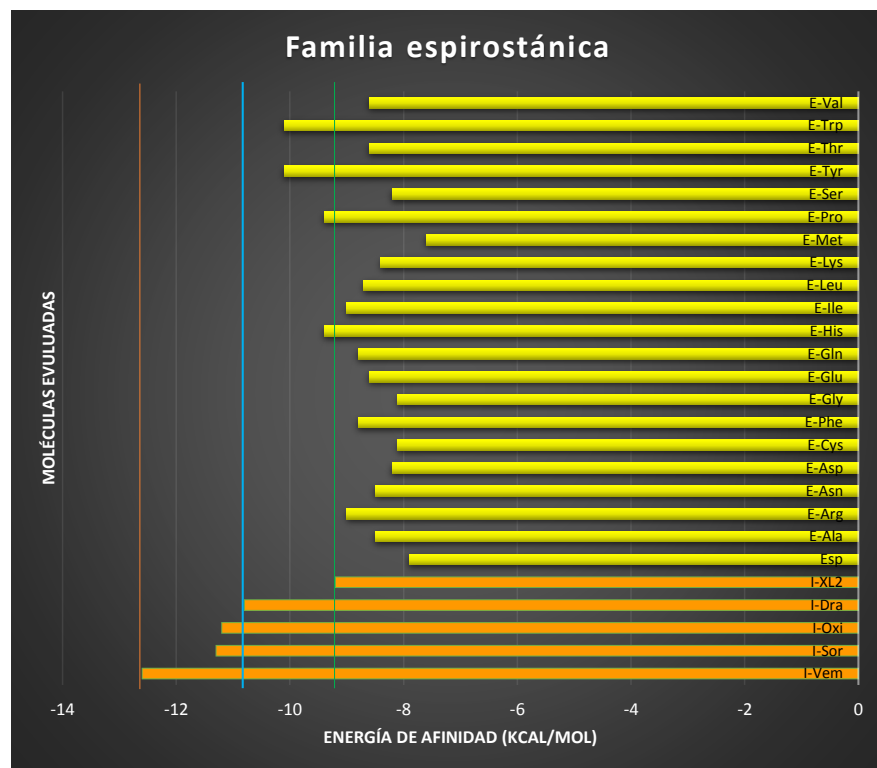


Gráfico 4. Diagrama energético de la familia espirostánica.

4.1.3 Familia furostánica

Esta familia esteroidal también consiguió valores energéticos favorables, estando prácticamente todos los compuestos por debajo -8.0 Kcal/mol. En la gráfica se observa cómo hay nuevamente 4 moléculas que sobrepasan al I-XL2: *Fur* (-9.4 kcal/mol), el cual es destacable mencionar que este compuesto es únicamente un furostano sin ningún aminoácido enlazado; *F-Phe* (-9.3 kcal/mol), *F-Tyr* (-9.4 kcal/mol) y *F-Trp* (-10.1 kcal/mol), repitiéndose el mismo valor para esta última molécula en la familia espirostánica (Gráfica 5). Este diagrama de afinidad presenta los valores energéticos obtenidos en AutoDock Vina para los fármacos (barras rojas) y los aminoésteres furostánicos evaluados (barras azules) con la proteína BRAF^{V600E} (5JT2) [95]. Se mantuvieron las líneas de referencia del valor energético de los fármacos I-XL2, I-Dra e I-Vem.

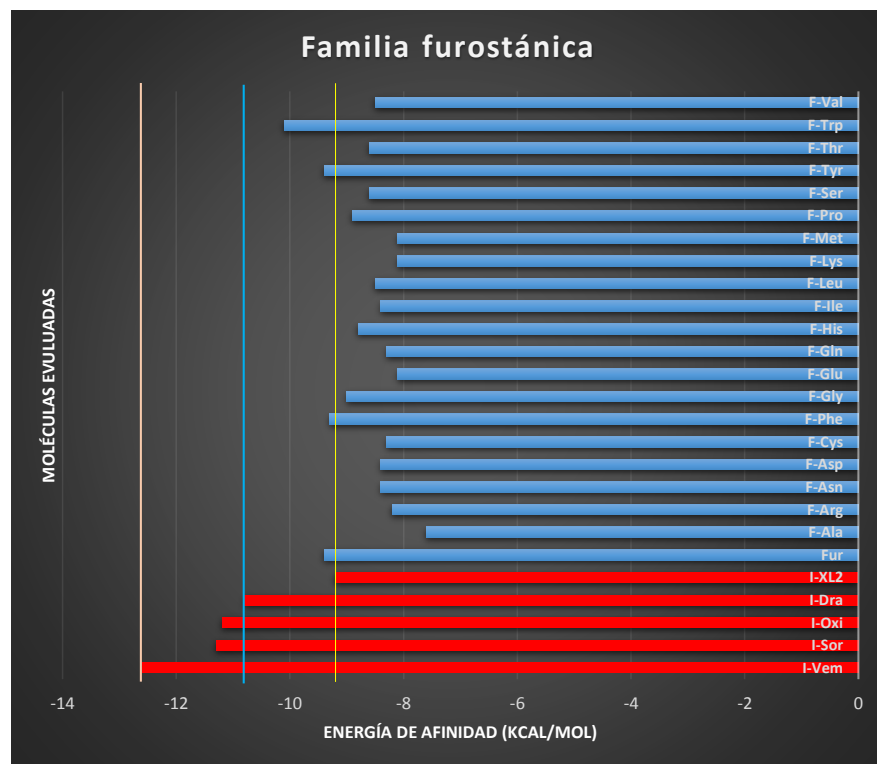


Gráfico 5. Diagrama energético de la familia furostánica.

4.1.4 Familia piránica

Se reportaron resultados un poco más bajos para estos aminoésteres piránicos a comparación de las dos últimas familias, pero en general superiores a los del grupo de los colestanos. Aun así, se estimaron 3 energías de afinidad superiores al I-XL2, descritas a continuación: ***P-Tyr*** y ***P-Trp***, ambos con un valor de ***-9.3 kcal/mol***; y la ***P-Phe***, con ***-9.6 kcal/mol***, siendo este último el más alto para esta familia (Gráfico 6). En el diagrama energético de los aminoésteres piránicos se reflejan las energías de afinidad otorgadas por AutoDock Vina para los antagonistas de referencia (barras anaranjadas) y los compuestos piránicos evaluados (barras azules) con la proteína BRAF^{V600E} (5JT2) [95].

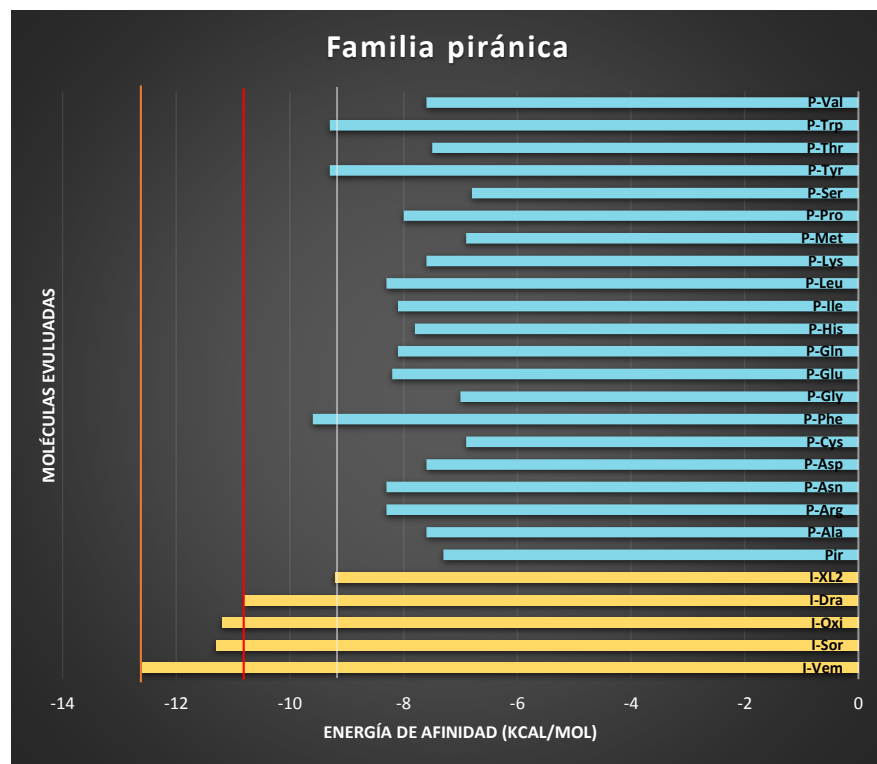


Gráfico 6. Diagrama energético de la familia piránica.

4.1.5 Familia bisnorlactónica

Algunos compuestos esteroidales de esta familia resultaron ser de los más altos en general para todas las moléculas evaluadas en este estudio, notándose buenos valores, mayores a -8 Kcal/mol en su mayoría. Los aminoésteres **B.Tyr**, **B-Phe** y **B-Trp**, con energías de afinidad de **-9.4**, **-9.6** y **-10.9 kcal/mol** respectivamente, fueron los valores más sobresalientes de este grupo, superando al fármaco de referencia I-XL2, y en el caso de **B-Trp**, al mismo tiempo, rebasó a I-Dra, el cual obtuvo un -10.8 Kcal/mol de afinidad con BRAF^{V600E}, por una décima, colocándolo como un candidato directo para la síntesis orgánica. Para finalizar con la Gráfica 7, se exhiben los valores energéticos obtenidos en AutoDock Vina para inhibidores (barras moradas) y los aminoésteres bisnorlactónicos probados (barras verdes) con la proteína BRAF^{V600E} (5JT2) [95].

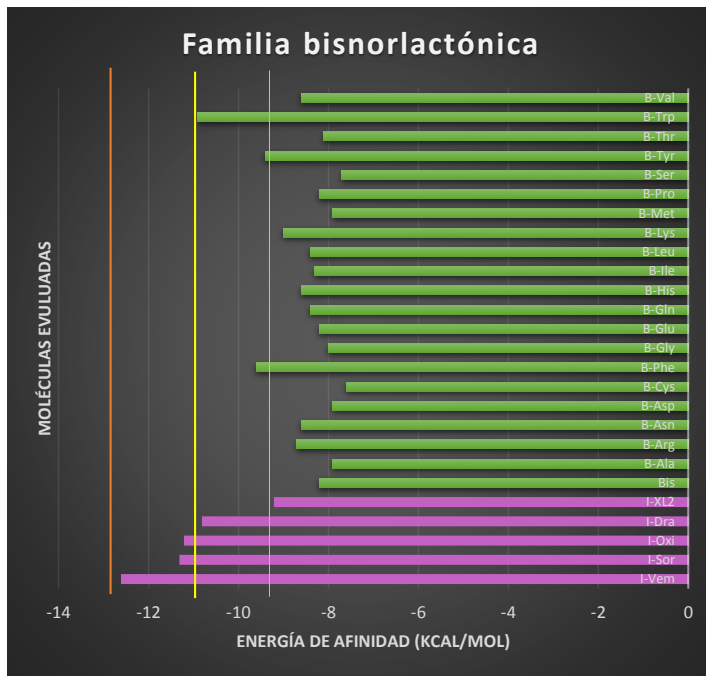


Gráfico 7. Diagrama energético de la familia bisnorlactónica.

4.2 Análisis estadístico.

Para esta parte del estudio se desarrolló un análisis de estadístico de las 105 moléculas diseñadas para el proyecto, en donde se clasificaron para todos los compuestos en relación con la familia esterooidal perteneciente, el aminoácido que estaba enlazado al respectivo esqueleto esterooidal y su clase química, teniendo una variable independiente (energía de afinidad) y las 3 variables dependientes brevemente mencionadas. Primero se evaluó la distribución de los datos, en torno a sus valores energéticos, para determinar con que prueba estadística se iban a analizar los resultados. Finalmente, se empleó un test de normalidad, un ANOVA de una vía para ser más específicos, para observar la tendencia que poseían las moléculas y así determinar qué tipo de aminoésteres y qué familias presentaban los mejores valores.

4.2.1 Prueba de normalidad.

Las pruebas para determinar la distribución normal de un conjunto de datos son de gran utilidad en los análisis estadísticos [97]. Existen múltiples métodos de normalidad, aunque el empleado en este estudio fue la prueba de Anderson-Darling, la cual compara la función de distribución acumulada empírica (ECDF) de los datos de la muestra con la distribución

esperada si los datos fueran normales. Por lo general, entre las pruebas que se basan en la función de distribución empírica, esta prueba tiende a ser más efectiva para detectar desviaciones en las colas de la distribución [98], [99].

Para esta primera parte, se realizó una prueba de Anderson-Darling para estimar si las moléculas esteroidales (N=105) presentaban una distribución normal, tomando como referencia las energías de afinidad de cada compuesto. Si el nivel de significancia, denotada por el valor p, es mayor a 0.05 en este caso, la decisión es que no se puede rechazar la hipótesis nula, ya que no hay suficiente evidencia para concluir que los datos no siguen una distribución normal. Se determinó que los datos tuvieron un valor de p superior a 0.05 ($p=0.126$) por lo cual presentan una normalidad, además de tener un promedio de -8.2 kcal/mol, como se observa en el Gráfico 8.

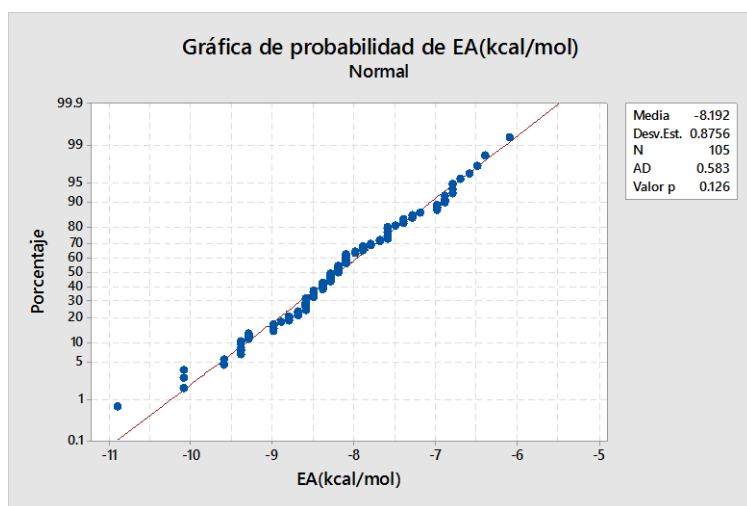


Gráfico 8. Prueba de normalidad de Anderson-Darling de los valores de energía de afinidad de las 105 moléculas evaluadas.

Ya comprobada la normalidad de los datos, se llevó a cabo un análisis de ANOVA comparando las medias y varianzas de los valores de energía de afinidad en tres grupos de análisis: Familia esteroidea a la que pertenecían los compuestos, el tipo de aminoácido y el aminoácido como tal que estaban ligados a los esqueletos de los esteroides. Hablando un poco sobre la prueba de ANOVA, es un conjunto de técnicas estadísticas de gran utilidad y ductilidad. Es útil cuando hay más de dos grupos que necesitan ser comparados, cuando hay mediciones repetidas en más de dos ocasiones, cuando los sujetos pueden variar en una o más características que afectan el resultado y se necesita ajustar su efecto o cuando se desea analizar simultáneamente el efecto de dos o más tratamientos diferentes. Específicamente, se aplicó el análisis de ANOVA de una vía o factor, que se emplea cuando existe una sola variable independiente para clasificar a los sujetos y dos o más niveles (que definen los

grupos) de ella. [100]. Por otro lado, también dentro de este estudio estadístico, también se evaluaron los resultados con la prueba de Tukey. Este método de evaluación de medias entre grupos de estudio se caracteriza por la ventaja de mantener el nivel del error tipo I (es decir, encontrar una diferencia cuando no existe) igual al nivel alfa elegido (por ejemplo, $\alpha = .05$ o $\alpha = .01$); una ventaja adicional de la prueba de Tukey es permitir el cálculo de intervalos de confianza para las diferencias entre las medias [101].

4.2.2 Energía de afinidad vs Familia

Primero se realizó un análisis de varianza contemplando como *hipótesis nula* que “todas las medias de las 5 familias son iguales”; mientras que la *hipótesis alterna* afirmaba que “no todas las medias son iguales”, y teniendo un nivel de significancia de 0.05 (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de varianza por familias

Análisis de varianza por familias					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Familia	4	31.18	7.7940	16.05	0.000
Error	100	48.56	0.4856		
Total	104	79.73			

*GL, grados de libertad; SC Ajust., suma de cuadrados ajustada; MC Ajust., cuadrados medios ajustados.

Si el valor p es menor que o igual al nivel de significancia, se puede rechazar la hipótesis nula y se concluye que no todas las medias de población son iguales [102]. El valor p registrado en la tabla es menor a 0.05, por lo que existe la evidencia suficiente para afirmar que, por lo menos, una media entre las familias es distinta. Igualmente, se empleó un análisis de medias para cada familia (Tabla 4). Dentro de los datos registrados, la familia con una media más negativa (en otras palabras, la más sobresaliente) fue la espirostánica con -8.695, seguida por la furostánica (-8.619) y la más alta o la media mínima en su valor absoluto, fue la colestánica con una cifra de -7.252.

Tabla 4. Medias por familia.

Medias por familia.				
Familia*	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
B	21	-8.486	0.754	(-8.787, -8.184)
C	21	-7.252	0.704	(-7.554, -6.951)
E	21	-8.695	0.647	(-8.997, -8.394)
F	21	-8.619	0.572	(-8.921, -8.317)
P	21	-7.910	0.787	(-8.211, -7.608)

*B, familia bisnorlactónica; C, familia colestánica; E, familia espirostánica; F, familia furostánica; P, familia piránica.

Posteriormente, al aplicar el modelo estadístico de Tukey, se obtuvo la diferencia de medias que existen entre las familias estudiadas, con el objetivo de determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio (Tabla 5).

Tabla 5. Prueba simultánea de Tukey por familias

Prueba simultánea de Tukey por familias.					
Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
C - B	1.233	0.215	(0.636, 1.831)	5.74	0.00001
E - B	-0.210	0.215	(-0.807, 0.388)	-0.97	0.86615
F - B	-0.133	0.215	(-0.731, 0.464)	-0.62	0.97157
P - B	0.576	0.215	(-0.021, 1.174)	2.68	0.06427
E - C	-1.443	0.215	(-2.040, -0.845)	-6.71	0.00001
F - C	-1.367	0.215	(-1.964, -0.769)	-6.36	0.00001
P - C	-0.657	0.215	(-1.255, -0.060)	-3.06	0.02355
F - E	0.076	0.215	(-0.521, 0.674)	0.35	0.99657
P - E	0.786	0.215	(0.188, 1.383)	3.65	0.00373
P - F	0.710	0.215	(0.112, 1.307)	3.30	0.01150

*B, familia bisnorlactónica; C, familia colestánica; E, familia espirostánica; F, familia furostánica; P, familia piránica.

En la gráfica de IC's simultáneos de Tukey (Gráfica 9) se esquematizaron los resultados mostrados en la última tabla, donde se puede observar como las familias espirostánica, furostánica, piránica y bisnorlactónica presentan una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la familia colestánica, todas teniendo medias superiores que este último grupo de moléculas, ya que las medias de los aminoésteres piránicos también resultaron ser lo suficientemente diferentes a los compuestos furostánicos y espirostánicos, teniendo en promedio valores energéticos más inferiores que las moléculas de estas dos familias, observándose en las cifras de IC's 95% donde los únicos grupos que no involucran al 0 son los grupos de moléculas anteriormente mencionados, además de que los valores de p ajustada fueron menores a 0.05 para todas las comparaciones que involucraban a las

moléculas de la familia colestánica. Por otro lado, también se elaboró una gráfica de intervalos (Gráfico 10) donde igualmente se pueden observar las diferencias de medias entre las familias, donde la familia colestánica resultó ser significativamente distante a los demás grupos, a excepción de compuestos piránicos; a su vez, la familia piránica fue significativamente diferente a la furostánica y espirostánica. En base a esta primera parte del estudio ANOVA, se concluye que las moléculas de la familia espirostánica parece tener una mayor afinidad con la proteína diana al tener el promedio superior.

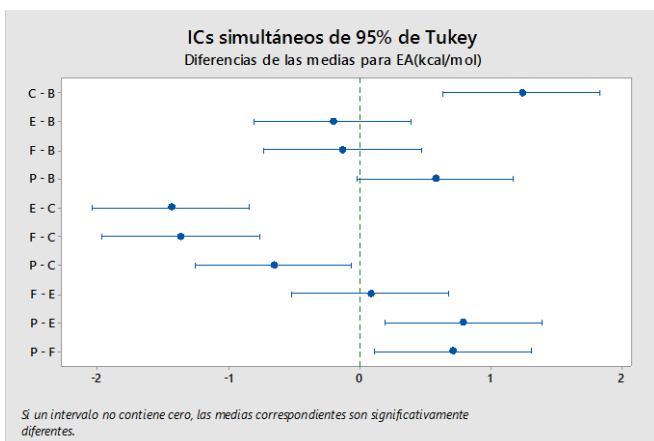


Gráfico 9. Gráfica de ICs simultáneos de 95% de Tukey de energía de afinidad (kcal/mol) vs familia.

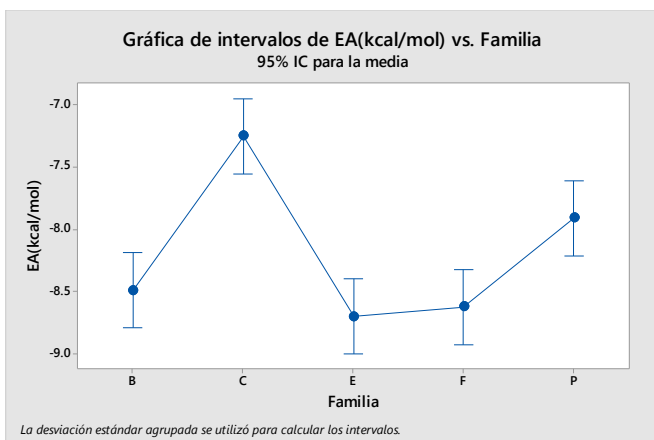


Gráfico 10. Gráfica de intervalos de energía de afinidad (kcal/mol) vs familia.

4.2.3 Energía de afinidad vs Tipo de aminoácido

Siguiendo los mismos parámetros en cuanto al establecimiento de la hipótesis nula, alternativa y valor de significancia anteriormente descritos con el análisis de familias esteroidales, se clasificaron a las moléculas estudiadas según sus propiedades químicas en 5 grupos: Ácidos, básicos, alifáticos, aromáticos y esteroides (aquellos que no tienen enlazados ningún aminoácido) para el análisis de varianza (Tabla 6) y medias (Tabla 7).

Tabla 6. Análisis de varianza por tipo de aminoácido.

Análisis de varianza por tipo de aminoácido.					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
CAA	4	6.789	1.6973	2.33	0.061
Error	100	72.945	0.7294		
Total	104	79.734			

*GL, grados de libertad; SC Ajust., suma de cuadrados ajustada; MC Ajust., cuadrados medios ajustados.

El valor p reportado en la tabla fue superior a 0.05, lo cual indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las moléculas agrupadas según el tipo de aminoácido.

Tabla 7. Medias por tipo de aminoácido.

Medias por tipo de aminoácido.				
CAA	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Ácido	25	-8.104	1.147	(-8.443, -7.765)
Alifático	35	-8.031	0.644	(-8.318, -7.745)
Aromático	15	-8.793	0.938	(-9.231, -8.356)
Básico	25	-8.192	0.691	(-8.531, -7.853)
Esteroides	5	-7.960	0.934	(-8.718, -7.202)

El análisis de medias demostró que el grupo de los *aromáticos* obtuvo la media más alta (la más negativa), con **-8.793**, seguido por los aminoésteres **básicos (-8.192)**; por otra parte, la clasificación de esteroide, con solo 5 compuestos, presentó la media más baja con un promedio de -7.960; y el grupo con la desviación estándar más elevada perteneció al grupo de los ácidos.

Pasando a la tabla de diferencia de medias de Tukey (Tabla 8), los valores de p ajustada reportaron cifras superiores a 0.05, lo que confirma el argumento anteriormente planteado, donde prácticamente todos, no son estadísticamente diferentes, a excepción de las moléculas

aromáticas y alifáticas con una p de 0.037, visto también en los intervalos de confianza, conteniendo todos el 0, excepto por el grupo anteriormente descrito.

Tabla 8. Prueba simultánea de Tukey por el tipo de aminoácido.

Prueba simultánea de Tukey por el tipo de aminoácido.					
Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Alifático - Ácido	0.073	0.224	(-0.549, 0.694)	0.32	0.998
Aromático - Ácido	-0.689	0.279	(-1.464, 0.086)	-2.47	0.106
Básico - Ácido	-0.088	0.242	(-0.759, 0.583)	-0.36	0.996
Esteroides - Ácido	0.144	0.418	(-1.019, 1.307)	0.34	0.997
Aromático - Alifático	-0.762	0.264	(-1.494, -0.029)	-2.89	0.037
Básico - Alifático	-0.161	0.224	(-0.782, 0.461)	-0.72	0.952
Esteroides - Alifático	0.071	0.408	(-1.063, 1.206)	0.17	1.000
Básico - Aromático	0.601	0.279	(-0.174, 1.376)	2.16	0.205
Esteroides - Aromático	0.833	0.441	(-0.392, 2.059)	1.89	0.330
Esteroides - Básico	0.232	0.418	(-0.931, 1.395)	0.55	0.981

En el Gráfico 11 de ICs simultáneos de Tukey, se ve claramente la información de la tabla, en donde el único intervalo de confianza que no toca el 0 (aunque se quedó bastante cerca) fue la de “Aromático-Alifático”; así como en la gráfica de intervalos donde es muy difícil percibir si existe alguna diferencia entre las medias de estos dos grupos, pues están muy cercanos. Por lo tanto, se puede concluir de este segmento que, aunque claro que hubo grupos con medias más altas que otros (por ejemplo los aminoácidos aromáticos), no existió una diferencia estadísticamente significativa entre los compuestos que tenían enlazados uno u otra clase de aminoácidos, pues las medias se mantuvieron bastante cercanas, en un rango de -8 y -8.5, por lo que podría fundamentarse que la naturaleza iónica de las moléculas influirán en menor medida para lograr una mayor afinidad con la proteína BRAF^{V600E} (Gráfico 12).

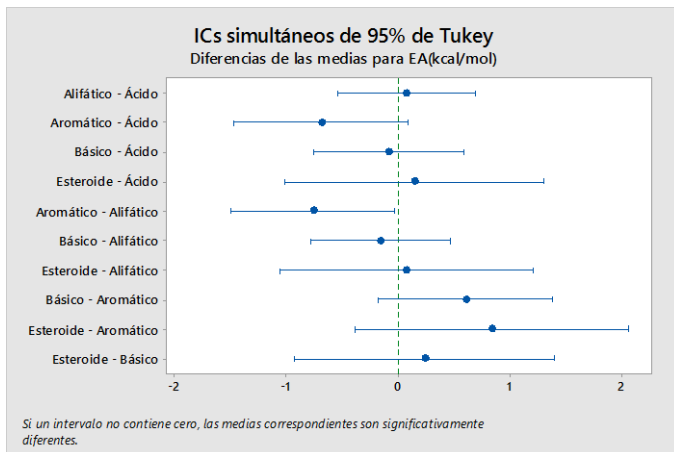


Gráfico 11. Gráfica de ICs simultáneos de 95% de Tukey de energía de afinidad (kcal/mol) vs tipo de aminoácido.

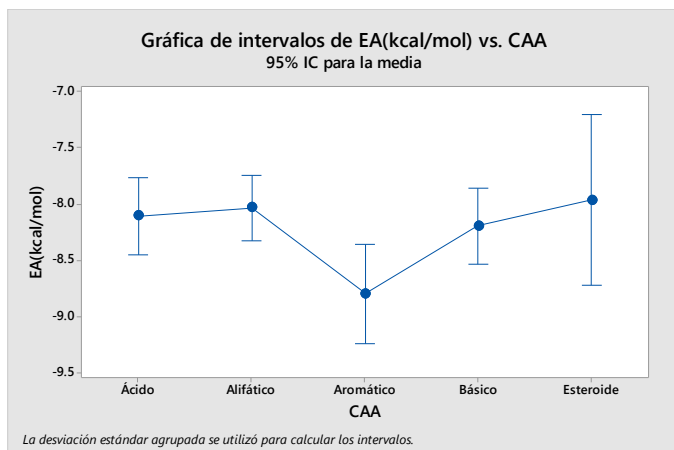


Gráfico 12. Gráfica de intervalos de energía de afinidad (kcal/mol) vs tipo de aminoácido.

4.2.4 Energía de afinidad vs Aminoácido

Para finalizar las pruebas ANOVA, se analizaron las moléculas diseñadas en relación con el aminoácido que estaba ligado a la estructura esteroidal, o en su defecto, si solo se encontraba el esteroide sin ningún agregado a su conformación nativa, estableciendo las dos anteriores hipótesis, nula y alternativa, ya explicadas anteriormente. En la Tabla 9 se describe el análisis de varianza de la clasificación de aminoácidos.

Tabla 9. Análisis de varianzas por aminoácido

Análisis de varianzas por aminoácido					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
AA	20	35.81	1.7903	3.42	0.000
Error	84	43.93	0.5230		
Total	104	79.73			

*GL, grados de libertad; SC Ajust., suma de cuadrados ajustada; MC Ajust., cuadrados medios ajustados.

El análisis de varianzas (Tabla 9) arrojó un valor de *p* menor que el nivel de significancia (0.05), siendo de hecho de 0, lo cual indica que existe una diferencia estadísticamente significativa en por lo menos 1 de los aminoácidos. Continuando con la evaluación de medias, notamos una referencia clara de que los aminoácidos con medias con los valores más negativas (más altas en valor absoluto) son la del **triptófano** (TRP), con **-9.780**, siendo esta la más elevada; seguida de la **tirosina** (TYR), con **-9.340**, y la **fenilalanina** (PHE), con un promedio de **-9.200**. En sentido contrario, la media absolutamente más baja fue la de la **metionina** con **-7.440**; además de que para esta prueba se agrupó a la bisnorlactona, colestano, espirostando, furostando y pirano como “esteroide”, obteniendo un valor de -7.960.

Tabla 10. Análisis de medias por aminoácido.

Análisis de medias por aminoácido.				
AA	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
ALA	5	-7.760	0.483	(-8.403, -7.117)
ARG	5	-8.220	0.804	(-8.863, -7.577)
ASN	5	-8.060	0.879	(-8.703, -7.417)
ASP	5	-7.740	0.706	(-8.383, -7.097)
CYS	5	-7.540	0.680	(-8.183, -6.897)
Esteroides	5	-7.960	0.934	(-8.603, -7.317)
GLN	5	-8.200	0.515	(-8.843, -7.557)
GLU	5	-7.840	0.991	(-8.483, -7.197)
GLY	5	-7.820	0.844	(-8.463, -7.177)
HIS	5	-8.400	0.800	(-9.043, -7.757)
ILE	5	-8.320	0.444	(-8.963, -7.677)
LEU	5	-8.260	0.503	(-8.903, -7.617)

LYS	5	-8.080	0.669	(-8.723, -7.437)
MET	5	-7.440	0.615	(-8.083, -6.797)
PHE	5	-9.200	0.430	(-9.843, -8.557)
PRO	5	-8.440	0.695	(-9.083, -7.797)
SER	5	-7.620	0.814	(-8.263, -6.977)
THR	5	-7.840	0.924	(-8.483, -7.197)
TRP	5	-9.780	0.912	(-10.423, -9.137)
TYR	5	-9.340	0.568	(-9.983, -8.697)
VAL	5	-8.180	0.531	(-8.823, -7.537)

Por último, la prueba simultánea de medias de Tukey (Tabla 11) tuvo un extenso análisis y número de datos, por lo que solo se reportaron los resultados más importantes, centrándose en aquellos que poseyeron una p ajustada menor a 0.05, en otras palabras, los grupos que demostraron una diferencia estadísticamente significativa. En la tabla es posible establecer una relación en la cual el triptófano está presente en la mayor parte de las comparaciones, seguido por la tirosina y la fenilalanina con 3 apariciones.

Tabla 11. Análisis de medias por aminoácido.

Prueba simultánea de Tukey por aminoácido.

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
TRP - ASN	-1.720	0.457	(-3.405, -0.035)	-3.76	0.040
TRP - ASP	-2.040	0.457	(-3.725, -0.355)	-4.46	0.004
TRP - CYS	-2.240	0.457	(-3.925, -0.555)	-4.90	0.001
TYR - CYS	-1.800	0.457	(-3.485, -0.115)	-3.94	0.024
TRP - Esteroide	-1.820	0.457	(-3.505, -0.135)	-3.98	0.021
TRP - GLU	-1.940	0.457	(-3.625, -0.255)	-4.24	0.009
TRP - GLY	-1.960	0.457	(-3.645, -0.275)	-4.29	0.008
TRP - LYS	-1.700	0.457	(-3.385, -0.015)	-3.72	0.046
PHE - MET	-1.760	0.457	(-3.445, -0.075)	-3.85	0.031
TRP - MET	-2.340	0.457	(-4.025, -0.655)	-5.12	0.000

TYR - MET	-1.900	0.457	(-3.585, -0.215)	-4.15	0.012
TRP - SER	-2.160	0.457	(-3.845, -0.475)	-4.72	0.002
TYR - SER	-1.720	0.457	(-3.405, -0.035)	-3.76	0.040
TRP - THR	-1.940	0.457	(-3.625, -0.255)	-4.24	0.009

Nuevamente, se elaboró la de intervalos (Gráfico 13), esquematizando los resultados previamente explicados en estos gráficos.

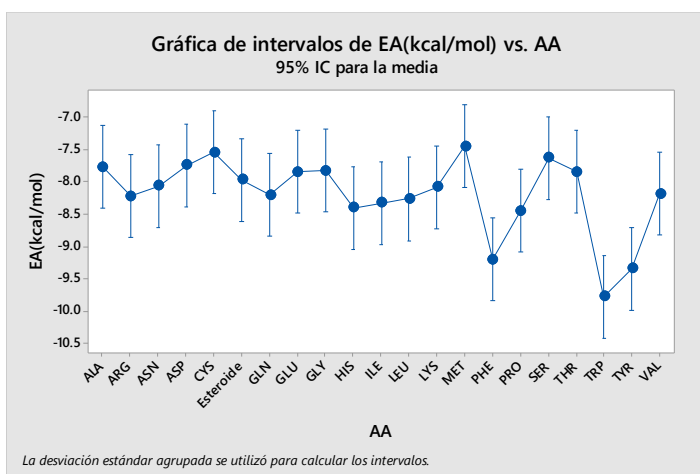


Gráfico 13. Gráfica de intervalos de energía de afinidad (kcal/mol) vs aminoácido.

4.3 Curvas ROC

La curva característica operativa del receptor (ROC por sus siglas en inglés) es una representación gráfica de la relación entre las tasas de falsos positivos y verdaderos positivos [103]. Para producir una curva ROC, primero se tabulan las sensibilidades y especificidades para diferentes valores de una medida de prueba continua [104]. Luego, la gráfica se construye evaluado el TPF (sensibilidad) en el eje Y, frente a FPF (1-especificidad) en el eje X, a través de distintos puntos de corte genera una curva en el cuadrado unitario. Una curva ROC situada en la línea diagonal refleja el rendimiento de una prueba de diagnóstico que no es mejor que el nivel de probabilidad, es decir, una prueba que arroja resultados positivos o negativos sin relación con el verdadero estado de la enfermedad [105].

El área bajo la curva (AUC) es una medida global de la capacidad de una prueba para discriminar si una condición específica está presente o no. Un AUC de 0.5 representa una

prueba sin capacidad de discriminación (es decir, no mejor que el azar), mientras que un AUC de 1.0 representa una prueba con discriminación perfecta. Aunado con esto, la exactitud se define como la proporción de decisiones correctas (es decir, verdadero positivo + verdadero negativo) sobre el número total de pruebas [105]. Se puede pensar que el AUC es un indicador de la "exactitud" general, y solo hay un valor de AUC para cada curva ROC. Por otro lado, la exactitud variará de un punto a otro a lo largo de la curva ROC, ya que existe una variación en la sensibilidad y la especificidad de un punto a otro [104].

Para este último análisis estadístico, se elaboraron 5 curvas ROC, una para cada familia, en donde se compararon los resultados energéticos obtenidos en Autodock Vina [90] y en CB-Dock [106] (anexo 1) de las 105 moléculas diseñadas, calculando los valores de especificidad, sensibilidad y exactitud a partir de la determinación de cantidad de verdaderos positivos (VP), verdaderos negativos (VN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (VP) registrados de cada compuesto al evaluar sus respectivas energías de afinidad de cada plataforma con la de los 5 fármacos de referencia. En los siguientes apartados se describen las curvas ROC desarrolladas.

4.3.1 Familia colestánica

Iniciando con los aminoésteres colestánicos, su curva ROC, para todos los inhibidores de referencia, tuvo un comportamiento totalmente lineal, debido a que sus valores de sensibilidad y especificidad fueron 0 y 1 respectivamente para todos los casos. La función del gráfico de $y=x$, por lo que esta curva tuvo un AUC de 0.5, es decir, el test resultó prácticamente azaroso (Gráfico 14).

4.3.2 Familia espiroestánica

La familia espiroestánica tuvo los mismos de resultados de TRP y FRP que el grupo de los colestanos a excepción del último fármaco, el XL281, el cual consiguió cifras de 0.75 y 0.06 (0.94 de especificidad) respectivamente. En cuanto a los valores de AUC para los primeros 4 inhibidores, al tener una función lineal como en la anterior familia, fueron de 0.5, siendo un test azaroso; en contraparte, la curva del XL281 logró un AUC de 0.70, categorizándose como un gráfico ROC regular (Gráfico 15). El comportamiento fue lineal para los fármacos, a excepción del XL281 que tuvo una función de $y=0.6417x + 0.3783$ (línea de tendencia del XL281 en verde). En la gráfica se nota que las curvas del vemurafenib, oxima, dabrafenib y sorafenib están superpuestas, solo notándose la de este último inhibidor.

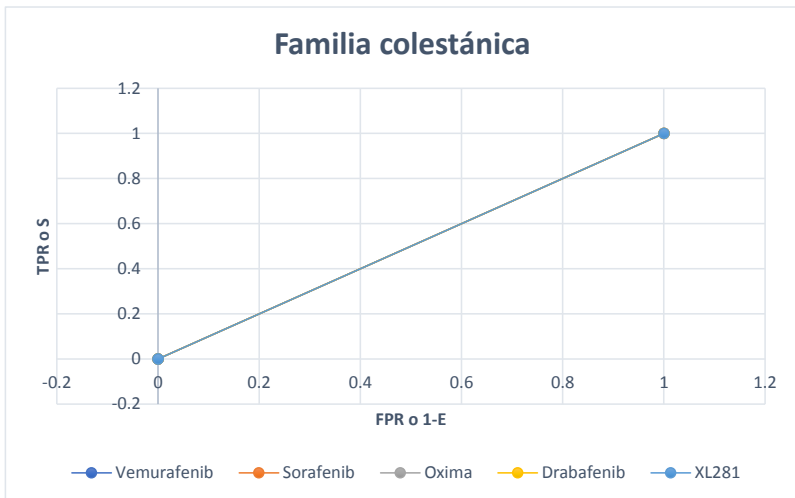


Gráfico 14. Curva ROC de la familia colestánica. Solo logra verse la curva del vemurafenib porque todas están superpuestas.

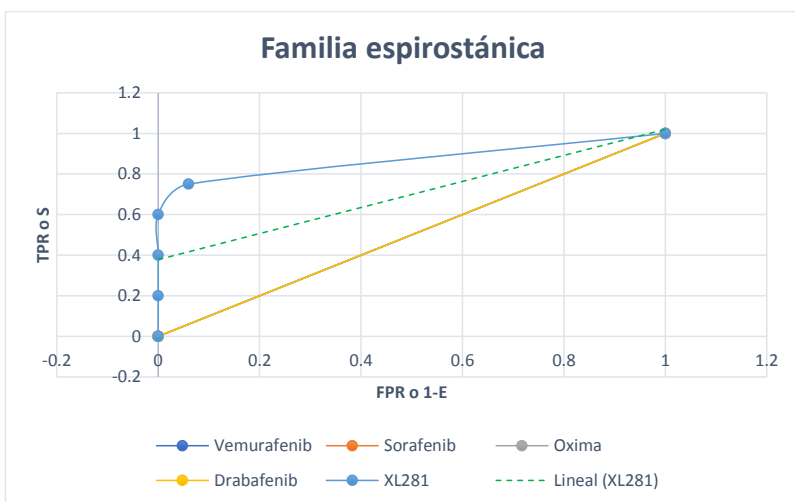


Gráfico 15. Curva ROC de la familia espirostánica.

4.3.3 Familia furostánica

Continuando con la familia furostánica, se observó un comportamiento bastante similar al de los aminoésteres espirostánicos, donde el único fármaco con una función no lineal fue el XL281, en este caso contando con valores de sensibilidad y especificidad de 1 y 0.88

respectivamente. El valor de AUC del XL281 fue de 0.8, considerándose un test bueno, mientras los otros 4 antagonistas permanecieron en 0.5. En el Gráfico 16 el XL281 tuvo una función de $y=0.4979x + 0.549$ (línea de tendencia del XL281 en verde), además de que las curvas del vemurafenib, oxima, dabrafenib y sorafenib estuvieron superpuestas, solo notándose la de este último inhibidor.

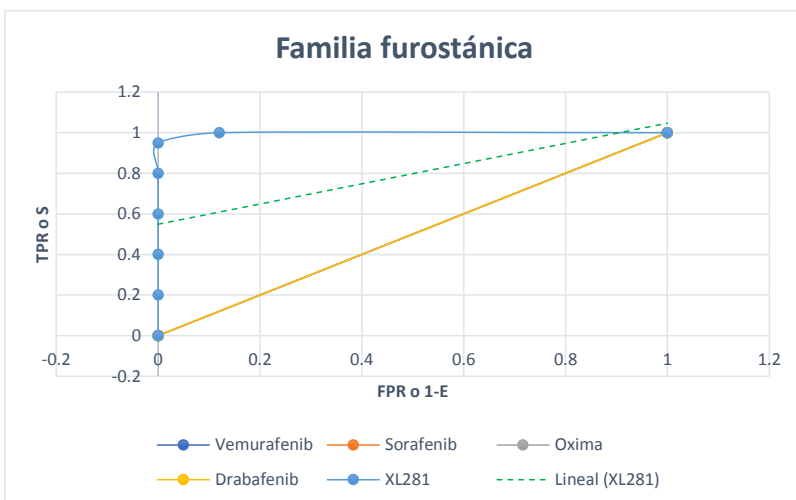


Gráfico 16. Curva ROC de la familia furostánica.

4.3.4 Familia piránica

Siguiendo con la tendencia establecida en las últimas 2 familias, el único grupo de compuestos piránicos que no poseyó una función enteramente lineal y, por ende, un AUC de 0.5, fue el perteneciente al XL281, reportándose valores de S y E de 1 en ambos parámetros. El AUC de este inhibidor fue de 0.78, siendo un test bueno (Gráfico 17). El XL281 obtuvo una función de $y=0.4429x + 0.54571$ (línea de tendencia del XL281 en rojo), y en adición, hubo una superposición en las curvas, solo logrando ver la del dabrafenib.

4.3.5 Familia bisnorlactónica

Para finalizar con los aminoésteres bisnorlactónicos, a diferencia de las pasadas familias, además del fármaco XL281 también el grupo del dabrafenib consiguió una función diferente a $y=x$ como los demás antagonistas. Este último fármaco obtuvo un valor de TRP y FRP de 0 y un AUC para esta gráfica de 0.75, siendo un test regular. Por otro lado, el XL281 los resultados de TRP Y FRP fueron de 0.059 y 0.667 respectivamente, con un AUC de 0.66, igualmente estimado como una prueba regular. El Gráfico 18 demuestra el comportamiento lineal para 3 fármacos: el vemurafenib, sorafenib y la oxima. A su vez, el XL281 tuvo una

función de $y=0.7161x + 0.3029$. (línea de tendencia del XL281 en rojo) y por parte del dabrafenib, la función de esta gráfica fue $y=0.5x + 0.5$.

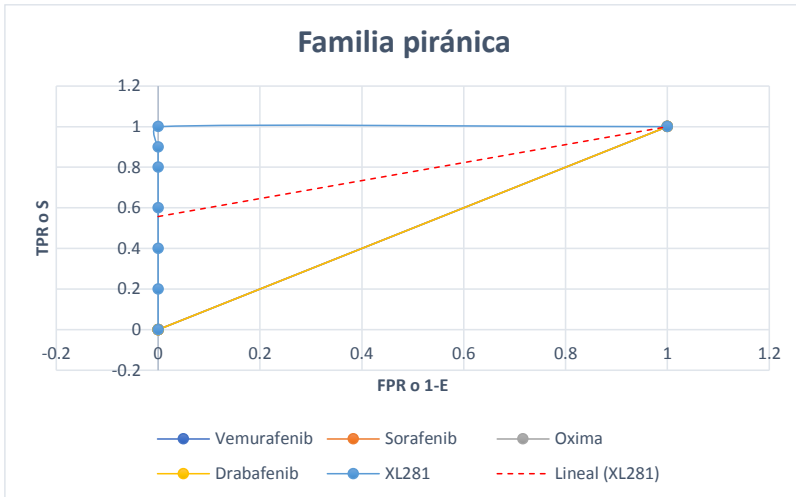


Gráfico 17. Curva ROC de la familia piránica.

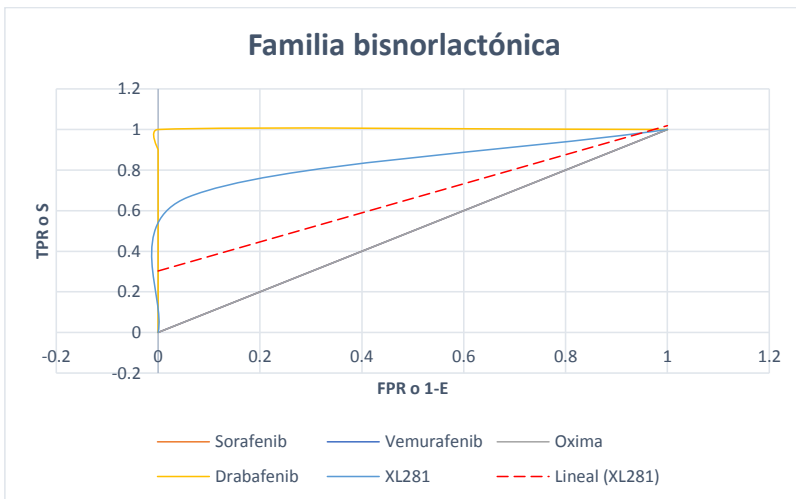


Gráfico 18. Curva ROC de la familia bisnorlactónica.

4.4 Resultados de interacciones.

En este apartado, se analizaron las interacciones que tendría la proteína diana (BRAF^{V600E}) con los mejores compuestos evaluados, es decir, aquellos que acorde con los resultados energéticos y estadísticos, demostraron tener valores de energía de afinidad superiores, centrándose en las familias esteroidales que sobresalieron por tener un promedio elevado, como la espirostánica, furostánica y bisnorlactónica, además de los antagonistas de referencia. Este análisis se realizó en el programa Discovery Studio [107], el cual permite observar qué residuos específicos de la proteína están formando una interacción con una molécula probada, otorgando información sobre el tipo de enlace químico que se está desarrollando. Es necesario mencionar que la mayoría de residuos responsables de interaccionar con los fármacos inhibidores (como el vemurafenib, sorafenib y dabrafenib) se ubican en el sitio catalítico de la proteína, conformado principalmente por el pocket de unión a ATP y adenina, así como la región bisagra, el bucle catalítico y el dominio DGF [93]. En los siguientes subtemas se presenta este análisis de residuos.

4.4.1 Fármacos

a) Vemurafenib

Comenzando con el vemurafenib (I-Vem), al ser una estructura modificada del fármaco (Vem-Bisamida-6), teniendo una variedad amplia de grupos funcionales, los residuos que presentan una probable interacción con el fármaco son muy numerosos, prevaleciendo las fuerzas de van der Waals (verde claro), seguidos por los puentes de hidrógeno (verde intenso) y los enlaces de tipo alquilo y/o Pi-alquilo (rosado tenue), además de otro tipo de interacciones. En la Figura 30, se observó que la mayor parte de las interacciones de hidrógeno se formaron con los H presentes en las aminas y amidas del I-Vem, así como con las cetonas y sulfóxidos que actuaban como aceptores. Por otro lado, las fuerzas de London, este tipo de interacciones débiles, se notaron con mayor presencia en los alrededores de los átomos de oxígeno y nitrógeno, los cuales poseen radios de van der Waals elevados, así como en los anillos fenílicos, donde también los enlaces alquílicos se establecen en las cadenas aromáticas del fármaco, siendo energéticamente más fuertes que los otros enlaces descritos.

b) Sorafenib

Pasando con el diagrama del sorafenib (I-Sor), el cual tiene una estructura menos voluminosa que el vemurafenib, posee un mucho menor número de interacciones de van der Waals, así como de puentes de hidrógeno; aunque al mismo tiempo, los enlaces alquilo están más presentes que en el pasado inhibidor (Figura 31).

De los 3 puentes de hidrógeno localizados, uno se formó en el grupo isocianato del inhibidor (parte de la izquierda de la molécula) y los otros 2 con los dos átomos de flúor (derecha); las fuerzas de London, aunque en menor número que el I-Vem, se encontraron cercanos a las nubes electrónicas de las aminas y cetonas; por último, los enlaces alquílicos se reflejaron en los metilos, los isopropilos y en los anillos fenílicos.

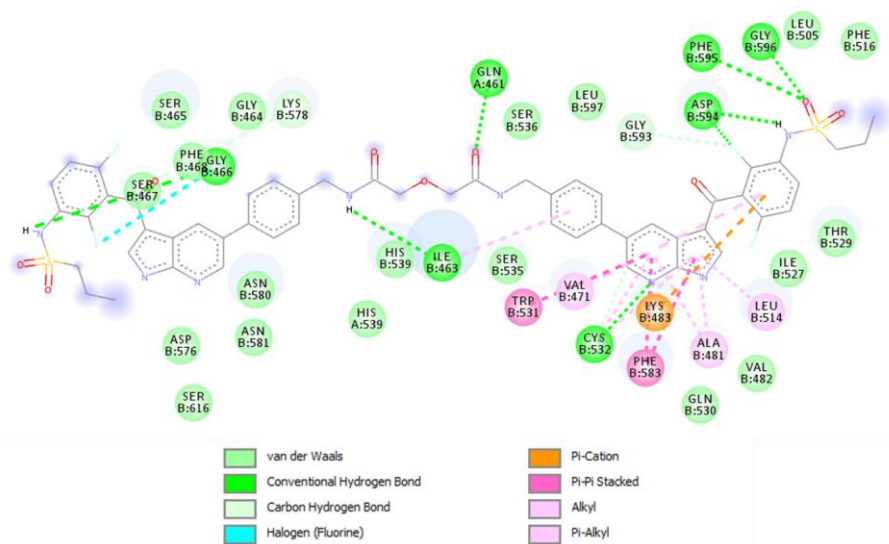


Figura 30. Diagrama de interacción de residuos del vemurafenib (I-Vem).

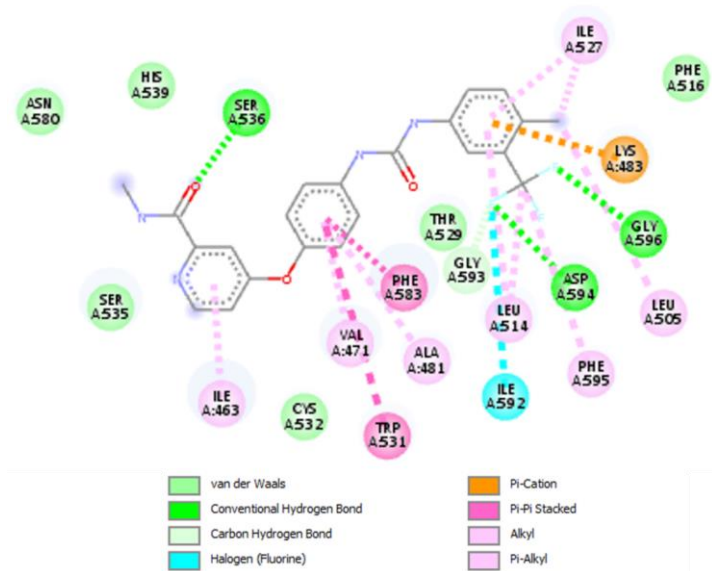


Figura 31. Diagrama de interacción de residuos del sorafenib (I-Sor).

e) Dabrafenib

En este inhibidor de referencia se observó una cantidad de interacciones de van der Waals y de puentes de hidrógeno muy similares a las del I-Sor, pero con menores enlaces de tipo de alquilo. Igualmente que con el I-Sor, solo hubieron 3 puentes de hidrógeno, dos generados por átomos donadores de H presentes en la amina primaria (izquierda) y el tercero formado con el F que actuó como aceptor del grupo tiol de la cisteína; por parte de las interacciones de van der Waals, se contemplaron varias de ellas alrededor de los anillos fenílicos, de la amina y del terbutilo; para finalizar los 3 residuos con enlaces de tipo alquilo se ubicaron en las mismas zonas que las fuerzas de London (Figura 32).

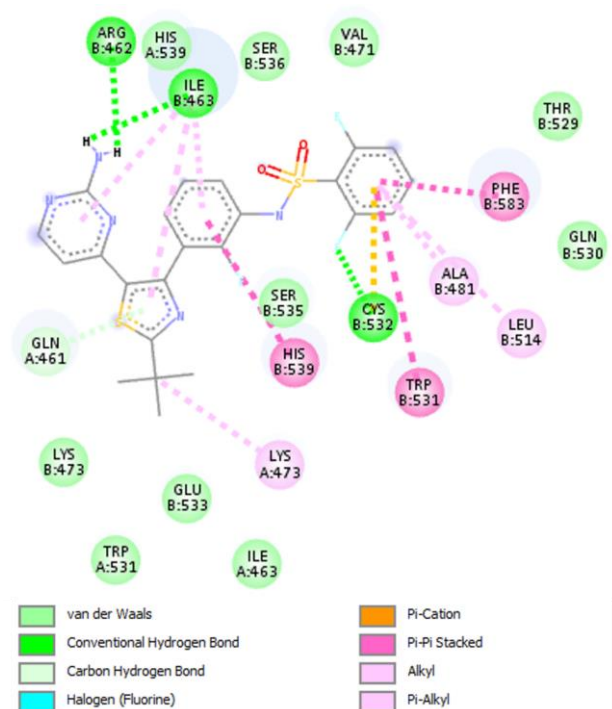


Figura 32. Diagrama de interacción de residuos del dabrafenib (I-Dra).

d) Oxima

Esta oxima solo presentó un enlace tipo de puente de hidrógeno, siendo las más predominantes de las fuerzas de van der Waals, al igual que algunas interacciones alquílicas. Solo apareció una interacción de hidrógeno en un grupo nitro, actuando como aceptor del H proveniente de algunos de los grupos amino de la lisina; al mismo tiempo, tanto las fuerzas de London como los enlaces alquílicos se encontraron muy próximos a los ciclopentenos y

ciclohexenos del antagonista, especialmente donde se localizaban átomos de nitrógeno y oxígeno (Figura 33).

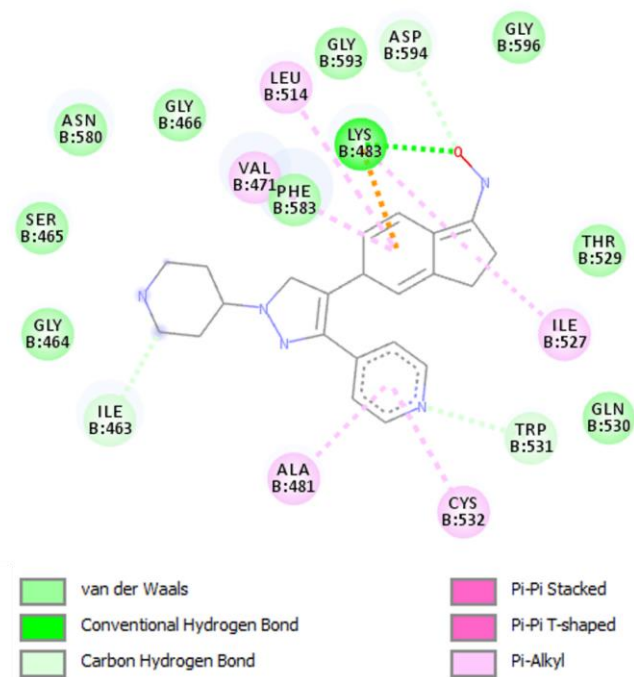


Figura 33. Diagrama de interacción de residuos de la oxima (I-Oxi).

e) XL281

En el caso de este último fármaco de referencia, la presencia de puentes de hidrógeno solo apareció en un residuo, al igual que en I-Oxi, con algunas interacciones de van der Waals y con un solo enlace tipo alquilo, incluyendo otro tipo de estas. Profundizando en las fuerzas físicas reportadas, la glutamina fue el residuo con el que se formó el puente de hidrógeno, interaccionando con una cetona que funge como un aceptor de H de alguno de los grupos aminos presentes en la glutamina; las fuerzas de van der Waals se ubicaron cercanos a los anillos fenílicos y a las cetonas; mientras que el enlace de alquilo que se estableció con la isoleucina se encontró cercano al grupo amino y bencenos (Figura 34).

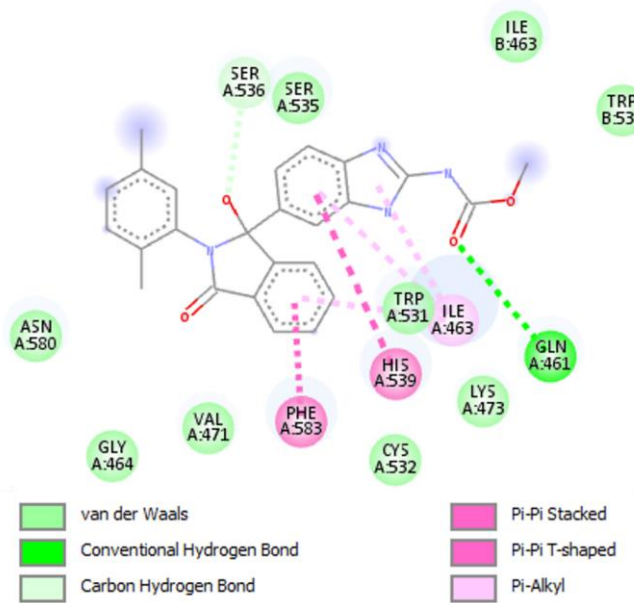


Figura 34. Diagrama de interacción de residuos del XL281 (I-XL2).

En la tabla 12, se resumen todos los residuos que demostraron tener interacción con BRAF^{V600E} para los 5 antagonistas de referencia, clasificándolos por el tipo de enlace.

Tabla 12. Interacciones de los fármacos de referencia con BRAF^{V600E}.

Interacciones de los fármacos de referencia con BRAF^{V600E}.

Fármaco	van der Waals	Puente de hidrógeno	Pi-Alkyl	Otras interacciones
I-Vem	SER B:467, PHE B:468, SER B:465, GLY B:464, SER B:536, LEU B:597, LEU B:505, PHE B:516, THR B:529, ILE B:527, VAL B:482, GLN B:530, SER B:535, HIS B:539, HIS A:539, ASP B:580, ASP	GLY B:466, GLN A:461, ASP B:594, PHE B:595, GLY B:596, CYS B:532, ILE B:463.	VAL B:471, ALA B:481, LEU B:514.	LYS B:578, GLY B:593, TRP B:531, LYS B:483, PHE B:583.

	B:581, ASP B:576, SER B:616.			
<i>I-Sor</i>	ASN A: 580, HIS A:539, PHE A: 516, THR A:529, CYS A:532, SER A:535.	ASP A:594, GLY A:596, SER A:536	ILE A:527, LEU A:505, PHE A:595, LEU A:514, ALA A:481, VAL A:471, ILE: 463.	GLY A:593, LYS A:483, ILE A:592, PHE A:583, TRP A:531.
<i>I-Dra</i>	HIS A:539, SER B:536, VAL B:471, THR B:529, GLN B:530, SER B:535, ILE A:463, GLU B:533, TRP A:531, LYS B:473.	ARG B:462, ILE B:463, CYS B:532.	ALA B:481, LEU B:514, LYS A: 473.	GLN A:461, PHE B:583, TRP B: 531, HIS B: 539.
<i>I-Oxi</i>	GLY B:596, THR B:529, GLN B:530, GLY B:464, SER B:465, ASN B:580, GLY B:466, GLY B:593, PHE A:583.	LYS B:483	VAL B:471, LEU B:514, ILE B:527, CYS B: 532, ALA B:481.	ASP B:594, TRP B:531, ILE B:463.
<i>I-XL2</i>	SER A:535, ILE B: 463, TRP B: 531, TRP A:531, LYS A:473, CYS A:532, VAL A:471, GLY A:464, ASN A:480.	GLN A:461	ILE A:463.	SER A:536, HIS A:539, PHE A:583.

Empezando con los estudios de docking molecular relacionados con el vemurafenib, análisis de docking molecular con este inhibidor han indicado que existen tres residuos aromáticos importantes: **ILE 463**, **TRP 531** y **LYS 483**, resaltando que el anillo central de pirrol y piridina del ligando vemurafenib también exhibe la misma interacción de enlace de hidrógeno con **GLN 530** y **CYS 532**, además de los residuos **PHE 595** y **GLY 596**, que se ligaron al grupo O=S=O [58]. En el mismo sentido, el reporte de la estructura cristalina del Vem-BisAmida -2 (5jt2) mostró que este compuesto tuvo interacción con los residuos **E501**, **E600** y **A497** [96]. Entrando de lleno con los residuos registrados, aquellos que tuvieron una mayor presencia en cuanto a las fuerzas de van der Waals fueron **SER B:467**, **PHE B:468**, **SER B:465**, **GLY B:464**, **SER B:536**, **GLN B:530** y **SER B:616**, siendo la mayoría de ellos aminoácidos polares; entre los puentes de hidrógeno más importantes localizados estuvieron los 2 ya reportados por Umar y colaboradores, **PHE B:595** y **GLY B:596**, además de los

residuos **GLY B:466** y **ASP B:594** que se generaron por medio de los anillos pirrólicos del vemurafenib. Como agregado, los aminoácidos de braf citados previamente, **TRP 531** y **LYS 483**, se clasificaron en los otros tipos de enlaces.

Acorde con el estudio de Ul-Haq y colaboradores, el sorafenib los tres residuos aromáticos más importantes del sorafenib en su interacción con BRAF^{V600E} son: **TRP 530**, **PHE 582** y **PHE594**, que forman parte de la región bisagra, el bucle catalítico y el motivo DGF, respectivamente. Por otro lado, las cadenas laterales alifáticas de **LYS 482**, **LEU 513** y **THR 528** se reportaron como los principales aminoácidos; además, los puentes hidrógeno más sobresalientes pertenecieron a **GLU 500**, **ASP 593** Y **CYS 531** [93]. Hablando sobre los resultados obtenidos, las principales fuerzas de London que se formaron con el sorafenib aparecieron en los residuos **ASN A: 580**, **HIS A:539**, **THR A:529** y **SER A:535**. De los 3 puentes de hidrógeno reportados, solo el **ASP A:594** fue el más cercano al previamente reportado **ASP A:593**. Por último, otras dos coincidencias fueron las de los residuos aromáticos **PHE A:583** y **TRP A:531**, en otro tipo de interacciones.

Ahora hablando del tercer principal antagonista de Braf, el dabrafenib, estudios en literatura indica que este fármaco igualmente se localiza en el “pocket” hidrofóbico de adenina de BRAF^{V600E}, en donde los residuos más relevantes en su interacción con el dabrafenib son: **VAL 471**, **CYS 532**, **LYS 483**, **LEU 505** y **PHE 595** [108]. Dentro de los residuos relacionados con Braf mutada, se consideró que las fuerzas de van der Waals más sobresalientes son las siguientes: **SER B:536**, **VAL B:471**, coincidiendo estos dos con la literatura anteriormente citada e interrelacionándose con el grupo O=S=O; **GLU B:533**, **TRP A:531** y **LYS B:473**, cercanos a los átomos de nitrógeno. Por otro lado, el residuo **CYS 532**, anteriormente referenciado, formó una interacción de hidrógeno muy importante, al enlazarse con un átomo de F presente el grupo difluorobenceno del dabrafenib.

Por otra parte, Li, et al., desarrollaron un estudio de *in silico* de compuestos pirazólicos como inhibidores de Braf, demostraron que sus moléculas se interrelacionaron en la región del pocket de unión a ATP, como es el caso de **VAL 471**, **PHE 583**, **ALA 481**, **THR 529**, **LEU 514** y **ASN 581**; a su vez, los residuos **SER 536** y **LYS 578** formaron un enlace de hidrógeno [49]. En adición, una investigación similar con compuestos pirazólicos, obtuvo que los aminoácidos **TRP 531**, **CYS 532**, **GLU 533**, **SER 535**, **PHE 583**, **SER 536**, **ASN 580**, **HIS 539**, **GLY 534** e **ILE 463** [94]. Estas moléculas referenciadas son muy similares estructuralmente a los inhibidores probados, I-Oxi e I-XL2, por lo que se basó esta sección del análisis interaccional para ambos fármacos. Por un lado, en el I-Oxi, los residuos que mostraron las fuerzas de van der Waals más importantes fueron el **GLY B:464**, **SER B:465** y **PHE A:583**; su único enlace de hidrógeno fue el **LYS B:483**, el cual se relacionó con el grupo nitro del fármaco. A su vez, el I-XL2 obtuvo diversas interacciones, entre ellas los aminoácidos **SER A:535**, **TRP B: 531** y **TRP A:531** demostraron generar fuerzas de London muy cercanas al antagonista; además su único puente de hidrógeno se generó con el residuo polar **GLN A:461**, al relacionarse con el carboxilato. Cabe destacar que elementos como **VAL**

B:471, LEU B:514, CYS B: 532 y ALA B:481, aparecieron en las interacciones de tipo Pi-alquilo; mientras que el **TRP B:531, SER A:536, HIS A:539 y PHE A:583** presentaron otra clase de enlaces, todos estos residuos reportados en la literatura previamente citada en este párrafo.

En los siguientes apartados se describen los estudios de interacciones de las moléculas candidatas con inhibidores de BRAF^{V600E}, contemplando que en el estudio de acoplamiento molecular, estos compuestos fueron ubicados dentro de la proteína en un rango muy cercano a su sitio catalítico, caracterizado por ser una región hidrofóbica (pocket de unión a ATP y adenina) y en donde los residuos más relevantes por su interacción con la mayoría de fármacos evaluados son: **VAL 471, PHE 583, ALA 481, THR 529, LEU 514 y ASN 581**.

4.4.2 Familia espiroestánica

Las moléculas pertenecientes a esta familia mostraron tener, en promedio, cantidades y tipos de interacciones bastante similares que la mayoría de los fármacos evaluados. A continuación, se desglosarán las moléculas que obtuvieron las energías de afinidad más sobresalientes.

a) Espirostano de histidina (E-His)

El espirostano de histidina se caracterizó por establecer diversas fuerzas de van der Waals con la proteína diana y solo un puente de hidrógeno, generando un escenario muy parecido a la de los fármacos I-Oxi e I-XL2. También, hubo presencia de los enlaces alquilo, y otro tipo de interacciones químicas.

Ahondando en mayor medida acerca de los enlaces reportados por Discovery Studio, el residuo de SER A:586, al ser un aminoácido polar, actuó como un donador de puente de hidrógeno al relacionarse con el carboxilato de la histidina; al mismo tiempo, las fuerzas de London, como era de esperarse, estuvieron muy cercanas a las cadenas carbonadas, especialmente a los metilos, éteres y cicloalcanos. Los metilos y grupos con oxígeno en su estructura presentaron enlaces de tipo alquilo (Figura 35).

b) Espirostano de prolina (E-Pro)

Con el compuesto E-Pro ocurrió un hecho llamativo, ya que a pesar de que esta molécula cuenta con varios grupos cetónicos y éter, como se ve en el diagrama, no se formó ningún puente de hidrógeno con algún residuo de la proteína (Figura 36).

Por otro lado, las fuerzas de van der Waals siguieron prevaleciendo por encima de los otros enlaces, concentrándose en la zona media de la molécula, cerca de las cadenas policíclicas de 5 y 6 carbonos, así como del carboxilato y grupo amino de la prolina; y a su vez, solo se localizaron dos enlaces alquílicos interrelacionados con los metilos y ciclohexanos.

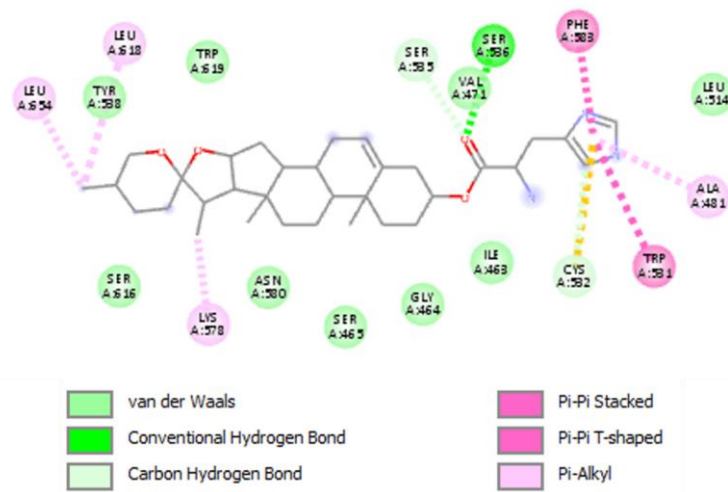


Figura 35. Diagrama de interacción de residuos del espirostanos de histidina (E-His).

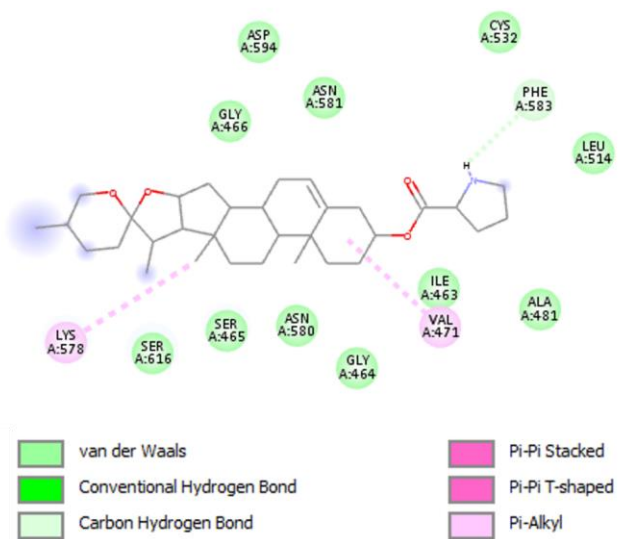


Figura 36. Diagrama de interacción de residuos del espirostanos de prolina (E-Pro).

c) Espirostano de tirosina (E-Tyr)

Con el espirostano de tirosina reaparecieron los puentes de hidrógeno, presentándose en un solo residuo, interactuando los dos átomos de H del amino de la tirosina con, probablemente, el grupo tiol de la CYS A:532. Las fuerzas de van der Waals permanecieron constantes, rodeando el compuesto en las zonas con alta presencia de átomos de oxígeno y nitrógeno, al igual que en el anillo fenólico de la tirosina. Por último, los enlaces de tipo alquilo aumentaron en comparación con el aminoéster de prolina, relacionándose en mayor medida con los metilos y las cadenas aromáticas como el fenol (Figura 37).

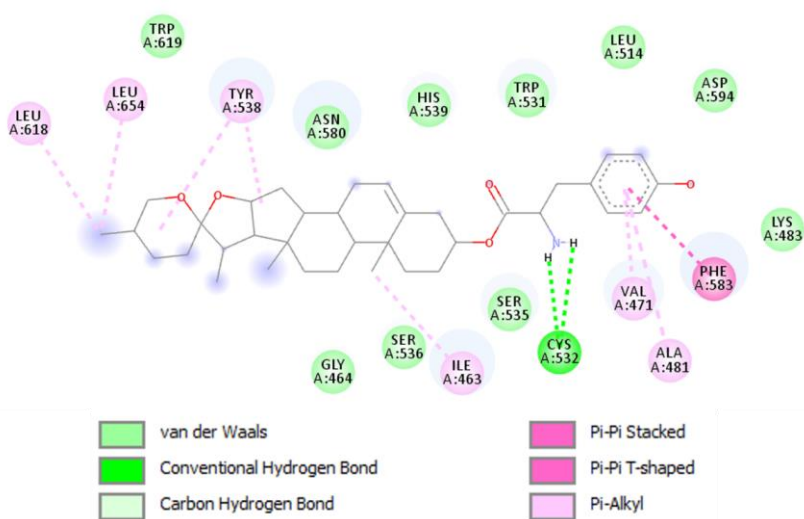


Figura 37. Diagrama de interacción de residuos del espirostano de tirosina (E-Tyr).

d) Espirostano de triptófano (E-Trp)

Para finalizar con esta familia, el espirostano de triptófano igualmente solo consiguió un enlace de hidrógeno con un residuo de BRAF^{V600E}, elevando la proporción de fuerzas de van der Waals; y al mismo tiempo, las interacciones de tipo alquilo fueron muy similares en cantidad que las anteriores moléculas espirostánicas (Figura 38).

Profundizando más las interacciones descritas, la serina (SER A:536), siendo un aminoácido polar de carga neutra, logró donar un hidrógeno al ácido carboxílico del triptófano. Por otro lado, las fuerzas de London se ubicaron en las regiones circundantes a los grupos éter, cetonas, aminos y las cadenas cíclicas, observándose principalmente en los dobles enlaces y el anillo indólico de este aminoácido. Finalmente, los enlaces alquilo, además de relacionar con los metilos, se generaron en los cicloalcanos y alquenos con presencia de oxígeno en sus estructuras químicas. En la tabla 13 se resumen el análisis interaccional para esta familia.

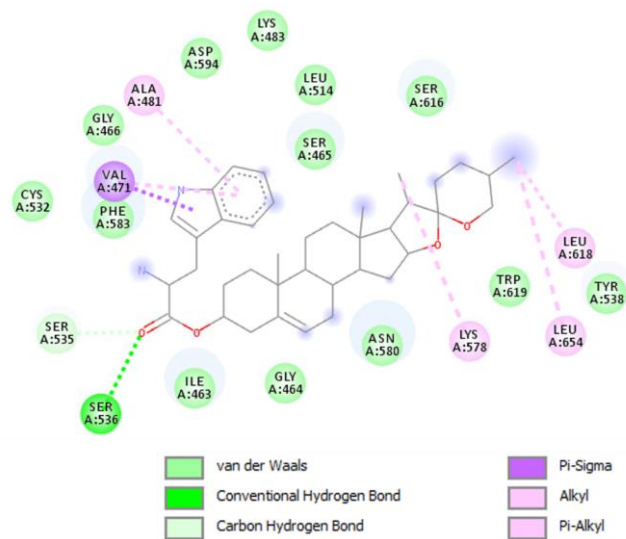


Figura 38. Diagrama de interacción de residuos del espirostan de triptófano (*E-Trp*).

Tabla 13. Interacciones de los aminoésteres espirostánicos con *BRAF*^{V600E}.

Interacciones de los aminoésteres espirostánicos con *BRAF*^{V600E}.

Molécula	van der Waals	Puente de hidrógeno	Alkyl y Pi-Alkyl	Otras interacciones
<i>E-His</i>	TYR A:538, TRP A:619, VAL A:471, LEU A:514, ILE A:463, GLY A:464, SER A:465, ASN A:580, SER A:616.	SER A:536	LEU A:654, LEU A:618, ALA A:481, LYS A:578.	SER A:535, CYS A:532, PHE A:583, TRP A:531.
<i>E-Pro</i>	GLY A:466, ASN A:581, ASP A:594, CYS A:532, LEU A:514, ALA A:481, ILE A:463, GLY A:464, ASP A:580, SER A:465, SER A:616,	-	VAL A:471, LYS A:578	PHE A:583
<i>E-Tyr</i>	TRP A:619, ASN A:580, HIS A:539,	CYS A:532.	LEU A:654, LEU A:618, TYR	PHE A:583

	TRP A:531, LEU A:514, ASP A:594, LYS A:483, SER A:535, SER A:536, GLY A:464.		A:538, ILE A:463, VAL A:471, ALA A:481	
<i>E-Trp</i>	CYS A:532, PHE A:583, GLY A:466, ASP A:594, LEU A:514, SER A:465, SER A:616, TYR A:538, TRP A:619, ASN A:580, GLY A:464, ILE A:463.	SER A:536.	ALA A:481, LEU A:618, LEU A:654, LYS A:578	SER A:535, VAL A:471.

Entrando con la discusión de estos resultados, la *E-His*, con una energía de afinidad de **-9.4** kcal/mol, los residuos que generaron fuerzas de van der Waals más cercanas al sitio “pocket” de BRAF^{V600E}, fueron **VAL A:471, LEU A:514 e ILE A:463**. Al mismo tiempo, **SER A:536** fue el único residuo que formó un enlace de hidrógeno, y **ALA A:481** tuvo un enlace alquilo con el ciclopenteno de la histidina, zona más cercana la región hidrofóbica de la proteína.

Por su parte, la *E-Pro*, con el mismo valor energético que E-His, aunque no formó ningún puente de hidrógeno, existieron diversos residuos relevantes con esta molécula, como **ASN A:581, ALA A:481 e ILE A:463**, creando fuerzas de London con BRAF en el sitio catalítico. También, los aminoácidos **VAL A:471**, en forma de enlace alquilo, y **PHE A:583** estuvieron en el área hidrofóbica de la proteína.

El espiroetano de tirosina (*E-Tyr*), el cual tuvo la energía de acoplamiento más alta con **-10.1** kcal/mol, al igual que la *E-Trp*, demostró un mayor número de interacciones con BRAF^{V600E}. Los residuos **HIS A:539, TRP A:531, LEU A:514, ASP A:594 y SER A:535** crearon fuerzas de van der Waals en el pocket de unión a ATP de la diana. En el mismo sentido, el puente de hidrógeno del grupo amino creado con **CYS A:532** se localizó en la misma zona. Por último, **VAL A:471 y ALA A:481**, que se enlazaron alquílicamente, fueron muy importantes.

Para finalizar, la *E-Trp* consiguió un número significativo de interacciones. Los residuos **PHE A:583, SER A:465 e ILE A:463** formaron fuerzas de London con el triptófano, ahora encontrándose la zona hidrofóbica en la parte izquierda de la Figura 38; por su parte, el puente de hidrógeno generado con el carboxilato apareció en **SER A:536**. Finalmente, otras interacciones sobresalientes se presentaron en los residuos **ALA A:481**, por un enlace alquilo; **SER A:535 y VAL A:471**, todos dentro del sitio catalítico de la proteína.

En base el número de coincidencias observadas en estos 3 aminoésteres espiroestánicos, se podría concluir los residuos más importantes para esta familia son los siguientes: **VAL A:471**, **LEU A:514**, **ILE A:463**, **SER A:536**, **ALA A:481**, **PHE A:583**, **CYS A:532** y **SER A:535**.

4.4.3 Familia furostánica

Los 3 aminoésteres furostánicos presentaron diversas interacciones físicas y químicas sobresalientes, en especial de los compuestos de tirosina y triptófano, convirtiéndose en constantes los 3 tipos previamente descritos en los anteriores grupos. Los siguientes apartados describen las observaciones reportadas.

a) Furostano (Fur)

El furostano a diferencia de los demás compuestos, no tenía ligado un aminoácido al grupo de OH⁻ del C3 del esteroide, pero obtuvo una muy buena energía de afinidad. Hablando de sus interacciones, el diagrama no presentó puentes de hidrógeno con los residuos de la diana, más si hubo suficientes fuerzas de van der Waals con los aminoácidos de BRAF^{V600E}, así como enlaces alquilo. Comenzando con las fuerzas de London, estas se localizaron cercanas a la zona media del furostano, cerca del esqueleto 5 α -fenantreno, en los grupos metilos y el ácido carboxílico del esteroide. En el mismo sentido, las 3 interacciones alquílicas repartieron en los metilos y ciclohexenos de esta molécula (Figura 39).

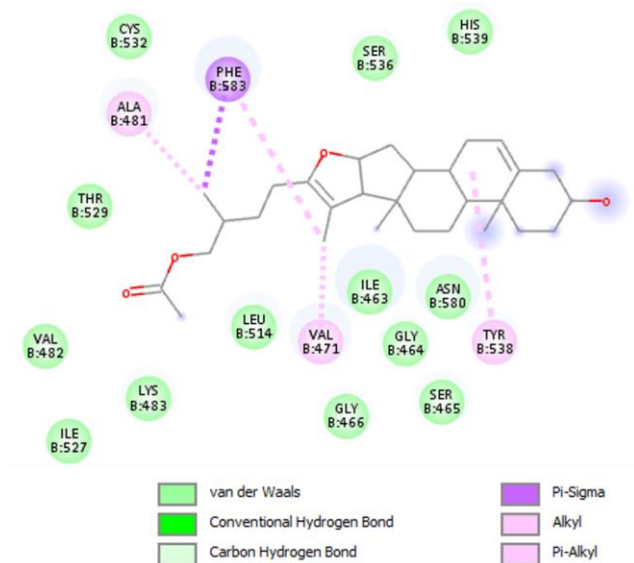


Figura 39. Diagrama de interacción de residuos del furostano (Fur).

b) Furostano de tirosina (F-Tyr)

Esta molécula tuvo un mayor número de interacciones, encabezadas por la de van der Waals, un poco más de las alquílicas y un puente de hidrógeno (Figura 40).

Por un lado, la lisina (LYS B:483), residuo básico, fungió como un donador de puente de hidrógeno al interrelacionarse con la cetona del furostano. Las fuerzas de London se esparcieron por todos los alrededores del compuesto, concentrándose especialmente a los anillos aromáticos del esteroide, al fenol y los grupos funcionales con oxígeno, como el éter y las cetonas. Como en los casos anteriores, los alquilo se localizaron en los metilos y el anillo fenólico de la tirosina principalmente.

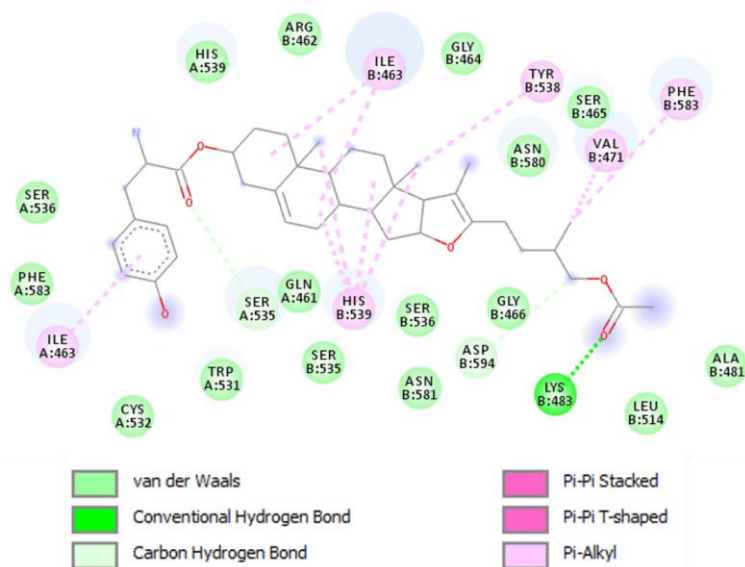


Figura 40. Diagrama de interacción de residuos del furostano de tirosina (F-Tyr).

c) Furostano de triptófano (F-Trp)

Para finalizar con este último compuesto, se observó una clara diferencia al tener mayor presencia de puentes de hidrógeno con Braf, con un total de 3. Igualmente, las interacciones de van der Waals son numerosas alrededor del esteroide, aunque con una ligera reducción de los enlaces alquilo.

Ahondando brevemente en los enlaces mostrados en la Figura 41, los residuos ASP B:594 y LYS B:483, siendo un aminoácido con carga negativa y positiva respectivamente, fueron donadores de puente de hidrógeno con dos diferentes átomos de oxígeno del carboxilato, mientras que el residuo ILE A:463 actuó como un aceptor de H del grupo amino del triptófano. En contraparte, las interacciones de van der Waals se notaron, como en las anteriores moléculas, muy cercanas al esqueleto esteroidal y al indol del aminoácido; así como lo hicieron los enlaces alquilo.

En la tabla 14, se muestran todas las interacciones obtenidas por las 3 moléculas furostánicas con la proteína diana.

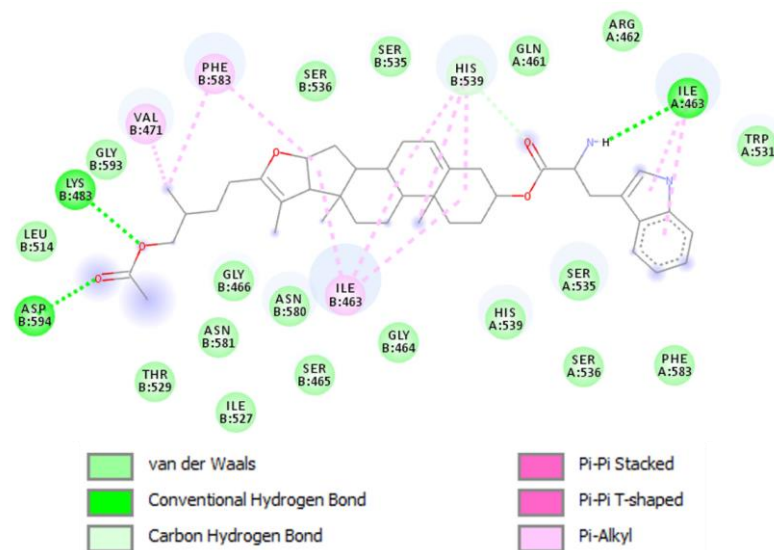


Figura 41. Diagrama de interacción de residuos del furostano de triptófano (F-Trp).

Tabla 14. Interacciones de los aminoésteres furostánicos con BRAF^{V600E}

Interacciones de los aminoésteres furostánicos con BRAF^{V600E}

Molécula	van der Waals	Puente de hidrógeno	Alkyl y Pi-Alkyl	Otras interacciones
Fur	THR B:529, CYS B:532, SER B:536, HIS B:539, ASN B:580, SER B:465, GLY B:466, GLY B:464, ILE B:463, LEU B:514, LYS B:483, ILE B:527, VAL B:482.	-	ALA B:481, TYR B:538, VAL B:471.	PHE B:583
F-Tyr	HIS A:539, ARG B:462, GLY B:464, ASN B:580, SER B:465, ALA B:481,	LYS B:483.	ILE B:463, TYR B:538, VAL B:471, PHE B:583, HIS	SER A:535, ASP B:594.

	LEU B:514, GLY B:466, ASN B:581, SER B:536, SER B:535, GLN A:461, TRP A:531, CYS A:532, PHE A:583, SER A:536.		B:539, ILE A:463.	
<i>F-Trp</i>	GLY B:593, HIS A:539, SER B:536, SER B:535, GLN A:461, ARG A:462, TRP A:531, PHE A:583, SER A:535, SER A:536, HIS A:539, GLY B:464, SER B:465, GLY B:466, ASN B:580, ASN B:581, ILE B:527, THR B:529, LEU B:514.	ILE A: 463, ASP B:594, LYS B:483	VAL B:471, PHE B:583, ILE B:463.	HIS B:539

Con este nuevo grupo de compuestos, se notó una tendencia en los residuos aminoacídicos similar a la anterior familia. Primero, el furostano (*Fur*), con un acoplamiento de **-9.4** kcal/mol, al no estar enlazado con algún aminoácido, la localización de esta molécula dentro de la zona catalítica de BRAF^{V600E} cambió con respecto a las analizadas en la sección pasada. Por ejemplo, los principales residuos que formaron fuerzas de van der Waals, como **THR B:529**, **SER B:536**, **ILE B:463** y **LEU B:514**; se encontraron cercanos a la cadena alifática y al carboxilato del furostano. En el mismo sentido, los dos enlaces alquilo más relevantes pertenecieron a **ALA B:481** y **VAL B:471**; así como también el residuo **PHE B:583** resultó notable al estar cerca del “pocket” de ATP y adenina.

Con la *F-Tyr* (**-9.4** kcal/mol) sucedió algo muy interesante, ya que la ubicación de esta molécula en la región hidrófoba de Braf mutada ocurrió de forma inversa, es decir, a diferencia de otros compuestos donde la zona catalítica se encontraba del lado del aminoácido, en el furostano de tirosina el sitio activo se localizó en la cadena alifática del esteroide. Los residuos **ASN B:580**, **SER B:465**, **ALA B:481** y **LEU B:514**, creando fuerzas de London, resultaron ser los más importantes en su interacción con BRAF^{V600E}. Además, **LYS B:483** fue igualmente sobresaliente al relacionarse con el carboxilato, generando el puente de hidrógeno; al mismo tiempo, resaltaron **VAL B:471** y **PHE B:583**, los cuales se ligaron a la diana con enlaces alquilo.

Por último, el compuesto *F-Trp*, teniendo la energía de afinidad más alta de esta familia (-10.1 kcal/mol) permaneció con la misma tendencia de la familia furostánica de ubicar su cadena alifática en el “pocket” de BRAF^{V600E}. Aquí, los residuos más destacados que generaron fuerzas de van der Waals fueron *SER B:536, SER A: 535, GLY B:466, THR B:529 y LEU B:514* al estar dentro de la zona de unión a ATP. Por otro lado, *ASP B:594 y LYS B:483* establecieron los dos puentes de hidrógeno más valorados; para finalizar, los enlaces alquilo más relevantes estuvieron en los residuos *VAL B:471 y PHE B:583*.

En torno a estos resultados, se considera que los residuos más remarcables de la familia furostánica son el *VAL A:471, LEU A:514, SER A:536 ALA A:481, PHE A:583, LYS B:483. THR B:529 y SER A:535*.

4.4.4 Familia piránica

a) Pirano de fenilalanina

Para la familia piránica, solo se seleccionó la que más afinidad presentó con la proteína diana, debido a su sobresaliente valor energético, prevaleciendo a su vez la fenilalanina como un aminoácido energéticamente sobresaliente con BRAF^{V600E}, tal como el análisis estadístico lo detalló.

El pirano de fenilalanina estableció un puente de hidrógeno con un residuo de asparagina, donde el ASN A:580 fungió como donador de H del carboxilato. A la vez, con fuerzas de van der Waals, no tan abundantes como en pasados aminoésteres esteroidales, pero permaneciendo como la interacción dominante, siguieron la tendencia de establecer una interrelación física con los grupos químicos con oxígeno y los anillos aromáticos del esteroide. Por otro lado, el diagrama muestra 3 residuos con un enlace alquilo y están presentes otros tipos de interacciones en mayor medida que en otros compuestos y familias. En la Tabla 15 se desglosan las interacciones señaladas el *P-Phe* (Figura 42).

Tabla 15. Interacciones de los aminoésteres piránicos con BRAF^{V600E}.

Interacciones de los aminoésteres piránicos con BRAF^{V600E}.

Molécula	van der Waals	Puente de hidrógeno	Alkyl y Pi-Alkyl	Otras interacciones
<i>P-Phe</i>	LYS A:578, SER A:616, SER A:465, GLY A:464, ILE A:463, LEU A:514, VAL A:471, TRP A:619, LYS A:578.	ASN A:580.	ALA A:481, HIS A:539, TYR A:538.	CYS A:532, TRP A:531, PHE A:583, SER A:535, SER A:536.

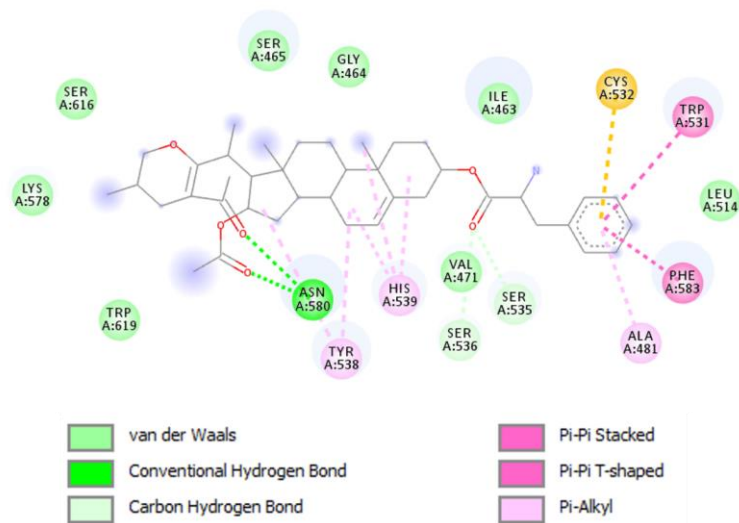


Figura 42. Diagrama de interacción de residuos del pirano de fenilalanina (P-Phe).

Profundizando en las interacciones presentes en el *P-Phe*, con un valor energético de **-9.6** kcal/mol, aquí la región de la molécula que se interrelacionó con el sitio catalítico de la proteína fue la del aminoácido, en este caso la fenilalanina, como había sucedido con la familia espiroestánica. Los residuos **ILE A:463**, **LEU A:514** y **VAL A:471** se reportaron como los más notables en cuanto a la formación de fuerzas de van der Waals se refiere; al mismo tiempo, el **ASN A:580** se enlazó al aminoéster por un puente de hidrógeno y **ALA A:481** fue el enlace de tipo alquilo más próximo a la región hidrofóbica de BRAF^{V600E}. En adición, los residuos **CYS A:532**, **TRP A:531** y **PHE A:583** también estuvieron en la zona ya mencionada, por lo que se consideraron como sobresalientes. En este aminoéster piránico se notó que una gran parte de los residuos con mayor presencia en las anteriores familias estuvieron presentes.

4.4.5 Familia bisnorlactónica

Por último, se analizaron los diagramas interaccionales de los 3 compuestos más destacados de esta familia, observándose los mismos tipos de interacciones principales (puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y enlaces alquilo) y en la misma frecuencia que las moléculas anteriormente reportadas.

a) Bisnorlactona de fenilalanina (B-Phe)

Iniciando con la bisnorlactona de fenilalanina, como sucedió con algunos de los compuestos homólogos de otras familias, no formó ningún puente de hidrógeno con BRAF^{V600E}, pese a la existencia de varios átomos de oxígeno y nitrógeno en la estructura del esteroide. El

diagrama enseña la importante cantidad de interacciones de van der Waals, estableciéndose en residuos cercanos a la base del 5 α -fenantreno, así como al carboxilato, amino y anillo fenílico de la fenilalanina. unos cuantos residuos con enlaces de tipo alquilo. En adición, los 3 enlaces alquilo se localizaron en los grupos metilo y el anillo fenílico (Figura 43).

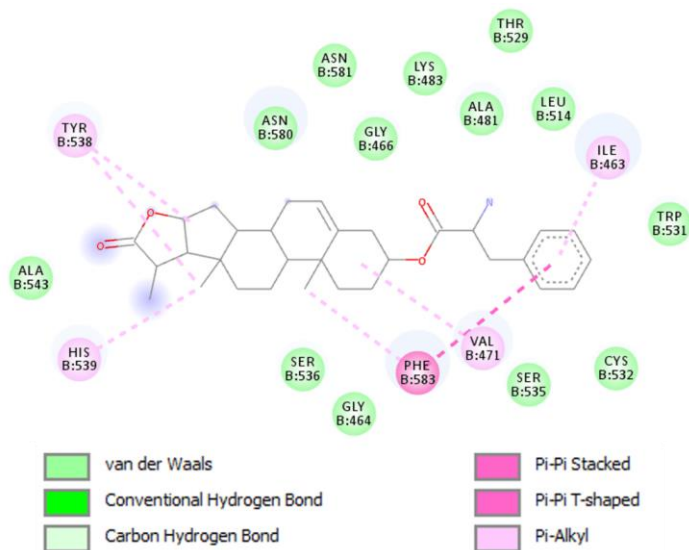


Figura 43. Diagrama de interacción de residuos de la bisnorlactona de fenilalanina (B-Phe).

b) Bisnorlactona de tirosina (B-Tyr)

Pasando con la tirosina bisnorlactónica, la cantidad de fuerzas de van der Waals fue comparable con el aminoéster de fenilalanina; mientras que un residuo de serina consiguió crear un puente de hidrógeno con BRAF^{V600E}. También, los enlaces de tipo alquilo siempre se hacen presentes, habiendo 4 residuos con esta interacción. En la Figura 44 es posible observar como el residuo SER A:465 fue el aceptor de puente de hidrógeno proveniente del grupo amino de la tirosina; al mismo tiempo, se concentraron muchas fuerzas de London por la atracción del carboxilato y anillo fenólico del mismo aminoácido, además de las presentes en la amina y cadenas cíclicas de la bisnorlactona. En contraparte, los enlaces alquilo se acumularon en la parte izquierda de la molécula.

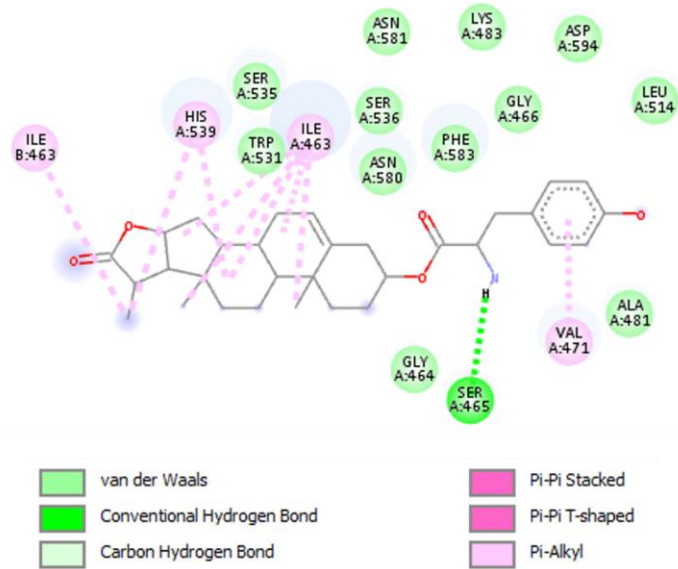


Figura 44. Diagrama de interacción de residuos de la bisnorlactona de tirosina (B-Tyr).

c) Bisnorlactona de triptófano (B-Trp)

Para finalizar, la bisnorlactona de triptófano, volviéndose algo constante, formó más de un enlace de hidrógeno, específicamente con 2 residuos. La proporción de las fuerzas de van der Waals son equiparables con las de los otros dos compuestos de esta familia, al igual que las interacciones alquílicas; al mismo tiempo, hubo más presencia de otro tipo de enlaces.

El diagrama muestra que, tanto la asparagina (ASN A:580) y el aspartato (ASP A:594), fueron los aceptores de los puentes de hidrógeno, los cuales provenían de los 2 grupos amino del triptófano. Por otro lado, las fuerzas de London, a diferencia de la anterior molécula, permanecieron de manera homogénea por todo el compuesto, destacando las interacciones con el carboxilato, grupo amino e indol, generadas en varios residuos de BRAF^{V600E}. Finalmente, los enlaces alquilo se ubicaron en los metilos de las bisnorlactona, sin haber presencia en la región del aminoácido. Para finalizar, en la tabla 16 se registran los resultados interaccionales para las 3 moléculas bisnorlactónicas (Figura 45).

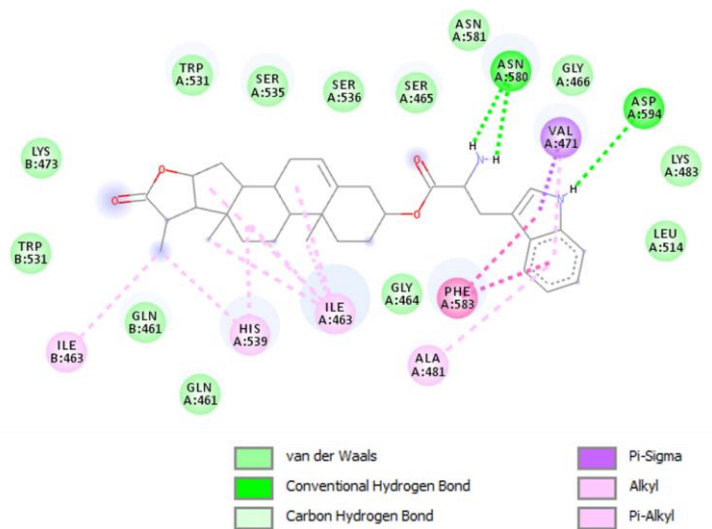


Figura 45. Diagrama de interacción de residuos de la bisnorlactona de triptófano (B-Trp).

Tabla 16. Interacciones de los aminoésteres bisnorlactónicos con BRAF^{V600E}.

Interacciones de los aminoésteres bisnorlactónicos con BRAF^{V600E}.

Molécula	van der Waals	Puente de hidrógeno	Alkyl y Pi-Alkyl	Otras interacciones
B-Phe	ALA B:543, ASN B: 580, ASN B:581, GLY B:466, LYS B:483, ALA B:481, LEU A:514, THR B:529, TRP B: 531, CYS B: 532, SER B:535, GLY B:464, SER B:536, ALA B: 543.	-	ILE B: 463, VAL B: 471, HIS A:539, TYR A:538.	PHE A:583.
B-Tyr	TRP A:531, SER A:535, ASN A:580, SER A:536, ASN A:581, PHE A:583, GLY A:466, LYS	SER A:465	ILE B:463, HIS A:539, ILE A:463, VAL A:471.	CYS A:532, TRP A:531, PHE A:583, SER A:535, SER A:536.

	A:483, ASP A:594, LEU A:514, ALA A:481, GLY A:464.			
B-Trp	TRP B:531, LYS B: 473, TRP A:531, SER A:535, SER A:536, SER A:465, ASN A:581, GLY A:466, LYS A:483, LEU A:514, GLY A:464, GLN A:461, GLN B:461.	ASN A:580, ASP A:594.	ILE B:463, HIS A:539, ILE A:463, ALA A:481.	PHE A:583, VAL A:471.

Iniciando con los datos obtenidos para estos 3 últimos compuestos, se observó que como en la mayoría de los compuestos, los aminoácidos ligados al esteroide se encargaron de interactuar con residuos en la región “pocket” de BRAF^{V600E}. Para el caso de la B-Phe (-9.6 kcal/mol de acoplamiento) que, aunque no logró un número tan grande de interacciones con la diana como anteriores aminoésteres esteroídicos, obtuvo diversas relaciones muy sobresalientes. Se consideró que las mejores fuerzas de London reportadas fueron la de **GLY B:466**, **ALA B:481**, **TRP B: 531**, **CYS B: 532** y **SER B:535**. Por su parte, la **B-Phe** se enlazó alquílicamente con los residuos **ILE B: 463** y **VAL B: 471**, presentes en el sitio catalítico, así como también los hizo el **PHE B:583** con otra clase de relación.

Pasando con la **B-Tyr**, con un valor de -10.1 kcal/mol, mostró una mayor cantidad de interacciones con BRAF^{V600E}. Los mejores residuos que se interrelacionaron mayormente con el anillo fenólico de la tirosina, por medio de las fuerzas de van der Waals, fueron los siguientes: **ASN A:580**, **PHE A:583**, **ALA A:481** y **GLY A:464**. Cabe destacar que, igualmente se formó un puente de hidrógeno fundamental con **SER A:465**; además, con **VAL A:471** se creó el enlace alquilo más notable en toda la molécula.

Para terminar con este análisis, la bisnorlactona de triptófano (**B-Trp**), cuya energía de afinidad fue en realidad la más alta de todos los aminoésteres esteroídicos evaluados (-10.9 kcal/mol) estableció una diversidad de interacciones débiles con BraF. Para empezar, los residuos **SER A:465**, **LEU A:514** y **GLY A:464** formaron fuerzas de London destacadas con el triptófano. Al mismo tiempo, la molécula creó dos enlaces de hidrógeno muy importantes en **ASN A:580** y **ASP A:594**; finalmente, en enlace de tipo alquilo con **ALA A:481**, como las relaciones con los aminoácidos **PHE A:583** y **VAL A:471**, se reportaron como superlativas.

En conclusión, los residuos más repetidos entre las 3 moléculas de la familia bisnorlactónica resultaron ser los siguientes: **VAL A:471**, **SER A:465**, **ALA A:481**, **PHE A:583** y **ASN A:580**.

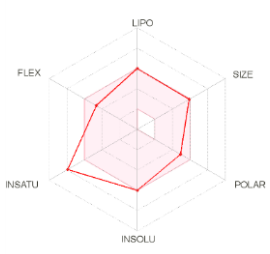
4.5 Estudio ADME.

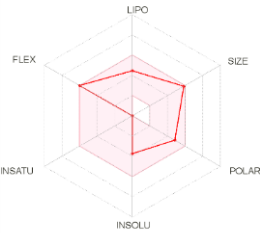
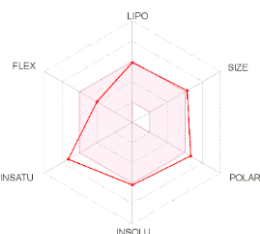
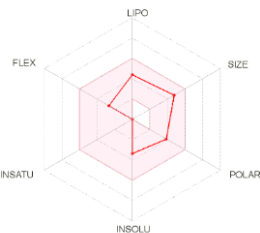
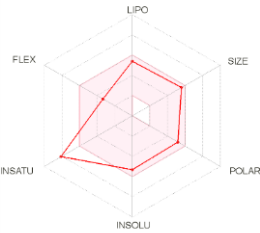
Para este último análisis se evaluaron las mismas 11 moléculas analizadas en los estudios de interacción con Discovery Studio para comprobar sus cualidades farmacocinéticas. El desarrollo de fármacos implica la evaluación de la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) cada vez más temprano en el proceso de descubrimiento, en una etapa en la que los compuestos considerados son numerosos pero el acceso a las muestras físicas es limitado [109]. La herramienta web SwissADME brinda acceso gratuito a un conjunto de modelos predictivos rápidos pero robustos para propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas, similitud con las drogas y compatibilidad con la química médica, entre los que se incluyen métodos competentes internos como el diagrama de “Boiled Egg”[110], iLOGP [111], radar de biodisponibilidad, entre otras [109]. A continuación, se desglosan los resultados obtenidos en SwissADME de los mejores compuestos diseñados.

4.5.1 Radares de biodisponibilidad

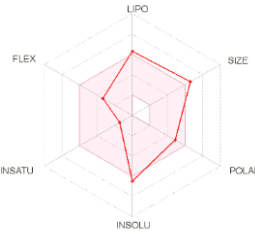
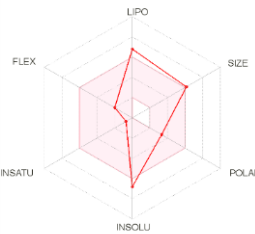
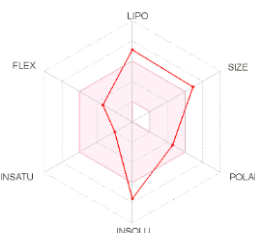
Iniciando con el radar de biodisponibilidad muestra una evaluación rápida de la semejanza con fármacos de referencia. Se tienen en cuenta seis propiedades fisicoquímicas: lipofilia, tamaño, polaridad, solubilidad, flexibilidad y saturación, representándose como un área rosada en la que el gráfico de radar de la molécula tiene que caer por completo para que se considere similar a una droga. El área rosa representa el rango óptimo para cada propiedad (lipofilia: XLOGP3 entre -0,7 y +5,0, tamaño: PM entre 150 y 500 g/mol, polaridad: TPSA entre 20 y 130 Å², solubilidad: log S no superior a 6, saturación: fracción de carbonos en la hibridación sp³ no inferior a 0,25, y flexibilidad: no más de 9 enlaces giratorios [109]. En la tabla 17 se encuentran los radares de biodisponibilidad de los 11 compuestos y los 5 fármacos de referencia (Figuras 46-61).

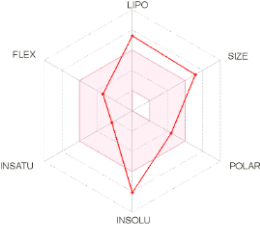
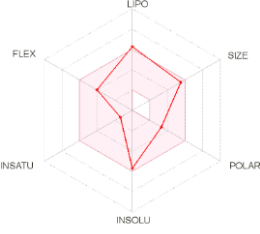
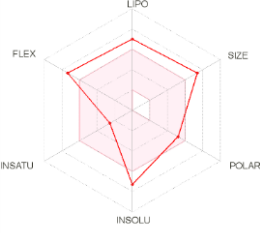
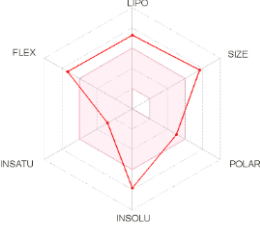
Tabla 17. Radares de biodisponibilidad

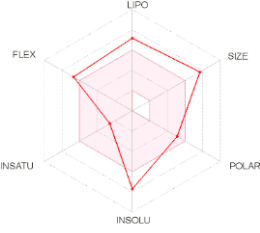
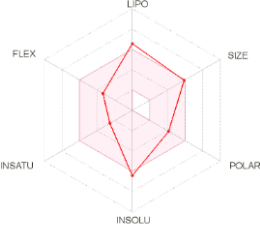
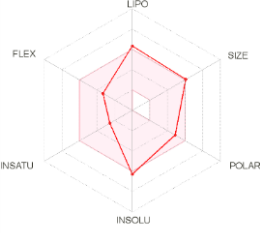
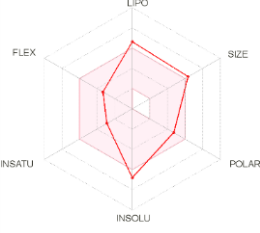
Radares de biodisponibilidad		
Compuesto	Diagrama del radar	Descripción
Fármacos de referencia		
I-Vem	 <p style="text-align: center;"><i>Figura 46. Radar de biodisponibilidad del I-Vem.</i></p>	<p>Para el vemurafenib la mayoría de los parámetros evaluados estuvieron adentro del hexágono rosa, en donde la flexibilidad y la polaridad resultaron ser moderadamente altas, mientras que la lipofilia, el tamaño y la insolubilidad se mantuvieron en el límite del radar de biodisponibilidad. Por otro lado, la insaturación fue muy elevada y se salió del rango sugerido.</p>

<p>I-Sor</p>	 <p><i>Figura 47. Radar de biodisponibilidad del I-Sor.</i></p>	<p>El sorafenib cuenta con todas sus propiedades dentro de la zona rosada, teniendo muy cerca del límite los criterios de flexibilidad y tamaño; la polaridad e insolubilidad se encuentran más cercanos a la parte media; mientras que la insaturación es muy baja, probablemente con un valor inferior a 0.25 de hibridación sp³.</p>
<p>I-Dra</p>	 <p><i>Figura 48. Radar de biodisponibilidad del I-Dra.</i></p>	<p>La liposolubilidad, el tamaño y la flexibilidad del dabrafenib se mantuvieron dentro del rango aceptable para fármacos orales; por otro lado la polaridad, insolubilidad y la insaturación se sobrepasaron del hexágono por muy poco.</p>
<p>I-Oxi</p>	 <p><i>Figura 49. Radar de biodisponibilidad del I-Oxi.</i></p>	<p>Este inhibidor consiguió tener sus 6 características en el área rosa, estando la mayoría en un nivel medio del hexágono, a excepción de la flexibilidad, la cual se puede inferir que es mínima pero aceptable; y la insaturación que, al igual que en sorafenib, con un hibridación sp³ muy cercana al valor mínimo de 0.25.</p>
<p>I-XL2</p>	 <p><i>Figura 50. Radar de biodisponibilidad del I-XL2.</i></p>	<p>Este último antagonista obtuvo la mayoría de sus parámetros en los límites de la región aceptable para los fármacos orales, solo por la insaturación que, a diferencia de I-Sor, I-Dra e I-Oxi; tuvo una insaturación mucho mayor, rebasando el rango permitido.</p>

Aminoésteres seleccionados

<p>E-His</p>	 <p><i>Figura 51. Radar de biodisponibilidad del E-His..</i></p>	<p>Este espirostano de histidina mostró una flexibilidad media, una insaturación baja y una alta polaridad, encontrándose estas 3 propiedades dentro del hexágono. A su vez, la liposolubilidad, el tamaño y la insolubilidad en agua se salieron del área rosada, siendo considerablemente elevadas.</p>
<p>E-Pro</p>	 <p><i>Figura 52. Radar de biodisponibilidad del E-Pro.</i></p>	<p>El E-Pro tuvo los mismos 3 parámetros que la anterior molécula, pero este espirostano presentó una menor flexibilidad, polaridad e insaturación, siendo la más baja esta última característica. Al mismo tiempo, la liposolubilidad y la insolubilidad fueron más altas, y el tamaño apenas traspasó el límite del hexágono.</p>
<p>E-Tyr</p>	 <p><i>Figura 53. Radar de biodisponibilidad del E-Tyr.</i></p>	<p>Continuando con la misma tendencia que los compuestos de esta familia, la E-Tyr consiguió la misma ubicación de los 6 parámetros evaluados, destacando que la liposolubilidad, insolubilidad y tamaño fueron más altos, estando más alejados de los rangos admisibles.</p>

<p>E-Trp</p>	 <p><i>Figura 54. Radar de biodisponibilidad del E-Trp.</i></p>	<p>El espirostano de triptófano prácticamente logró igualar el mismo comportamiento que el E-Tyr en las 6 propiedades del radar de biodisponibilidad.</p>
<p>Fur</p>	 <p><i>Figura 55. Radar de biodisponibilidad del Fur..</i></p>	<p>El furostano, a diferencia de los 4 anteriores compuestos, obtuvo 5 propiedades en la zona rosada, reportando una baja insaturación, una polaridad y flexibilidad media y una insolubilidad y tamaño elevados, cerca de la periferia del hexágono. La liposolubilidad fue el único valor que sobrepasó el rango permitido.</p>
<p>F-Tyr</p>	 <p><i>Figura 56. Radar de biodisponibilidad del F-Tyr.</i></p>	<p>Esta molécula, ya con una tirosina enlazada al furostano, regresó con el comportamiento observado, solo teniendo la insaturación y polaridad (alta) en el hexágono; siendo muy altos los 4 parámetros restantes.</p>
<p>F-Trp</p>	 <p><i>Figura 57. Radar de biodisponibilidad del F-Trp.</i></p>	<p>En el F-Trp se observó un comportamiento muy similar al F-Tyr en los 6 parámetros del radar.</p>

<p>P-Phe</p>	 <p><i>Figura 58. Radar de biodisponibilidad del P-Phe.</i></p>	<p>El pirano de fenilalanina mostró una insolubilidad media-baja y una alta polaridad, pero dentro del radar. Por otro lado, las otras 4 propiedades fueron muy exacerbadadas al pasar la zona rosa.</p>
<p>B-Phe</p>	 <p><i>Figura 59. Radar de biodisponibilidad del B-Phe.</i></p>	<p>Entrando con la familia bisnorlactónica, el B-Phe obtuvo las 3 cualidades habituales dentro del hexágono descritas anteriormente, así como el tamaño del compuesto que se mantuvo al límite. La liposolubilidad e insolubilidad rebasaron los rangos aceptables.</p>
<p>B-Tyr</p>	 <p><i>Figura 60. Radar de biodisponibilidad del B-Tyr.</i></p>	<p>En la bisnorlactona de tirosina se notó la tendencia reportada, pero cabe destacar que la liposolubilidad y la insolubilidad, aunque fuera del radar, consiguieron estar más cerca del área rosada, mientras que el tamaño estuvo en el vértice del hexágono</p>
<p>B-Trp</p>	 <p><i>Figura 61. Radar de biodisponibilidad del B-Trp.</i></p>	<p>Esta última molécula de triptófano resultó tener una tendencia similar a B-Tyr, pero con los 3 parámetros foráneos al radar ligeramente más por arriba.</p>

En resumen, el análisis del radar de biodisponibilidad para los inhibidores de referencia presentó, en la mayoría de ellos, como era de esperarse, estabilidad en sus propiedades físicas teniendo sus valores dentro de la zona rosada, existiendo una discrepancia en la insaturación, debido a que el vemurafenib, dabrafenib y XL281 se salieron del radar, mientras que el sorafenib y la oxima reportaron el valor mínimo. Continuando con los aminoésteres esteroidales, resultaron tener una tendencia en determinados parámetros: La mayor parte de compuestos poseyeron las propiedades de polaridad e insaturación dentro del radar, mientras que la flexibilidad y el tamaño aparecían en algunos casos dentro del hexágono, especialmente en los de la familia espiroestánica y bisnorlactónica; para finalizar, otro común denominador observado en los compuestos evaluados fue que tanto la liposolubilidad como la insolubilidad permanecieron afuera del área rosada, indicando que estos compuestos son poco solubles en agua (Tabla 17).

4.5.2 Propiedades fisicoquímicas

Se ha descubierto que la flexibilidad molecular reducida, medida por el número de enlaces giratorios, y el área de superficie polar baja o el recuento total de enlaces de hidrógeno (suma de donantes y aceptores) son predictores importantes de una buena biodisponibilidad oral, independientemente del peso molecular. El límite de peso molecular comúnmente aplicado en 500 no separa significativamente los compuestos con poca biodisponibilidad oral de aquellos con valores aceptables en este extenso conjunto de datos. El análisis de Veber y colaboradores en roedores sugieren seguir los siguientes dos criterios: 10 o menos enlaces giratorios y tener un área de superficie polar igual o menor a 140 \AA^2 (o 12 o menos donantes y aceptores de enlaces H) tendrán una alta probabilidad de buena biodisponibilidad oral [112].

Tabla 18. Propiedades fisicoquímicas.

Propiedades fisicoquímicas						
Compuesto	Peso molecular (g/mol)	No. de enlaces rotables	Aceptores de p. de H	Donadores de p. de H	Refractividad molar	TPSA (A^2)
Antagonistas de referencia						
I-Vem	489.92	7	6	2	124.21	100.30
I-Sor	448.70	9	10	0	86.26	9.23
I-Dra	519.56	6	8	2	129.24	147.48
I-Oxi	350.27	4	6	0	93.09	3.24
I-XL2	462.89	5	5	3	127.48	107.55
Aminoésteres seleccionados						
E-His	551.76	5	6	2	155.48	99.46
E-Pro	511.74	3	5	1	150.36	56.79
E-Tyr	577.79	5	6	2	165.36	91.01
E-Trp	600.83	5	5	2	175.19	86.57

Fur	456.66	6	4	1	133.01	55.76
F-Tyr	619.83	11	7	2	176.77	108.08
F-Trp	642.87	11	6	2	186.61	103.64
P-Phe	645.87	10	7	1	184.56	104.92
B-Phe	491.66	5	5	1	140.49	78.62
B-Tyr	507.66	5	6	2	142.51	98.85
B-Trp	530.70	5	5	2	152.35	94.41

Profundizando un poco en los resultados otorgados por SwissADME, el peso molecular de los fármacos, a excepción del I-Vem y el I-Dra (en mucho menor medida), están por debajo de los 500 g/mol; por su parte, los aminoésteres analizados tuvieron, en su mayoría, un peso molecular mayor a 500 g/mol, siendo los más pesados los pertenecientes a la familia furostánica y los más ligeros los compuestos bisnorlactónicos, donde el B-Phe fue el único menor a 500. El número de enlaces rotables para los antagonistas fue menor al promedio recomendado (10 enlaces), quitando a la bisamida de vemurafenib; al mismo tiempo, a excepción del F-Tyr y F-Trp, todas las moléculas estudiadas se mantuvieron en el rango sugerido por Veber. Los fármacos tuvieron una suma de puentes de hidrógeno menor a 12; mientras que las moléculas esteroideas consiguieron los mismos resultados. Para finalizar con el área superficial molar, los inhibidores de referencia reportaron valores menores de 140 Å², a excepción del vemurafenib y dabrafenib; igualmente, todas las moléculas evaluadas estuvieron debajo del valor estimado, pues el área de superficie polar reducida se correlaciona mejor con el aumento de la tasa de penetración que con la lipofiliidad (Clog P), y el aumento del número de enlaces giratorios tiene un efecto negativo en la tasa de penetración celular [112] (Tabla 18).

4.5.3 Lipofiliidad e hidrosolubilidad

El coeficiente de partición entre el *n*-octanol y el agua ($\log P_{o/w}$) es el descriptor clásico de la *lipofiliidad* [109], [113], [114], el cual está muy implicado en el transporte de fármacos en y su interacción con receptores [115]. SwissADME da acceso a cinco modelos predictivos disponibles para calcular este parámetro, pero basándose en las características de los compuestos empleados, solo se utilizaron 3 modelos: WLOGP, un método puramente atomístico basado en el sistema fragmentario de Wildman y Crippen; MLOGP [116], un arquetipo de método topológico que se basa en una relación lineal con 13 descriptores moleculares específicos; y SILICOS-IT, un método híbrido que se basa en 27 fragmentos y 7 descriptores topológicos [109].

La hidrosolubilidad es una de las propiedades físicas clave de interés para la captación/distribución de compuestos biológicamente activos en la eficacia viva y la comercialización [111]. Para los proyectos de descubrimiento dirigidos a la administración oral, la solubilidad es una propiedad importante que influye en la absorción [109]. Los métodos topológicos de SwissADME empleados para este análisis para predecir la

solubilidad en agua incluyó a ESOL, el cual involucra parámetros como $\log P_{\text{octanol}}$ calculado, seguido del peso molecular, la proporción de átomos pesados en los sistemas aromáticos y el número de enlaces giratorios [117]; y el modelo desarrollado por SILICOS-IT.

Tabla 19. Lipofilicidad y solubilidad en agua

Lipofilicidad y solubilidad en agua					
Compuesto	Lipofilicidad			Hidrosolubilidad	
	WLOP	MLOP	SILICOS-IT	Log S (ESOL)	SILICOS-IT
Fármacos de referencia					
I-Vem	7.27	3.14	5.78	-6.02	-10.07
I-Sor	-0.84	1.88	1.38	-3.48	-3.61
I-Dra	7.52	2.94	5.51	-6.16	-9.57
I-Oxi	-4.39	2.77	0.57	-3.13	-3.04
I-XL2	3.88	3.23	3.74	-5.31	-8.13
Aminoésteres seleccionados					
E-His	5.56	3.67	4.52	-6.49	-6.06
E-Pro	5.64	4.93	4.71	-6.83	-5.58
E-Tyr	6.54	4.84	5.13	-7.59	-6.61
E-Trp	7.32	5.03	6.12	-8.08	-8.04
Fur	6.19	4.68	5.45	-5.72	-5.38
F-Tyr	7.01	4.63	6.39	-7.32	-7.49
F-Trp	7.79	4.82	7.39	-7.81	-8.92
P-Phe	7.12	4.63	6.68	-7.72	-7.75
B-Phe	5.22	4.79	4.65	-6.44	-6.18
B-Tyr	4.92	4.24	4.18	-6.31	-5.59
B-Trp	5.70	4.46	5.18	-6.81	-7.02

Los valores otorgados por la plataforma demostraron que, para los fármacos, tuvieron cifras variadas entre ellos en los parámetros de lipofilicidad e hidrosolubilidad, contando con 2 medicamentos considerados como pobremente hidrosolubles, el I-Vem e I-Dra; uno moderadamente soluble (I-XL2) y 2 antagonistas solubles en medio acuoso (I-Sor e I-Oxi). En contraparte, los aminoésteres esteroideos se caracterizaron por tener valores de lipofilicidad elevados y, por ende, valores de insolubilidad muy negativos, donde los menos solubles en agua fueron los compuestos de la familia furostánica, y los más hidrosolubles, pero aún pasados del radar de biodisponibilidad, las moléculas bisnorlactónicas (Tabla 19). Por lo tanto, las moléculas diseñadas se pueden considerar como liposolubles, de hecho, la mayoría sobrepasan el valor máximo en el radar de biodisponibilidad, lo cual favorece su entrada a las células atravesando la doble membrana fosfolipídica, pero no en la distribución en el medio acuoso del organismo.

4.5.4 Farmacocinética

Otra sección muy importante que ofrece SwissADME es la determinación probabilística de las propiedades farmacocinéticas más elementales, como la absorción gastrointestinal, permeabilidad de membranas, inhibición de monoxigenasas, entre otras. Las predicciones para la absorción gastrointestinal humana pasiva (HIA) y la permeación de la barrera hematoencefálica (BBB) consisten en la lectura del modelo “*Boiled Egg*” [110], un modelo de clasificación gráfico, del cual se profundizará más adelante. Igualmente, el conocimiento acerca de los compuestos que son sustrato o no de la glicoproteína de permeabilidad (P-gp) es clave para evaluar la salida activa a través de las membranas biológicas, por ejemplo, del tracto gastrointestinal. Además, otro elemento valioso es el coeficiente de permeabilidad en piel (K_p), un modelo es una regresión lineal múltiple, el cual, mientras más negativo sea el $\log K_p$, menos permeable a la piel es la molécula [109].

Por último, también es fundamental el conocimiento sobre la interacción de las moléculas con los citocromos de la familia P450 (CYP450). Esta superfamilia de isoenzimas son capaces de catalizar la biotransformación oxidativa de la mayoría de los fármacos y otros xenobióticos lipofílicos [118], fungiendo como un actor clave en la eliminación de fármacos a través de la biotransformación metabólica [119]. Se estima que del 50 al 90% de las moléculas terapéuticas son sustrato de cinco isoformas principales (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) [109]. La inhibición de estas isoenzimas es sin duda una de las principales causas de las interacciones farmacocinéticas relacionadas con la farmacocinética, pues durante la fase oxidativa del metabolismo de ciertos fármacos, algunos tienen la capacidad de aumentar o disminuir la actividad de las enzimas del CYP450 [120], dando lugar a efectos adversos tóxicos u otros no deseados debido a la menor depuración y acumulación del fármaco o sus metabolitos. La inhibición de CYP450 se puede clasificar como reversible (incluida la inhibición competitiva y no competitiva) o irreversible (o casi irreversible), como la inhibición basada en mecanismos [121]. Se han identificado numerosos inhibidores de las isoformas de CYP, algunos afectan a diferentes isoformas de CYP, mientras que otros compuestos muestran selectividad por isoenzimas específicas. Por lo tanto, es de gran importancia para el descubrimiento de fármacos predecir la propensión con la que la molécula provocará interacciones farmacológicas significativas a través de la inhibición de los CYP y determinar qué isoformas se ven afectadas [109]. En la tabla se observan los resultados de farmacocinética obtenidos.

Tabla 20. Farmacocinética de los mejores compuestos

Farmacocinética de los mejores compuestos.									
Molec.	Absorción G. I.	Absorción B. H. E.	P-GP	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	Log <i>K_p</i> (cm/s)
Antagonistas de referencia									
I-Vem	Baja	No	No	No	Si	Si	No	Si	-5.76
I-Sor	Baja	No	No	No	No	No	No	Si	-7.40
I-Dra	Baja	No	No	No	Si	Si	No	Si	-6.08
I-Oxi	Baja	No	No	No	No	Si	No	Si	-6.88
I-XL2	Alta	No	Si	No	No	Si	Si	Si	-6.35
Aminoésteres seleccionados									
E-His	Alta	No	Si	No	No	No	No	No	-5.76
E-Pro	Alta	No	No	No	No	No	No	No	-4.90
E-Tyr	Baja	No	No	No	No	No	No	No	-4.88
E-Trp	Baja	No	No	No	No	No	No	No	-4.68
Fur	Alta	No	No	No	No	No	No	No	-5.20
F-Tyr	Baja	No	Si	No	No	No	No	Si	-5.27
F-Trp	Baja	No	No	No	No	No	No	Si	-5.07
P-Phe	Baja	No	Si	No	No	No	No	Si	-5.23
B-Phe	Alta	No	Si	No	No	Si	No	No	-5.07
B-Tyr	Alta	No	Si	No	No	No	No	No	-5.42
B-Trp	Alta	No	Si	No	No	Si	No	No	-5.21

Dentro de los valores reportados, los inhibidores de referencia, quitando a XL281, tuvieron una baja absorción gastrointestinal y no fueron sustratos de P-Gp; ninguno fue permeable de la barrera hematoencefálica; y todos demostraron inhibir por lo menos a una enzima del CYP450, en donde el fármaco que registró un mayor número de inhibiciones fue el I-XL2 con 3 (CYP2C9, CYP2D6 y CYP3A4), y el que menos lo hizo fue el sorafenib, bloqueando solo a CYP3A4, siendo de hecho está última enzima inhibida por todos los antagonistas; y finalizando con el log *K_p* de los antagonistas, se mantuvieron en un rango de -5.5 y -7.5, siendo el I-Sor aquel con el coeficiente más bajo, es decir el menos permeable en piel, y el I-Dra el más alto de los 5 medicamentos. Pasando con los compuestos esteroidales, prácticamente la mitad de ellos consiguieron una absorción alta, destacándose la parte de los aminoésteres de la familia espiroestánica y bisnorlactónica; no resultaron ser permeables a la BHE; 6 moléculas fueron sustratos de P-Gp, en especial las bisnorlactonas; en general, la mayoría de los compuestos no son inhibidores de las monooxigenasas de CYP P450, solo contemplándose valores positivos en la CYP2C9 por parte de los aminoésteres bisnorlactónicos (B-Phe y B-Trp), y en la CYP3A4 en los 3 furostanos; por último, las cifras del log *K_p* estuvieron en un promedio de -5.5 cm/s, considerándose como moléculas poco permeables a la piel (Tabla 20).

4.5.5 “Druglikeness”

Como se definió anteriormente, la "similitud de un fármaco" evalúa cualitativamente la posibilidad de que una molécula se convierta en un fármaco oral con respecto a la biodisponibilidad, establecidas a partir de inspecciones estructurales o fisicoquímicas de compuestos en desarrollo. Esta noción se emplea habitualmente para realizar el filtrado de bibliotecas químicas para excluir moléculas con propiedades muy probablemente incompatibles con un perfil farmacocinético aceptable [109]. En esta penúltima sección de la plataforma se da acceso a cinco filtros diferentes basados en reglas, con diversas gamas de propiedades dentro de las cuales la molécula se define como similar a un fármaco. Los métodos empleados por SwissADME son los siguientes:

- a) **Ghose** (Amgen), que desarrolla una caracterización cuantitativa basada en perfiles de propiedades fisicoquímicas computadas, como log P, refractividad molar, peso molecular y número de átomos, así como una caracterización cualitativa basada en la aparición de grupos funcionales y subestructuras importantes [122].
- b) **Veber** (GSK), cuyo estudio sugiere dos criterios de tener 10 o menos enlaces giratorios y (2) área de superficie polar igual o menor a 140 Å² (o 12 o menos donantes y aceptores de enlaces H) para tener una alta probabilidad de buena biodisponibilidad oral en la rata [112].
- c) **Egan**, basado en PSA y AlogP98, considerando procesos físicos involucrados en la permeabilidad de la membrana y las interrelaciones y redundancias entre los descriptores disponibles [123].
- d) **Muegge** (Bayer), el cual aplica el filtro de puntos de farmacóforo que proporciona una razón estructural detallada para la clasificación de cada molécula como fármaco o no fármaco [124].
- e) **Lipinski**, siendo el modelo de referencia de otros métodos, fundamentándose en el descubrimiento de la "regla de 5" predice que la absorción o permeación deficientes es más probable cuando hay más de 5 donantes de enlaces H, 10 aceptores de enlaces H, el peso molecular (MWT) es superior a 500 y el Log calculado P (CLogP) es mayor que 5 (o MlogP.4.15) [125].

También, se encuentra la puntuación de biodisponibilidad, el cual busca predecir la probabilidad de que un compuesto tenga al menos un 10 % de biodisponibilidad oral en ratas [109].

Tabla 21. Reglas empíricas de druglikeness

Reglas empíricas de druglikeness						
Molécula	Lipinski	Ghose	Egan	Muegge	Veber	Biodisponibilidad
Fármacos de referencia						
I-Vem	Si; 0 violaciones	No; 2 violaciones: MW>480, WLOGP>5.6	No; 1 violación: WLOGP>5.88	Si	Si	0.55
I-Sor	Si; 0 violaciones	No; 1 violación: WLOGP<-0.4	Si	Si	Si	0.55
I-Dra	Si, 1 violación: MW>500	No; 2 violaciones: MW>480, WLOGP>5.6	No; 2 violaciones: WLOGP>5.88 , TPSA>131.6	Si	No; 1 violación: TPSA>140	0.55
I-Oxi	Si; 0 violaciones	No; 1 violación: WLOGP<-0.4	Si	Si	Si	0.55
I-XL2	Si; 0 violaciones	Si	Si	Si	Si	0.55
Aminoésteres seleccionados						
E-His	Si, 1 violación: MW>500	No; 3 violaciones: MW>480, MR>130, #átomos>70	Si	No; 1 violación: XLOGP3>5	Si	0.55
E-Pro	No; 2 violaciones: MW>500, MLOGP>4.15	No; 4 violaciones: MW>480, WLOGP>5.6, MR>130, # átomos >70	Si	No; 1 violación: XLOGP3>5	Si	0.17
E-Tyr	No; 2 violaciones: MW>500, MLOGP>4.15	No; 4 violaciones: MW>480, WLOGP>5.6, MR>130, # átomos >70	No; 1 violación: WLOGP>5.88	No; 1 violación: XLOGP3>5	Si	0.17
E-Trp	No; 2 violaciones: MW>500, MLOGP>4.15	No; 4 violaciones: MW>480, WLOGP>5.6, MR>130, # átomos >70	No; 1 violación: WLOGP>5.88	No; 3 violaciones: : MW>600, XLOGP3>5, #anillos>7	Si	0.17
Fur	Si, 1 violación: MLOGP>4.15	No; 3 violaciones: WLOGP>5.6, MR>130, #átomos>70	No; 1 violación: WLOGP>5.88	No; 1 violación: XLOGP3>5	Si	0.55

F-Tyr	No; 2 violaciones: MW>500, MLOGP>4.15	No; 4 violaciones: MW>480, WLOGP>5.6, MR>130, # átomos >70	No; 1 violación: WLOGP>5.88	No; 2 violaciones : MW>600, XLOGP3> 5	No; 1 violación: Rotors>10	0.17
F-Trp	No; 2 violaciones: MW>500, MLOGP>4.15	No; 4 violaciones: MW>480, WLOGP>5.6, MR>130, # átomos >70	No; 1 violación: WLOGP>5.88	No; 2 violaciones : MW>600, XLOGP3> 5	No; 1 violación: Rotors>10	0.17
P-Phe	No; 2 violaciones: MW>500, MLOGP>4.15	No; 4 violaciones: MW>480, WLOGP>5.6, MR>130, # átomos >70	No; 1 violación: WLOGP>5.88	No; 2 violaciones : MW>600, XLOGP3> 5	Si	0.56
B-Phe	Si, 1 violación: MLOGP>4.15	No; 3 violaciones: MW>480, MR>130, #átomos>70	Si	No; 2 violaciones : MW>600, XLOGP3> 5	Si	0.55
B-Tyr	No; 2 violaciones: MW>500, MLOGP>4.15	No; 3 violaciones: MW>480, MR>130, #átomos>70	Si	No; 1 violación: XLOGP3> 5	Si	0.17
B-Trp	No; 2 violaciones: MW>500, MLOGP>4.15	No; 4 violaciones: MW>480, WLOGP>5.6, MR>130, # átomos >70	Si	No; 1 violación: XLOGP3> 5	Si	0.17

Basado en las propiedades fisicoquímicas para cada molécula, las reglas empíricas en las que nos basamos para contemplar este análisis fue Mugge, Egan y, para algunas moléculas, la regla de los 5 de Lipinski, por lo que, aunque se observen varias violaciones en el método de Ghose, no son relevantes ya que este no es aplicable para compuestos hidrofóbicos y anticancerígenos, como lo son estas moléculas del presente estudio.

Comenzando con los fármacos, tanto en los modelos de Lipinski, Veber y Muegge no se presentaron violaciones, salvo en el método de Egan que hubo violaciones a la elevada lipofilicidad y TPSA para el vemurafenib y el dabrafenib. En cuanto a las moléculas

evaluadas, en términos generales, las 11 demostraron la misma tendencia en todos los métodos farmacocinéticos de poseer violaciones por su gran lipofilia y, la mayor parte, considerable peso molecular, pasando los 500 g/mol o 600 g/mol en el caso de Muegge. A su vez, para los furostanos de tirosina y triptófano también apareció la violación de contener más de 10 enlaces rotables en su estructura y, terminando con la puntuación de biodisponibilidad, solo 4 compuestos lograron una cifra mayor a 0.50, un aminoéster de cada familia, representando un buen resultado (Tabla 21).

4.5.6 Boiledegg

Para finalizar con el análisis ADME, el diagrama de “Boiled Egg” es un método intuitivo para predecir simultáneamente dos parámetros clave de ADME: la absorción gastrointestinal pasiva (HIA) y el acceso a la barrera hematoencefálica (BBB). El gráfico de clasificación en forma de huevo incluye la yema (es decir, el espacio fisicoquímico para la permeación altamente probable de BBB) y la clara (el espacio fisicoquímico para la absorción altamente probable de HIA). Ambos compartimentos no son mutuamente excluyentes y la región gris exterior representa moléculas con propiedades que implican una baja absorción prevista y una penetración limitada en el cerebro. Además, los puntos están coloreados en azul si se pronostica como salida activa de P-gp (PGP+) y en rojo si se predice como no sustrato de P-gp (PGP-) [110]. En los Gráficos 19 y 20 se muestran los diagramas de de “Boiled Egg” de los aminoésteres esteroidales y los inhibidores de referencia respectivamente.

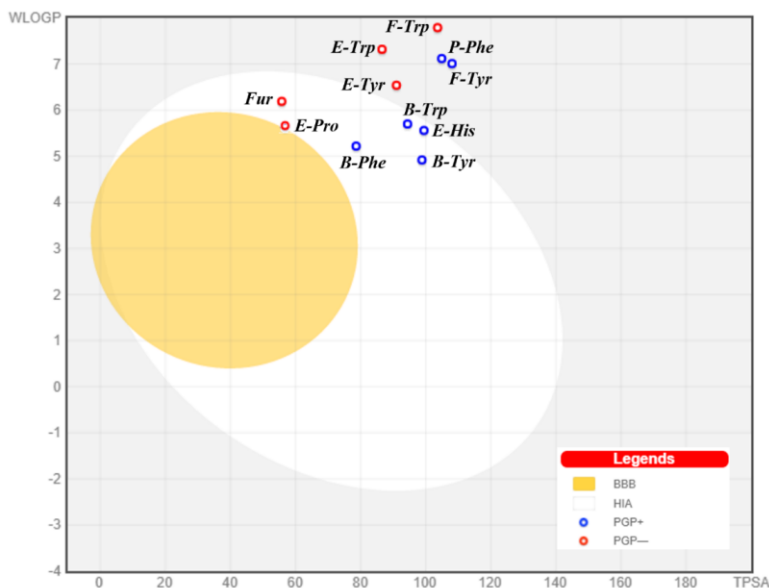


Gráfico 19. Diagrama Boiled Egg de los aminoésteres esteroidales seleccionados.

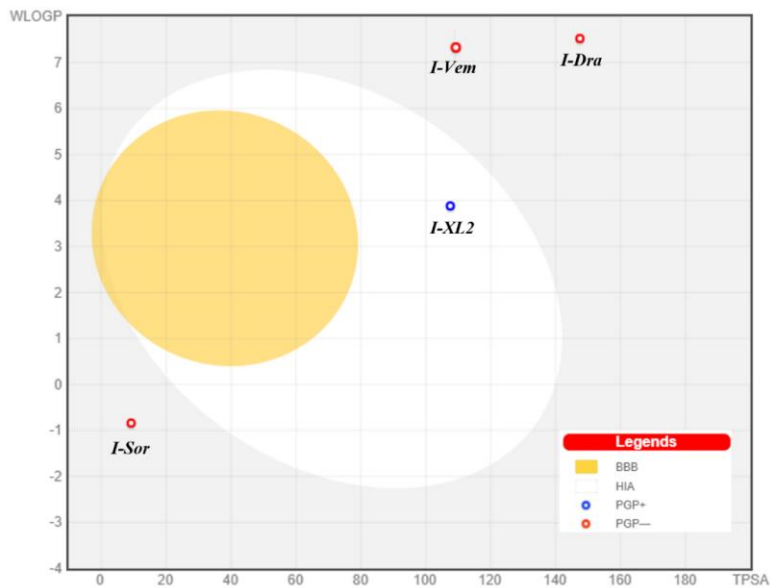


Gráfico 20. Diagrama Boiled Egg de los fármacos de referencia.

De los 11 compuestos analizados, 6 estuvieron en el área de absorción gastrointestinal, donde el E-Pro se localizó muy cerca de la permeabilidad del cerebro, en donde 3 pertenecieron a la familia bisnorlactónica y 2 a la espiroestánica. Cabe destacar que más de la mitad de las moléculas fueron sustratos de la P-Gp, y 4 de ellos dentro de la zona blanca (Gráfico 19).

En el caso de los inhibidores de referencia, solo el medicamento XL281 consiguió entrar en “clara del huevo”, es decir, es el único altamente absorbible en el tracto gastrointestinal, además de ser P-Gp positivo. Por otro lado, I-Vem e I-Dra por su alta lipofilia y valor de TPSA no ingresaron al área blanca, así como el I-Sor, con la diferencia de que su lipofilia y TPSA fue mucho menor. El I-Oxi no apareció en el diagrama (Gráfico 20).

5 CONCLUSIONES

El estudio de docking molecular con los 105 aminoésteres esteroideos comprobó que los valores energéticos más altos se registraron para las moléculas *E-Tyr*, *E-Trp*, *F-Trp* (todas con un valor -10.1 kcal/mol) y *B-Trp* (-10.9 kcal/mol), siendo esta última la más alta del total de moléculas estudiadas. En cuanto al análisis estadístico, se demostró que la familia espirostánica tuvo la media absoluta más alta; el tipo de aminoácido con el promedio más sobresaliente perteneció a las moléculas aromáticas; y aunado a esta última conclusión, los compuestos con las medias más elevadas y con mayor diferencia estadísticamente significativa se registraron aquellos que contenían los aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano; sugiriendo una mayor afinidad de las moléculas ligadas con estos 3 aminoácidos con BRAF^{V600E}, así como con los aminoésteres de la familia espirostánica.

Pasando con las curvas ROC, las 5 familias presentaron una tendencia bastante similar, en las cuales los grupos analizados obtuvieron un AUC mayor a 0.5 para el I-XL2, en donde los máximos valores reportados fueron de 0.80 y 0.78, correspondientes las familias furostánica y piránica respectivamente, siendo los dos únicos test buenos para ese fármaco. En adición, el grupo de las bisnorlactonas también logró un test no azaroso para el I-Dra, con un valor de 0.75 de AUC, convirtiéndolo en una curva ROC regular.

En el análisis de interacciones entre BRAF^{V600E} y las moléculas candidatas, se consideró que los residuos más importantes, tomando en cuenta que fueron los que más coincidieron entre la gran parte de moléculas de las 4 familias probadas en esta sección del estudio y que fueron los residuos localizados en el “pocket” de unión de ATP y adenina, son los mencionados a continuación: *VAL A:471*, *LEU A:514*, *ILE A:463*, *ALA A:481*, *PHE A:583*, *SER A:535*, *SER A:536*, *SER A:465*, *CYS A:532*, *LYS B:483* y *ASN A:580*.

Posteriormente, las predicciones arrojadas por SwissADME indicaron que los mejores aminoésteres esteroideos, en términos generales, tuvieron un peso molecular ligeramente superior a 500 g/mol y valores de TPSA menores a 140 Å²; se calificaron como compuestos liposolubles, siendo las 3 moléculas de la familia bisnorlactónica ligeramente más hidrosolubles que las demás. En cuando a sus cualidades farmacocinéticas, solo los aminoésteres espirostánicos y bisnorlactónicos resultaron ser absorbibles en el tracto gastrointestinal, además de que varias moléculas estas dos familias también fueron sustratos de P-Gp; y no fueron inhibidores de la mayoría de las isoenzimas del citocromo P450.

Finalmente, acorde con todo este estudio realizado, se concluye que los compuestos hits que podrían ser empleados como fármacos para antagonizar a BRAF^{V600E}, debido a sus características de afinidad, interaccionales y farmacocinéticas comprobadas, serían las moléculas *E-Tyr*, *E-Trp* y *B-Trp*. Consideramos que el siguiente paso en este trabajo, en un futuro próximo, sería realizar la síntesis orgánica de las moléculas hit en el laboratorio, para una posterior evaluación biológica en líneas celulares de cáncer de tiroides papilar.

6 Anexos

Anexo 1: Energía de afinidad de los compuestos en CB-Dock

Tabla 22. Energía de afinidad de los aminoésteres esteroideos en CB-Dock.

Energía de afinidad de los aminoésteres esteroideos en CB-Dock.

Fármaco/ Aminoácido/ Esteroides	Energía de afinidad (kcal/mol) de las familias esteroideas.				
	Bisnorlactónica	Colestánica	Espirostánica	Furostánica	Piránica
<i>Vemurafenib</i>			-12.6		
<i>Sorafenib</i>			-11.3		
<i>Dabrafenib</i>			-11.2		
<i>Oxima</i>			-10.8		
<i>XL281</i>			-9.2		
<i>Bisnorlactona</i>	-9.1	—	—	—	—
<i>Colestano</i>	—	-8.6	—	—	—
<i>Espirostano</i>	—	—	-8.8	—	—
<i>Furostano</i>	—	—	—	-9.4	—
<i>Pirano</i>	—	—	—	—	-7
<i>Alanina</i>	-8.4	-8.8	-8.6	-9.1	-7.5
<i>Arginina</i>	-8.4	-7.4	-8.7	-8.5	-7.8
<i>Asparagina</i>	-8.6	-7.3	-8.8	-8.8	-7.6
<i>Ácido aspártico</i>	-8.5	-7.1	-8.3	-8.8	-7.7
<i>Cisteína</i>	-8.8	-8.4	-8	-8.5	-7.0
<i>Fenilalanina</i>	-9.1	-8.6	-9.2	-9.2	-9.7
<i>Glicina</i>	-8.4	-8.9	-8.4	-8.9	-7.2
<i>Ácido glutámico</i>	-7.8	-7.0	-8.7	-9.0	-7.6
<i>Glutamina</i>	-8.3	-7.7	-8.8	-9.1	-8.3
<i>Histidina</i>	-9.2	-8.2	-9.3	-9.3	-8.2
<i>Isoleucina</i>	-8.5	-8	-8.9	-8.8	-7.5
<i>Leucina</i>	-8.6	-8.3	-8.5	-8.7	-8.3
<i>Lisina</i>	-8	-7.8	-8.2	-8.3	-7.2
<i>Metionina</i>	-8.3	-6.9	-7.8	-8.3	-7.4
<i>Prolina</i>	-8.7	-7.9	-9	-9.4	-7.8
<i>Serina</i>	-8.4	-8.1	-8.5	-8.5	-7.3
<i>Tirosina</i>	-9.8	-8.4	-9.7	-9.2	-9.4
<i>Treonina</i>	-8.5	-6.9	-8.6	-9	-7.6
<i>Triptófano</i>	-10.9	-8.8	-10.2	-9.5	-9.7
<i>Valina</i>	-8.5	-7.8	-8.8	-8.8	-8.1

7 BIBLIOGRAFÍA

- [1] T. Valarmathi, R. Premkumar, M. R. Meera, and A. Milton Franklin Benial, "Spectroscopic, quantum chemical and molecular docking studies on 1-amino-5-chloroanthraquinone: A targeted drug therapy for thyroid cancer," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 255, p. 119659, 2021, doi: 10.1016/j.saa.2021.119659.
- [2] Justos contra el cáncer, "Panorama del cáncer en México," 2017. <https://juntoscontraelcancer.mx/panorama-del-cancer-en-mexico/> (accessed Jan. 07, 2022).
- [3] W. S. Klug, M. R. Cummings, and C. A. Spencer, *Conceptos de genética.*, 10.º Edici. Madrid: Pearson (103, 203), 2013.
- [4] F. Liotti, C. Visciano, and R. M. Melillo, "Inflammation in thyroid oncogenesis.," *Am. J. Cancer Res.*, vol. 2, no. 3, pp. 286–97, 2012, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22679559> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3365810>.
- [5] Rotary E-Club, "Conozca sobre el cáncer," 2022. <https://portal.clubrunner.ca/7988/Stories/conozca-sobre-el-cancer> (accessed Jan. 23, 2022).
- [6] S. Chen *et al.*, "VCAM-1 Upregulation Contributes to Insensitivity of Vemurafenib in BRAF-Mutant Thyroid Cancer," *Transl. Oncol.*, vol. 13, no. 2, pp. 441–451, 2020, doi: 10.1016/j.tranon.2019.10.007.
- [7] M. Xing, "Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 321, no. 1, pp. 86–93, 2010.
- [8] M. E. Cabanillas, D. G. McFadden, and C. Durante, "Thyroid cancer," *Lancet*, vol. 388, no. 10061, pp. 2783–2795, 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(16)30172-6.
- [9] Y. E. Nikiforov and M. N. Nikiforova, "Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer," *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 7, no. 10, pp. 569–580, 2011, doi: 10.1038/nrendo.2011.142.
- [10] M. Xing, "Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 3, pp. 184–199, 2013, doi: 10.1038/nrc3431.
- [11] J. A. Fagin and J. C. R. Filho, "Oncogenic events and therapeutic targets in thyroid cancer," in *Molecular Oncology: Causes of Cancer and Targets for Treatment*, no. 9, 2015, pp. 704–711.
- [12] R. Rahbari, L. Zhang, and E. Kebebew, "Thyroid cancer gender disparity," *Futur. Oncol.*, vol. 6, no. 11, pp. 1771–1779, 2010, doi: 10.2217/fon.10.127.
- [13] R. Z. H. Brana and D. B. Evans, "Thyroid and adrenal cancer," in *Handbook of Advanced Cancer Care*, 2010, pp. 294–299.
- [14] M. Saiselet *et al.*, "Thyroid cancer cell lines: An overview," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 3, no. NOV, pp. 1–9, 2012, doi: 10.3389/fendo.2012.00133.
- [15] R. Sa, R. Liang, X. Qiu, Z. He, Z. Liu, and L. Chen, "IGF2BP2-dependent activation of ERBB2 signaling contributes to acquired resistance to tyrosine kinase inhibitor in differentiation therapy of radioiodine-refractory papillary thyroid cancer," *Cancer Lett.*, vol. 527, no. September 2021, pp. 10–23, 2022, doi: 10.1016/j.canlet.2021.12.005.
- [16] A. L. Melck, L. Yip, and S. E. Carty, "The Utility of BRAF Testing in the Management of Papillary Thyroid Cancer," *Oncologist*, vol. 15, no. 12, pp. 1285–1293, 2010, doi: 10.1634/theoncologist.2010-0156.
- [17] M. Rebaï and A. Rebaï, "Molecular genetics of thyroid cancer," *Genet. Res. (Camb)*, vol. 98, no. 2016, 2016, doi: 10.1017/S0016672316000057.
- [18] J. R. W. Martínez *et al.*, "The Combination of RET, BRAF and Demographic Data Identifies Subsets of Patients with Aggressive Papillary Thyroid Cancer," doi: 10.1007/s12672-019-0359-8.
- [19] J. A. Fagin and S. A. Wells Jr, "Biologic and clinical perspectives on thyroid cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 375, no. 11, pp. 1054–1067, 2016.
- [20] L. M. Caronia, J. E. Phay, and M. H. Shah, "Role of BRAF in thyroid oncogenesis," *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 24, pp. 7511–7517, 2011, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1155.
- [21] T. H. Kim *et al.*, "The association of the BRAFV600E mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: A meta-analysis," *Cancer*, vol. 118, no. 7, pp. 1764–1773, 2012, doi: 10.1002/cncr.26500.
- [22] L. Manzella *et al.*, "New insights in thyroid cancer and p53 family proteins," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 6, 2017, doi: 10.3390/ijms18061325.
- [23] V. Guarino, M. D. Castellone, E. Avilla, and R. M. Melillo, "Thyroid cancer and inflammation," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 321, no. 1, pp. 94–102, 2010, doi: 10.1016/j.mce.2009.10.003.

- [24] N. Mitsiades and J. A. Fagin, *Molecular Genetics of Thyroid Cancer: Pathogenetic Significance and Clinical Applications*. Elsevier Inc., 2010.
- [25] M. Wang *et al.*, “Potent antitumor activity of novel taxoids in anaplastic thyroid cancer,” *Endocrine*, 2021, doi: 10.1007/s12020-021-02880-1.
- [26] Instituto Nacional del Cáncer, “Tratamiento del cáncer de tiroides en adultos,” 2022. <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/tiroides/paciente/tratamiento-tiroides-pdq> (accessed Jan. 07, 2022).
- [27] Tailor Made Health, “Anaplastic Thyroid Cancer: Everything You Need To Know,” 2022. <https://tailormadehealth.com/anaplastic-thyroid-cancer-faqs/> (accessed Jan. 06, 2022).
- [28] G. Pellegriti, F. Frasca, C. Regalbuto, S. Squatrito, and R. Vigneri, “Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: Update on epidemiology and risk factors,” *J. Cancer Epidemiol.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/965212.
- [29] A. Magreni, D. V. Bann, J. R. Schubart, and D. Goldenberg, “The effects of race and ethnicity on thyroid cancer incidence,” *JAMA Otolaryngol. - Head Neck Surg.*, vol. 141, no. 4, pp. 319–323, 2015, doi: 10.1001/jamaoto.2014.3740.
- [30] American Cancer Society, “¿Qué tan común es el cáncer de tiroides?,” 2022. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-tiroides/acerca/estadisticas-clave.html#:~:text=Se diagnosticarán alrededor de 52%2C890,hombres y 40%2C170 en mujeres> (accessed Jan. 29, 2022).
- [31] L. Davies and H. G. Welch, “Current thyroid cancer trends in the United States,” *JAMA Otolaryngol. - Head Neck Surg.*, vol. 140, no. 4, pp. 317–322, 2014, doi: 10.1001/jamaoto.2014.1.
- [32] L. Fan, F. Meng, Y. Gao, and P. Liu, “Insufficient iodine nutrition may affect the thyroid cancer incidence in China,” *Br. J. Nutr.*, 2021, doi: 10.1017/S0007114521000593.
- [33] C. M. Kitahara and J. A. Sosa, “The changing incidence of thyroid cancer,” *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 12, no. 11, pp. 646–653, 2016, doi: 10.1038/nrendo.2016.110.
- [34] R. Vigneri, P. Malandrino, and P. Vigneri, “The changing epidemiology of thyroid cancer: Why is incidence increasing?,” *Curr. Opin. Oncol.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–7, 2015, doi: 10.1097/CCO.0000000000000148.
- [35] A. C. Vidaurri-Ojeda, J. Gómez-Hernández, M. M. Chávez-Hernández, A. González-Fondón, and M. V. Jiménez-Báez, “Cáncer de tiroides: Caracterización clínica y concordancia de pruebas diagnósticas,” no. 33, p. 7, 2016, [Online]. Available: <https://salud.groo.gob.mx/revista/revistas/33/03/03.pdf>.
- [36] C. I. Herrera Díaz and A. S. Caballero, “Cáncer de Tiroides,” in *Guidelines for the management of thyroid cancer*, 2014, p. 15.
- [37] H. Y. Suh, H. Choi, J. C. Paeng, G. J. Cheon, J. K. Chung, and K. W. Kang, “Comprehensive gene expression analysis for exploring the association between glucose metabolism and differentiation of thyroid cancer,” *BMC Cancer*, vol. 19, no. 1, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1186/s12885-019-6482-7.
- [38] FundaNatura, “Cómo resucitar tu tiroides y aumentar tu metabolismo,” 2022. <https://fundanatura.com/como-resucitar-tu-tiroides-y-aumentar-tu-metabolismo/#1484152089241-4a91a251-cb26> (accessed Jan. 24, 2021).
- [39] M. S. Khan, A. A. Pandith, S. R. Masoodi, K. A. Wani, M. Ul Hussain, and S. Mudassar, “Epigenetic silencing of TSHR gene in thyroid cancer patients in relation to their BRAF V600E mutation status,” *Endocrine*, vol. 47, no. 2, pp. 449–455, 2014, doi: 10.1007/s12020-014-0319-6.
- [40] H. Zhang and D. Chen, “Synergistic inhibition of MEK/ERK and BRAF V600E with PD98059 and PLX4032 induces sodium/iodide symporter (NIS) expression and radioiodine uptake in BRAF mutated papillary thyroid cancer cells,” *Thyroid Res.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–6, 2018, doi: 10.1186/s13044-018-0057-6.
- [41] P. Mondragón-Terán, L. B. López-Hernández, J. Gutiérrez-Salinas, J. A. Suárez-Cuenca, R. I. Luna-Ceballos, and A. E. Valle-Solís, “Mecanismos de señalización intracelular en cáncer de tiroides,” *Cir. Cir.*, vol. 84, no. 5, pp. 434–443, 2016.
- [42] J. Lee *et al.*, “Association Between Obesity and BRAFV600E Mutation Status in Patients with Papillary Thyroid Cancer,” *Oncol.*, vol. 22, pp. 683–690, 2015, doi: 10.1245/s10434-015-4765-z.
- [43] V. Batiza Resendiz *et al.*, “Preservación de la fertilidad: opinión de grupo de expertos en México,” *Rev. Iberoam. Fertil. y Reprod. humana*, vol. 37, no. 3–4, pp. e3–e33, 2020.
- [44] J. Kim, J. E. Gosnell, and S. A. Roman, “Geographic influences in the global rise of thyroid cancer,” *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 16, no. 1, pp. 17–29, 2020, doi: 10.1038/s41574-019-0263-x.
- [45] T. Galm, S. Minhas, R. J. Cullen, and H. Griffiths, “Thyroid cancer: Is ethnicity relevant?,” *J. Laryngol. Otol.*, vol. 125, no. 8, pp. 816–819, 2011, doi: 10.1017/S0022215111000752.

- [46] Maite Dominguez Ayala, "Mutación del gen BRAF V600E en el cáncer papilar de tiroides y su efecto en la terapia con yodo radiactivo," vol. 6, no. 4, pp. 3–9, 2018.
- [47] S. K. Jung, K. Kim, K. Tae, G. Kong, and M. K. Kim, "The effect of raw vegetable and fruit intake on thyroid cancer risk among women: A case-control study in South Korea," *Br. J. Nutr.*, vol. 109, no. 1, pp. 118–128, 2013, doi: 10.1017/S0007114512000591.
- [48] M. Govindammal, M. Prasath, and M. Selvapandiyan, "Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman) investigations, quantum chemical calculations, ADMET and molecular docking studies of phloretin with B-RAF inhibitor," *Chem. Pap.*, vol. 75, no. 8, pp. 3771–3785, 2021, doi: 10.1007/s11696-021-01576-0.
- [49] C. Y. Li *et al.*, "Synthesis, biological evaluation and 3D-QSAR studies of novel 4,5-dihydro-1H-pyrazole niacinamide derivatives as BRAF inhibitors," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 20, no. 12, pp. 3746–3755, 2012, doi: 10.1016/j.bmc.2012.04.047.
- [50] UniProtKB, "P15056 (BRAF_HUMAN)," 2021. <https://www.uniprot.org/uniprot/P15056> (accessed Jul. 16, 2021).
- [51] J. J. Liu *et al.*, "Synthesis, biological evaluation of novel 4,5-dihydro-2H-pyrazole 2-hydroxyphenyl derivatives as BRAF inhibitors," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 20, no. 20, pp. 6089–6096, 2012, doi: 10.1016/j.bmc.2012.08.020.
- [52] Z. Liu, T. Lv, C. Xie, and Z. Di, "BRAF V600E Gene Mutation Is Associated With Bilateral Malignancy of Papillary Thyroid Cancer," *Am. J. Med. Sci.*, vol. 356, no. 2, pp. 130–134, 2018, doi: 10.1016/j.amjms.2018.04.012.
- [53] G. Gulfidan *et al.*, "Systems biomarkers for papillary thyroid cancer prognosis and treatment through multi-omics networks," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 715, no. November 2021, p. 109085, 2022, doi: 10.1016/j.abb.2021.109085.
- [54] M. Lobo, "Ecografía de tiroides," *Rev. Médica Clínica Las Condes*, vol. 29, no. 4, pp. 440–449, 2018.
- [55] S. A. Foster *et al.*, "Activation Mechanism of Oncogenic Deletion Mutations in BRAF, EGFR, and HER2," *Cancer Cell*, vol. 29, no. 4, pp. 477–493, 2016, doi: 10.1016/j.ccell.2016.02.010.
- [56] T. N. Tanaka, S. K. Alloju, D. K. Oh, and E. E. W. Cohen, "Thyroid Cancer: Molecular Pathogenesis, Tyrosine Kinase Inhibitors, and Other New Therapies," *Am. J. Hematol. / Oncol.*, vol. 11, no. 4, pp. 5–9, 2015.
- [57] L. Stăncioiu, A. M. R. Gherman, I. Brezeștean, and N. E. Dina, "Vibrational spectral analysis of Sorafenib and its molecular docking study compared to other TKIs," *J. Mol. Struct.*, vol. 1248, 2022, doi: 10.1016/j.molstruc.2021.131507.
- [58] B. A. Umar, A. Uzairu, G. A. Shallangwa, and S. Uba, "Rational Drug Design of Potent V600E-Braf Kinase Inhibitors Through Molecular Docking Simulation," *J. Eng. Exact Sci.*, vol. 5, no. 5, pp. 0469–0481, 2019, doi: 10.18540/jcecv15iss5pp0469-0481.
- [59] PubChem, "Vemurafenib," 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/42611257> (accessed Jan. 10, 2022).
- [60] L. Durai, S. Ravindran, K. Arvind, D. Karunakaran, and R. Vijayalakshmi, "Synergistic effect of metformin and vemurafenib (PLX4032) as a molecular targeted therapy in anaplastic thyroid cancer: an in vitro study," *Mol. Biol. Rep.*, vol. 48, no. 11, pp. 7443–7456, 2021, doi: 10.1007/s11033-021-06762-7.
- [61] PubChem, "Sorafenib," 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/216239> (accessed Jan. 10, 2022).
- [62] T. M. Ullmann *et al.*, "Dual inhibition of BRAF and MEK increases expression of sodium iodide symporter in patient-derived papillary thyroid cancer cells in vitro," *Surg. (United States)*, vol. 167, no. 1, pp. 56–63, 2020, doi: 10.1016/j.surg.2019.04.076.
- [63] PubChem, "Dabrafenib," 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44462760> (accessed Jan. 10, 2022).
- [64] G. S. Falchook *et al.*, "BRAF inhibitor dabrafenib in patients with metastatic BRAF-mutant thyroid cancer," *Thyroid*, vol. 25, no. 1, pp. 71–77, 2015, doi: 10.1089/thy.2014.0123.
- [65] V. Subbiah *et al.*, "Dabrafenib and trametinib treatment in patients with locally advanced or metastatic BRAF V600-mutant anaplastic thyroid cancer," *J. Clin. Oncol.*, vol. 36, no. 1, pp. 7–13, 2018, doi: 10.1200/JCO.2017.73.6785.
- [66] Drug Bank, "(1E)-5-(1-piperidin-4-yl-3-pyridin-4-yl-1H-pyrazol-4-yl)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one oxime," 2021. <https://go.drugbank.com/drugs/DB08553> (accessed Jul. 09, 2021).
- [67] Drug Bank, "XL281," 2021. <https://go.drugbank.com/drugs/DB05190> (accessed Jul. 10, 2021).

- [68] Y. Yang, S. Laval, and B. Yu, *Chemical synthesis of saponins*, 1st ed., vol. 71. Elsevier Inc., 2014.
- [69] P. Dey *et al.*, "Therapeutic value of steroidal alkaloids in cancer: Current trends and future perspectives," *Int. J. Cancer*, vol. 145, no. 7, pp. 1731–1744, 2019, doi: 10.1002/ijc.31965.
- [70] M. S. Nafie, M. A. Tantawy, and G. A. Elmgeed, "Screening of different drug design tools to predict the mode of action of steroidal derivatives as anti-cancer agents," *Steroids*, vol. 152, p. 108485, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.steroids.2019.108485.
- [71] M. A. Ramos-Enrriquez, K. Vargas-Romero, L. Rárová, M. Strnad, and M. A. Iglesias-Arteaga, "Synthesis and in vitro anticancer activity of 23(23')E-benzylidenespirostanols derived from steroid sapogenins," *Steroids*, vol. 128, pp. 85–88, 2017, doi: 10.1016/j.steroids.2017.08.017.
- [72] P. Singla and D. B. Salunke, "Recent advances in steroid amino acid conjugates: Old scaffolds with new dimensions," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 187, p. 111909, 2020, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111909.
- [73] B. Yu, J. Liao, J. Zhang, and Y. Hui, "The first synthetic route to furostan saponins," *Tetrahedron Lett.*, vol. 42, no. 1, pp. 77–79, 2001, doi: 10.1016/S0040-4039(00)01889-X.
- [74] G. P. Moss, "International union of pure and applied chemistry and international union of biochemistry: Joint commission on biochemical nomenclature: Nomenclature of steroids," *Pure Appl. Chem.*, vol. 61, no. 10, pp. 1783–1822, 1989, doi: 10.1351/pac198961101783.
- [75] D. G. Rivera, O. Concepción, K. Pérez-Labrada, and F. Coll, "Synthesis of diamino-furostan sapogenins and their use as scaffolds for positioning peptides in a preorganized form," *Tetrahedron*, vol. 64, no. 22, pp. 5298–5305, 2008, doi: 10.1016/j.tet.2008.03.023.
- [76] Nomenclature Joint commission on Biochemical, "International Union of Pure and Applied Joint Commission on Biochemical Nomenclature *," *Pure Appl. Chem.*, vol. 56, no. 5, pp. 595–624, 1984.
- [77] B. Yu, P. P. Qi, X. J. Shi, L. H. Shan, D. Q. Yu, and H. M. Liu, "Discovery of novel steroidal pyran-oxindole hybrids as cytotoxic agents," *Steroids*, vol. 88, pp. 44–52, 2014, doi: 10.1016/j.steroids.2014.05.022.
- [78] Shamsuzzaman, A. M. Dar, Y. Khan, and A. Sohail, "Synthesis and biological studies of steroidal pyran based derivatives," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 129, pp. 36–47, 2013, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.09.004.
- [79] "Steroid Analysis," in *Steroid Analysis*, no. July, 2010.
- [80] M. Singh *et al.*, "Synthesis of diosgenin analogues as potential anti-inflammatory agents," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 143, pp. 323–333, 2014, doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.04.006.
- [81] D. S. Kim, B. K. Jeon, Y. E. Lee, W. H. Woo, and Y. J. Mun, "Diosgenin induces apoptosis in HepG2 cells through generation of reactive oxygen species and mitochondrial pathway," *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/981675.
- [82] M. K. Kanwar, A. Bajguz, J. Zhou, and R. Bhardwaj, "Analysis of Brassinosteroids in Plants," *J. Plant Growth Regul.*, vol. 36, no. 4, pp. 1002–1030, 2017, doi: 10.1007/s00344-017-9732-4.
- [83] Q. W. Chen *et al.*, "Structure and bioactivity of cholestane glycosides from the bulbs of *Ornithogalum saundersiae* Baker," *Phytochemistry*, vol. 164, no. May, pp. 206–214, 2019, doi: 10.1016/j.phytochem.2019.05.016.
- [84] I. Jastrzebska, "Synthesis and application of steroidal 22,16 β -carbolenones: A review," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 199, no. January, 2020, doi: 10.1016/j.jsbmb.2020.105592.
- [85] L. Rárová *et al.*, "Structure activity relationship studies on cytotoxicity and the effects on steroid receptors of AB-functionalized cholestanes," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 159, pp. 154–169, 2016, doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.03.017.
- [86] Y. Kim, S. Sengupta, and T. Sim, "Natural and synthetic lactones possessing antitumor activities," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 3, pp. 1–69, 2021, doi: 10.3390/ijms22031052.
- [87] K. Sato *et al.*, "Cytotoxic bisnor- and norditerpene dilactones having 7 α ,8 α - epoxy-9,11-enolide substructure from *Podocarpus macrophyllus* D. Don," *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 57, no. 7, pp. 668–679, 2009, doi: 10.1248/cpb.57.668.
- [88] L. G. Ferreira, R. N. Dos Santos, G. Oliva, and A. D. Andricopulo, *Molecular docking and structure-based drug design strategies*, vol. 20, no. 7. 2015.
- [89] J. de Ruyck, G. Brysbaert, R. Blossey, and M. F. Lensink, "Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel," *Adv. Appl. Bioinforma. Chem.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, 2016, doi: 10.2147/AABC.S105289.
- [90] O. Trott and A. J. Olson, "Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading," *J. Comput. Chem.*, vol. 31,2, pp. 455–461, 2010, doi: 10.1002/jcc.

- [91] M. Kontoyianni, L. M. McClellan, and G. S. Sokol, "Evaluation of Docking Performance: Comparative Data on Docking Algorithms," *J. Med. Chem.*, vol. 47, no. 3, pp. 558–565, 2004, doi: 10.1021/jm0302997.
- [92] P. H. M. Torres, A. C. R. Sodero, P. Jofily, and F. P. Silva-Jr, "Key topics in molecular docking for drug design," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 18, pp. 1–29, 2019, doi: 10.3390/ijms20184574.
- [93] Z. Ul-Haq, U. Mahmood, and S. Reza, "A combined 3D-QSAR and molecular docking strategy to understand the binding mechanism of V600EB-RAF inhibitors," *Mol. Divers.*, vol. 16, no. 4, pp. 771–785, 2012, doi: 10.1007/s11030-012-9395-9.
- [94] A. Vafae, A. Davoodnia, M. R. Bozorgmehr, and M. Pordel, "Characterization and Molecular Docking Study of New 4-Acetamidoalkyl Pyrazoles As B-Raf /Cox-2 Inhibitors," *J. Struct. Chem.*, vol. 59, no. 2, pp. 335–343, 2018, doi: 10.1134/S0022476618020117.
- [95] R. Grasso, M.J., Marmorstein, "BRAFV600E Kinase Domain In Complex with Chemically Linked Vemurafenib Inhibitor VEM-BISAMIDE," *Protein Data Bank*. 2016, doi: 10.2210/pdb5jt2/pdb.
- [96] M. Grasso *et al.*, "Chemically Linked Vemurafenib Inhibitors Promote an Inactive BRAFV600E Conformation," *ACS Chem. Biol.*, vol. 11, no. 10, pp. 2876–2888, 2016, doi: 10.1021/acscchembio.6b00529.
- [97] L. I. Echeverri, E. A. Arroyave, and F. H. Barajas, "Comparación De Pruebas De Normalidad.," *XXI Simp. Int. Estad.*, pp. 8–11, 2015.
- [98] Soporte de Minitab 18, "Prueba de normalidad," 2019. <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/statistics/basic-statistics/supporting-topics/normality/test-for-normality/> (accessed Jan. 17, 2022).
- [99] J. Santibáñez, "Pruebas de Cramér-von Mises y Anderson-Darling," *Cursos UNAM*, 2018. [http://sigma.iimas.unam.mx/jsantibanez/Cursos/Ciencias/2018_2/notas/no_parametrica/07_QEDF.html#\(6\)](http://sigma.iimas.unam.mx/jsantibanez/Cursos/Ciencias/2018_2/notas/no_parametrica/07_QEDF.html#(6)) (accessed Jan. 17, 2021).
- [100] J. Dagnino S., "Análisis de varianza," *Rev. Chil. Anest.*, vol. 43, no. 4, pp. 306–310, 2014, [Online]. Available: <https://revistachilenadeanestesiologia.cl/PII/revchilanestv43n04.07.pdf>.
- [101] L. J. Williams, "Newman-Keuls Test and Tukey Test 1 Pairwise Comparisons," *Encyclopedia Res. Des.*, vol. 1, no. January 2010, pp. 1–11, 2010.
- [102] Soporte de Minitab 18, "Interpretar los resultados clave para la ANOVA de un solo factor," 2019. <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/how-to/one-way-anova/interpret-the-results/key-results/> (accessed Jan. 17, 2022).
- [103] L. Gonçalves, A. Subtil, M. Rosário Oliveira, and P. De Zea Bermudez, "ROC curve estimation: An overview," *Revstat Stat. J.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–20, 2014.
- [104] Z. H. Hoo, J. Candlish, and M. D. Teare, "What is a ROC curve?," *Emerg. Med. J.*, 2017.
- [105] K. Hajian-Tilaki, "Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation," *Casp. J. Intern. Med.*, vol. 4, no. 2, pp. 627–635, 2013.
- [106] Y. Liu, "CB-Dock," 2021. <http://clab.labshare.cn/cb-dock/php/index.php> (accessed Jul. 09, 2021).
- [107] Biovia, "BIOVIA DISCOVERY STUDIO," 2022. <https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modeling-simulation/biovia-discovery-studio/> (accessed Jan. 18, 2022).
- [108] E. M. H. Ali *et al.*, "Design, synthesis, and biological evaluation of novel imidazole derivatives possessing terminal sulphonamides as potential BRAFV600E inhibitors," *Bioorg. Chem.*, vol. 106, no. November, p. 104508, 2021, doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104508.
- [109] A. Daina, O. Michielin, and V. Zoete, "SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. October 2016, pp. 1–13, 2017, doi: 10.1038/srep42717.
- [110] A. Daina and V. Zoete, "A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules," *ChemMedChem*, pp. 1117–1121, 2016, doi: 10.1002/cmdc.201600182.
- [111] J. Ali, P. Camilleri, M. B. Brown, A. J. Hutt, and S. B. Kirton, "Revisiting the general solubility equation: In silico prediction of aqueous solubility incorporating the effect of topographical polar surface area," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 52, no. 2, pp. 420–428, 2012, doi: 10.1021/ci200387c.
- [112] D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, and K. D. Kopple, "Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates," *J. Med. Chem.*, vol. 45, no. 12, pp. 2615–2623, 2002, doi: 10.1021/jm020017n.
- [113] T. Cheng *et al.*, "Computation of octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 47, no. 6, pp. 2140–2148, 2007, doi: 10.1021/ci700257y.

- [114] S. A. Wildman and G. M. Crippen, "Prediction of physicochemical parameters by atomic contributions," *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, vol. 39, no. 5, pp. 868–873, 1999, doi: 10.1021/ci9903071.
- [115] I. Moriguchi, S. Hirono, I. Nakagome, and H. Hirano, "Comparison of reliability of log P values for drugs calculated by several methods," *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 42, no. 4, pp. 976–978, 1994.
- [116] I. Moriguchi, S. HIRONO, Q. LIU, I. NAKAGOME, and Y. MATSUSHITA, "Simple method of calculating octanol/water partition coefficient," *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 40, no. 1, pp. 127–130, 1992.
- [117] J. S. Delaney, "ESOL: Estimating aqueous solubility directly from molecular structure," *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, vol. 44, no. 3, pp. 1000–1005, 2004, doi: 10.1021/ci034243x.
- [118] U. M. Zanger and M. Schwab, "Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation," *Pharmacol. Ther.*, vol. 138, no. 1, pp. 103–141, 2013, doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007.
- [119] M. J. Rodríguez Arcas, E. García-Jiménez, F. Martínez-Martínez, and P. Conesa-Zamora, "Role of CYP450 in pharmacokinetics and pharmacogenetics of antihypertensive drugs," *Farm. Hosp.*, vol. 35, no. 2, pp. 84–92, 2011, doi: 10.1016/j.farma.2010.05.006.
- [120] J. C. Rodríguez González and I. Rodeiro Guerra, "El sistema citocromo p450 y el metabolismo de xenobióticos," *Rev. Cuba. Farm.*, vol. 48, no. 3, pp. 495–507, 2014.
- [121] M. Deodhar *et al.*, "Mechanisms of cyp450 inhibition: Understanding drug-drug interactions due to mechanism-based inhibition in clinical practice," *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 9, pp. 1–18, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12090846.
- [122] A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, and J. J. Wendoloski, "A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases," *J. Comb. Chem.*, vol. 1, no. 1, pp. 55–68, 1999, doi: 10.1021/cc9800071.
- [123] W. J. Egan, K. M. Merz, and J. J. Baldwin, "Prediction of drug absorption using multivariate statistics," *J. Med. Chem.*, vol. 43, no. 21, pp. 3867–3877, 2000, doi: 10.1021/jm000292e.
- [124] I. Muegge, S. L. Heald, and D. Brittelli, "Simple selection criteria for drug-like chemical matter," *J. Med. Chem.*, vol. 44, no. 12, pp. 1841–1846, 2001, doi: 10.1021/jm015507e.
- [125] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, and P. J. Feeney, "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. SUPPL., pp. 4–17, 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.019.