



Universidad Católica de la Santísima Concepción Facultad de Medicina.

LA SOBREENPRESIÓN DE ZEB2 E ID2 GENERA RESISTENCIA A LOS QUIMIOTERAPÉUTICOS

POR

Adan Andreu Heredias

Tutor: Carlos Farkas

Co- Tutora: Valentina González

Evaluador externo: Teresa Caprile

Evaluador interno: Francisca Espinoza

2024

Concepción, Chile

Acta de tesis

Resumen

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia hematológica caracterizada por la acumulación de células inmaduras en la médula ósea, lo que interfiere con la hematopoyesis normal. A pesar de avances terapéuticos, su heterogeneidad genética y la resistencia a quimioterapéuticos siguen dificultando el tratamiento. ZEB2 ha sido identificado como un regulador clave de la diferenciación hematopoyética y la autorrenovación celular, funciones que podrían estar implicadas en la resistencia terapéutica. Dado que ZEB2 reprime la expresión de ID2, este eje podría jugar un rol relevante en la progresión de la LMA. El objetivo de este estudio fue evaluar si la sobreexpresión de ZEB2 y/o ID2 confiere resistencia a la muerte celular inducida por quimioterapéuticos en modelos celulares de LMA, generando líneas modificadas y analizando su respuesta a diferentes agentes farmacológicos.

La metodología combinó enfoques moleculares, farmacológicos y computacionales. Se utilizaron líneas celulares THP-1 y KASUMI-1 modificadas mediante CRISPR-Cas9 o transducción lentiviral para manipular la expresión de ZEB2 e ID2. Los tratamientos aplicados incluyeron Teniposide, Cd3254, Honokiol (HK) y Nilotinib, seleccionados por revisión bibliográfica o análisis predictivo con modelos de machine learning sobre datos multiómicos de la plataforma DepMap. La viabilidad celular se evaluó con el sistema Incucyte y tinción con Sytox Green, y la expresión génica y proteica mediante RT-qPCR y Western blot. Estos análisis se complementaron con citometría de flujo para estudiar CD68. Todos los resultados fueron validados con réplicas técnicas y análisis estadísticos, y procesados con herramientas de Python.

Los resultados demostraron que Teniposide, tanto en monoterapia como en combinación con Nilotinib, redujo significativamente la expresión de ZEB2 a nivel génico y proteico en THP-1, lo que se tradujo en un aumento de la muerte celular y una mayor proporción de células diferenciadas CD68+. En cambio, ID2 no presentó cambios significativos bajo ninguna condición de tratamiento. Ni HK ni Cd3254 mostraron efectos citotóxicos apreciables en estas células, y Nilotinib solo no indujo muerte celular significativa, aunque su combinación con Teniposide produjo un efecto sinérgico robusto. Este efecto se reflejó en la reducción de la IC₅₀ y en un aumento notable de la población CD68+, lo que sugiere una reactivación parcial de la diferenciación mieloide. Además, en células primarias de médula ósea de ratón, se observó que la combinación de ambos compuestos también disminuía la expresión de ZEB2, reforzando la validez del hallazgo.

Este estudio aporta evidencia de que la inhibición farmacológica de ZEB2 puede revertir la resistencia a la muerte celular en LMA, especialmente en combinación con Nilotinib, que potencia el efecto citotóxico y diferenciador de Teniposide. Aunque la hipótesis sobre la regulación funcional entre ZEB2 e ID2 no se confirmó en este modelo, los resultados posicionan a ZEB2 como una diana relevante. En conjunto, estos hallazgos respaldan el uso de terapias combinadas dirigidas a vías de resistencia como estrategia prometedora para el tratamiento personalizado de la LMA.

Palabras clave: leucemia mieloide aguda, médula ósea, quimioterapia, ZEB2, ID2.

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a hematologic neoplasm characterized by the accumulation of immature cells in the bone marrow, which disrupts normal hematopoiesis. Despite therapeutic advances, its genetic heterogeneity and resistance to chemotherapeutic agents remain major challenges in treatment. ZEB2 has been identified as a key regulator of hematopoietic differentiation and cellular self-renewal—functions that may be involved in therapeutic resistance. Since ZEB2 represses the expression of ID2, a known inhibitor of differentiation, this axis may play a relevant role in AML progression. The objective of this study was to evaluate whether overexpression of ZEB2 and/or ID2 confers resistance to chemotherapy-induced cell death in cellular models of AML, through the generation of genetically modified lines and the analysis of their response to various pharmacological agents.

The methodology combined molecular, pharmacological, and computational approaches. THP-1 and KASUMI-1 cell lines were genetically modified using CRISPR-Cas9 or lentiviral transduction to modulate the expression of ZEB2 and ID2. Treatments included Teniposide, Cd3254, HK, and Nilotinib, selected based on literature review or predictive analysis using machine learning models trained on multi-omic datasets from the DepMap platform. Cell viability was assessed using the Incucyte live-cell imaging system and Sytox Green staining, while gene and protein expression were evaluated by RT-qPCR and Western blot, respectively. These analyses were complemented with flow cytometry to assess CD68 expression. All results were validated with technical replicates and statistical analyses, and image data were processed using Python-based tools.

The results demonstrated that Teniposide, both as monotherapy and in combination with Nilotinib, significantly reduced ZEB2 expression at the gene and protein levels in THP-1 cells, leading to increased cell death and a higher proportion of CD68+ differentiated cells. In contrast, ID2 did not show significant changes under any treatment condition. Neither HK nor Cd3254 induced appreciable cytotoxic effects in these cells, and Nilotinib alone failed to induce significant cell death. However, its combination with Teniposide produced a robust synergistic effect, reflected in a lowered IC₅₀ and a marked increase in the CD68+ population, suggesting partial reactivation of myeloid differentiation. Furthermore, in primary mouse bone marrow cells, the combination of both compounds also reduced ZEB2 expression, reinforcing the validity of the findings.

This study provides evidence that pharmacological inhibition of ZEB2 can reverse chemotherapy resistance in AML, particularly in combination with Nilotinib, which enhances the cytotoxic and differentiation-inducing effects of Teniposide. Although the proposed functional relationship between ZEB2 and ID2 was not confirmed in this model, the results position ZEB2 as a relevant therapeutic target. Altogether, these findings support the use of combination therapies targeting resistance pathways as a promising strategy for personalized treatment of AML.

Keywords: acute myeloid leukemia, bone marrow, chemotherapy, ZEB2, ID2.

Índice

Figuras	8
Tablas	10
Introducción.....	11
Definición	11
Epidemiología.....	13
Cuadro clínico.....	13
Clasificación	13
Tratamiento de la LMA	14
Quimioterapia.....	14
Trasplante de Médula Ósea.....	16
Terapias dirigidas.....	16
ZEB2.....	17
El Factor de Transcripción ZEB2: Definición y Función General	17
Rol de ZEB2 en las Células Madre Hematopoyéticas.....	19
ZEB2 como Regulador de la Expresión de ID2	19
Mecanismo Molecular de la Represión de ID2 por ZEB2	19
Papel de ID2 en la Inhibición de la Diferenciación en la Hematopoyesis.....	21
Relevancia de ZEB2 e ID2 en la Leucemia Mieloide Aguda (LMA) y Necesidad del Estudio.....	21
Problema científico	21
Hipótesis	22
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos	24
Metodología.....	25
Líneas celulares.....	25
Cultivo celular	25
Modelo CRISPR-Cas9 de ZEB2.....	25
Generación de vector control de CRISPR-Cas9-RFP	25
Transformación bacteriana de vectores CRISPR-Cas9.....	25
Metodología de Electroporación para la Generación de Modelos Knock-Out de Zeb2 en Líneas Celulares THP-1 y KASUMI-1.....	26
Preparación celular.....	26
Electroporación	26
Estandarización de la Técnica.....	26
Cultivo Post-Electroporación	26
Metodología de Transducción Lentiviral para la Expresión de ZEB2 e ID2 en Líneas Celulares THP-1 y KASUMI-1	27
Vectores y plásmidos utilizados.....	27
Expansión de plásmidos comerciales.....	27

Preparación de modelos celulares	27
Transfección y producción de lentivirus	27
Transducción lentiviral.....	27
Separación de células mediante fluorescencia activada	28
Metodología y Análisis Computacional para la Identificación de Compuestos con Actividad Antitumoral en LMA	28
Implementación Técnica	29
Ensayo de viabilidad celular mediante imagen en tiempo real: Incucyte	29
Ensayo para la cuantificación de ARN	31
Ensayo para la cuantificación de proteínas	32
Preparación del tampón RIPA.....	32
Cultivo y recolección de células THP-1.....	32
Cuantificación de proteínas mediante ensayo de Bradford	32
Desnaturalización de proteínas y electroforesis SDS-PAGE	32
Transferencia Western	33
Inmunodetección.....	33
Citometría de flujo	33
Cultivo celular y tratamiento de drogas para citometría de flujo para viabilidad y diferenciación.....	33
Tinción para citometría de flujo	34
Adquisición y análisis en citómetro de flujo	34
Análisis estadístico.....	34
Resultados.....	35
Pipeline bioinformático.....	35
Creación del Plásmido Control CRISPR Zeb2	39
Generación de un plásmido control CRISPR Zeb2 mediante digestión enzimática con Nde1.	39
Producción e Infección Viral con Constructos de ZEB2, ID2 y EGFP.....	45
Generación de partículas lentivirales para la sobreexpresión de ZEB2 e ID2 y evaluación de la eficiencia de transducción en células THP-1.....	45
Resultados del Ensayo de Viabilidad Celular mediante Incucyte.....	47
Validación de IC50	49
Curvas Dosis-Respuesta, IC50 y Sinergia.....	51
Efecto de Teniposide, Nilotinib y su combinación en la expresión de ZEB1, ZEB2 e ID2 en células THP-1	56
Análisis de la expresión de proteína ZEB2 en células THP-1 mediante Western Blot tras tratamiento con Teniposide, Nilotinib y su combinación	58
Evaluación del efecto de Teniposide, Nilotinib y su combinación sobre la viabilidad y diferenciación de células THP-1 mediante citometría de flujo: Predominio de la citotoxicidad y aumento significativo del marcador CD68 con la combinación de Teniposide y Nilotinib	66
Discusión	70
Eficiencia del Knock-Out de ZEB2 mediante CRISPR/Cas9.....	70
Inhibición de ZEB2: oportunidades terapéuticas y limitaciones farmacológicas.....	70
Análisis bioinformático: Nilotinib como candidato reposicionado para LMA mediante aprendizaje automático..	71

Reducción de ZEB2 y su impacto en la sensibilidad a quimioterapéuticos	72
Efecto sinérgico de Teniposide y Nilotinib en células THP-1	72
Limitaciones y desafíos técnicos.....	73
Implicaciones clínicas y proyecciones terapéuticas	74
Conclusión y proyecciones	75
Bibliografía.....	76
Anexos.....	80

Figuras

Figura 1. Hematopoyesis y la vía mieloide en la LMA.	12
Figura 2. Alteraciones genómicas del gen ZEB2 en distintos tipos de cáncer.	18
Figura 3. Regulación transcripcional de ID2 mediada por ZEB2 en células hematopoyéticas.	20
Figura 4. Identificación de compuestos candidatos mediante modelado bioinformático.	36
Figura 5. Gráfico de inhibidores en LMA que muestra la significancia estadística (-log₁₀(FDR)) de compuestos dirigidos a genes específicos.	38
Figura 6. Análisis de la digestión enzimática con Nde1 del plásmido CRISPR ZEB2 comercial y de una colonia transformada.	40
Figura 7. Evaluación de la expresión del plásmido CRISPR con fluorescencia roja en células THP1 mediante microscopía de fluorescencia.	42
Figura 8. Análisis de la expresión de ZEB2 en células THP1 mediante Western blot.	44
Figura 9. Transfección de células HEK293T para la producción de partículas lentivirales e infección de células THP1 con constructos de ZEB2-mCherry, ID2-mCherry y EGFP.	46
Figura 10. Cinética de la muerte celular inducida por Cd3254, Nilotinib, Teniposide y HK en el ensayo Incucyte.	48
Figura 11. Validación de la permeabilidad de la membrana celular mediante Incucyte utilizando concentraciones seriadas decrecientes de A) Cd3254 y B) Nilotinib C) Teniposide D) HK.	50
Figura 12. Curvas dosis-respuesta a las 48 horas obtenidas mediante el ensayo Incucyte para A) Teniposide y B) HK.	52
Figura 13. Análisis de sinergia a las 48 horas de Nilotinib (A), HK (B) y Cd3254 (C) en combinación con Teniposide (10 μM).	55
Figura 14. Expresión relativa de ZEB1, ZEB2 e ID2 en células THP-1 tras tratamiento con Teniposide, Nilotinib y su combinación.	57

Figura 15. Expresión de proteína ZEB2 en células THP-1 tras tratamiento con Teniposide, Nilotinib y su combinación, evaluada por Western blot.	59
Figura 16. Expresión de proteína ZEB2 en células THP-1 tras tratamiento con Teniposide, Nilotinib y su combinación, evaluada por Western blot.	61
Figura 17. Expresión de proteína ZEB2 en células THP-1 tras tratamiento con Teniposide, Nilotinib y su combinación, evaluada por Western blot.	63
Figura 18. Expresión de proteína ZEB2 en células de médula ósea adulta de ratón tratamiento con Teniposide, Nilotinib y su combinación, evaluada por Western blot.	65
Figura 19. Porcentaje de células vivas y muertas, clasificadas según la expresión de CD68, en células THP-1 tratadas con Nilotinib (N)(50 μM), Teniposide (T)(10 μM), o la combinación de ambos (Dual), comparadas con control sin tratamiento (C).	67
Figura 20. Análisis de citometría de flujo en células THP-1 tras tratamiento con Teniposide (10 μM), Nilotinib (50 μM) y su combinación durante 48 h.	69

Tablas

Tabla 1. Alteraciones genéticas en LMA: prevalencia y pronóstico.....	14
Tabla 2. Composición del tampón RIPA (50 mL).....	32
Tabla 3. Composición de geles de poliacrilamida	33
Tabla 4. Anticuerpos para la citometría de flujo.....	34

Introducción

Definición

La Leucemia Mieloide Aguda (LMA) se caracteriza por una marcada heterogeneidad genética entre pacientes, lo que contribuye a su curso clínico frecuentemente desfavorable. La LMA es una enfermedad compleja, definida por la proliferación anormal de células mieloides en la médula ósea y la sangre periférica. A nivel celular, la LMA se caracteriza por un bloqueo en la diferenciación de células madre hematopoyéticas (CMH) a lo largo de la línea mieloide, acompañado de un aumento descontrolado en la capacidad proliferativa y la consecuente acumulación de células mieloides blastoides (inmaduras) (Figura 1). Esta patología presenta una progresión clínica rápida y, sin tratamiento temprano y adecuado, representa un alto riesgo para la supervivencia del paciente. Los síntomas de la LMA son inespecíficos e incluyen palidez cutánea, fatiga, disnea, infecciones recurrentes y tendencia a sangrados (Caligiuri et al., 2015).

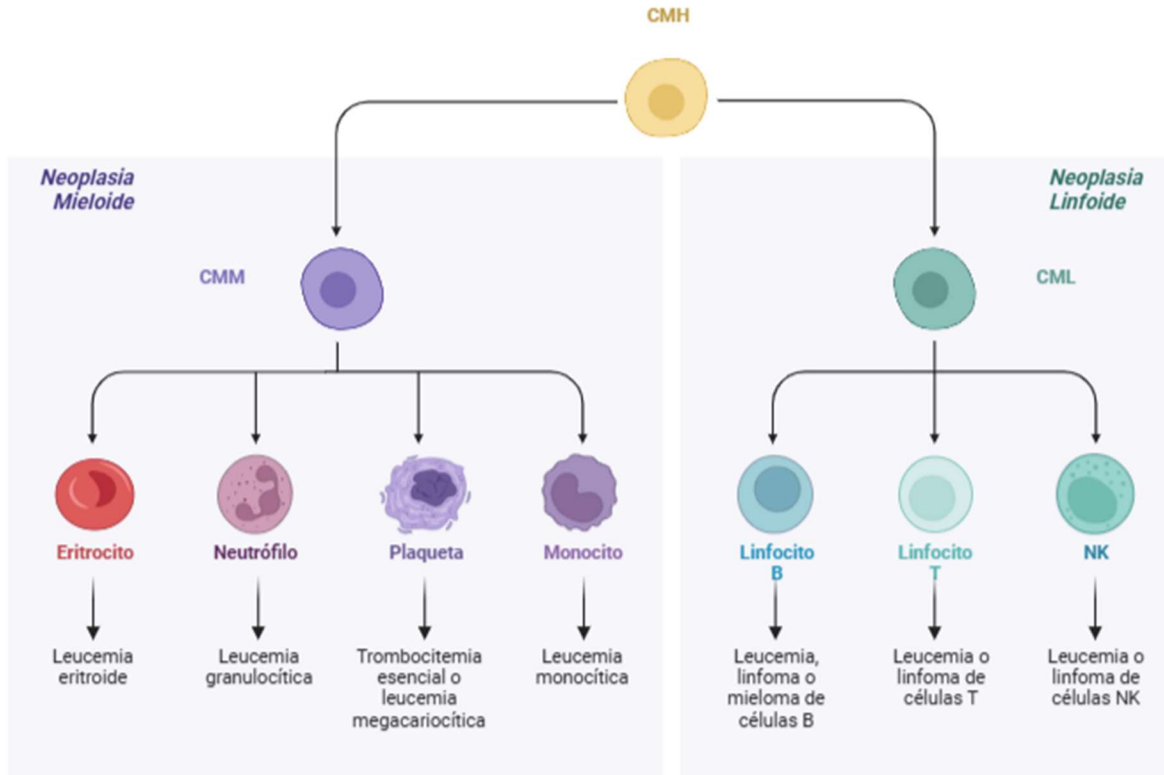


Figura 1. Hematopoyesis y la vía mieloide en la LMA. La figura esquematiza la vía de diferenciación de las CMH a través del linaje mieloide. Se ilustra el punto de bloqueo en esta vía que conduce a la acumulación de células blásticas mieloides, característica patognomónica de la LMA. **CMM**, célula madre mieloide, célula madre linfoides. **NK**, célula natural killer.

Epidemiología

La LMA es una neoplasia hematológica con un impacto global significativo. Según estimaciones de la American Cancer Society para 2023, se proyectaron aproximadamente 20,380 nuevos casos de LMA en los Estados Unidos, representando alrededor del 1% de todos los diagnósticos de cáncer en este país (*Acute Myeloid Leukemia - Cancer Stat Facts*, n.d.). Sin embargo, a pesar de su incidencia relativamente modesta en comparación con los otros tipos de cánceres, la LMA es responsable de un número desproporcionadamente alto de muertes. Se estimaron 11,310 fallecimientos por LMA en Estados Unidos en 2023 (*Acute Myeloid Leukemia - Cancer Stat Facts*, n.d.). A nivel global, la LMA también representa una carga considerable dentro de las leucemias. Datos recientes sugieren que aproximadamente el 62% de las muertes por leucemia se atribuyen a la LMA (Shimony et al., 2023). El pronóstico de la LMA sigue siendo desafiante, con un índice de supervivencia a 5 años que se sitúa en torno al 30-35% (Arber et al., 2016; Shimony et al., 2023). Además, las tasas de recaída son sustanciales, variando entre el 10 y el 40% en pacientes jóvenes y aumentando al 40-60% en adultos mayores de 60 años (Arber et al., 2016). Estas estadísticas subrayan la necesidad urgente de investigación para comprender mejor la biología de la LMA y desarrollar terapias más eficaces. Las leucemias (mieloides y linfoides) en Chile tiene una incidencia de 1.0 a 1.2 casos por año por cada 100,000 habitantes en el rango de 0-14 años, con mayor incidencia en hombres, similar a como ocurre a nivel mundial (Departamento de Epidemiología de Chile, Ministerio de Salud de Chile, n.d.). En la provincia de Concepción, la incidencia de LMA en los últimos 4 años es de 1.0 casos por cada 100,000 para ambos sexos en el rango etario de 0 - 14 años y de 1.2 casos por cada 100,000 habitantes para ambos sexos en el rango de 15-25 años. Cabe destacar, que para el rango etario adultos mayores de 60 años, donde la enfermedad es más prevalente no hay datos disponibles en Chile (Departamento de Epidemiología de Chile, Ministerio de Salud de Chile, n.d.).

Cuadro clínico

LMA debuta típicamente de forma subaguda, con un conjunto de signos y síntomas que reflejan principalmente la insuficiencia de la médula ósea. Las manifestaciones iniciales más comunes incluyen síntomas generales como palidez, fatiga, debilidad y disnea, reflejo de la anemia subyacente, aunque la fatiga puede ser desproporcionada a la anemia. La trombocitopenia se manifiesta por tendencia al sangrado, visible en hematomas, petequias y sangrado mucocutáneo. La granulocitopenia aumenta la susceptibilidad a infecciones, principalmente de piel y mucosas, siendo la fiebre un síntoma frecuente al diagnóstico. En el examen físico, puede detectarse esplenomegalia o hepatomegalia. Aunque menos común, la enfermedad puede afectar diversos sistemas de órganos, con manifestaciones cutáneas, sensoriales, gastrointestinales, respiratorias, cardíacas, urogenitales y osteoarticulares, así como neurológicas en casos de infiltración del sistema nervioso central, siendo estas últimas presentaciones menos frecuentes al inicio de la enfermedad (Caligiuri et al., 2015).

Clasificación

La clasificación de la LMA ha evolucionado desde métodos iniciales basados en la morfología y la histoquímica hacia enfoques que integran el inmunofenotipo, la citogenética y, de manera crucial, las alteraciones moleculares. Si bien la morfología y el inmunofenotipo siguen siendo relevantes, la clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2022 otorga un papel preponderante al perfil genético en la definición de las entidades clasificatorias (Arber et al., 2016). Esta clasificación de la OMS se organiza en dos categorías principales: LMA con anomalías genéticas específicas y LMA definidas según el grado de diferenciación celular (**Error! Reference source not found.**). El primer grupo, LMA con anomalías genéticas específicas, incluye entidades definidas por mutaciones recurrentes, fusiones génicas y reordenamientos. También se reconoce la LMA asociada a síndromes mielodisplásicos, caracterizada por alteraciones genéticas específicas que predisponen al desarrollo de la leucemia. La clasificación de la OMS también considera una categoría para alteraciones genéticas raras cuyo significado clínico aún se está investigando, subrayando la creciente importancia del perfil genético no solo para la clasificación de la LMA, sino también para establecer el pronóstico y guiar las decisiones terapéuticas (Arber et al., 2016).

Tabla 1. Alteraciones genéticas en LMA: prevalencia y pronóstico

Alteración Genética	Probabilidad al Diagnóstico	Evolución
t(8;21)(RUNX1-RUNX1T1)	5–10%	Favorable
inv(16)(CBFB-MYH11)	5–10%	Favorable
t(15;17)(PML-RARA) (LMA APL)	5–10%	Favorable*
sMutación NPM1 (sin FLT3-ITD)	~30%	Favorable
Mutación CEBPA (bialélica)	5–10%	Favorable
FLT3-ITD (alta razón alélica)	~25%	No favorable
Mutación TP53	10–20%	No favorable
Complejo cariotipo (≥ 3 anomalías)	10–15%	No favorable
Mutación ASXL1	5–10%	No favorable
Mutación RUNX1	5–15%	No favorable

- *Pronóstico muy favorable con tratamiento específico (ATRA + trióxido de arsénico)*
- *Probabilidades aproximadas según ELN 2022 y WHO 5^a edición*
- *FLT3-ITD: Impacto negativo dependiente de la carga alélica*
- *NPM1: Requiere ausencia de FLT3-ITD para pronóstico favorable*

Tratamiento de la LMA

El tratamiento de la leucemia mieloide aguda ha progresado notablemente en las últimas décadas, adoptando un enfoque multidisciplinario que abarca quimioterapia, trasplante de CMH y terapias dirigidas. No obstante, cada una de estas modalidades presenta limitaciones inherentes que pueden comprometer tanto la eficacia del tratamiento como la calidad de vida del paciente (Megías-Vericat et al., 2022).

La estrategia terapéutica estándar para lograr la curación de la LMA se basa en alcanzar una remisión completa (CR) mediante la reducción significativa de la carga leucémica, seguida de una terapia post-remisión, que puede incluir quimioterapia adicional y/o trasplante alogénico de células madre (alloSCT). La elección del régimen más adecuado depende de múltiples factores, tales como las comorbilidades y antecedentes médicos del paciente, el perfil citogenético y molecular de riesgo en la LMA, el estado de enfermedad mínima residual (MRD) post-tratamiento, la disponibilidad de donantes compatibles y los objetivos individuales del paciente con respecto a su tratamiento (Shimony et al., 2023).

Quimioterapia

El tratamiento farmacológico de LMA, donde se emplean combinaciones de fármacos se ha consolidado como una estrategia primordial (Döhner et al., 2017; Estey, 2018). La justificación para el uso de terapias combinadas en LMA reside en la necesidad de abordar la heterogeneidad intrínseca de la enfermedad y los mecanismos de resistencia farmacológica inherentes a las células leucémicas (Walter et al., 2015). La LMA se caracteriza por una notable diversidad celular, incluso dentro de un mismo paciente, donde las células leucémicas pueden presentar variaciones genéticas y fenotípicas que modulan su respuesta a un único agente terapéutico. En este contexto, las combinaciones de fármacos, diseñadas con mecanismos de acción diferenciados, incrementan la probabilidad de impactar un

espectro más amplio de poblaciones celulares leucémicas, incluyendo aquellas que podrían exhibir resistencia a un fármaco individual. Adicionalmente, las células leucémicas poseen una destacada capacidad para desarrollar mecanismos de resistencia a los fármacos, incluyendo la alteración de dianas farmacológicas, la sobreexpresión de bombas de eflujo, la activación de vías de supervivencia alternativas y la potenciación de mecanismos de reparación del daño celular (Walter et al., 2015). El uso de combinaciones farmacológicas, dirigidas a múltiples vías y procesos celulares, dificulta la emergencia de resistencia y puede incluso superar mecanismos preexistentes. El diseño de las combinaciones farmacológicas en LMA se fundamenta en la búsqueda de efectos sinérgicos o aditivos (Döhner et al., 2017). La sinergia farmacológica, donde la interacción de dos o más fármacos genera un efecto superior a la mera suma de sus efectos individuales, y la aditividad, donde el efecto combinado equivale a la suma de los efectos aislados, persiguen una mayor eficiencia en la erradicación de las células leucémicas, con el objetivo de incrementar las tasas de CR y reducir la carga leucémica residual. Las células leucémicas dependen de intrincadas redes de señalización para regular procesos de supervivencia, proliferación y resistencia a la apoptosis. Las estrategias combinatorias pueden estar dirigidas a bloquear simultáneamente múltiples vías de señalización críticas, interrumpiendo de forma más eficaz la viabilidad de las células leucémicas. Consecuentemente, el empleo de combinaciones de fármacos con mecanismos de acción dispares disminuye la probabilidad de resistencia cruzada, un fenómeno donde la resistencia a un fármaco puede conferir resistencia a otros con mecanismos similares (Walter et al., 2015). La reducción de la resistencia cruzada incrementa las posibilidades de éxito terapéutico a largo plazo. Finalmente, las combinaciones farmacológicas, en especial aquellas que integran quimioterapia intensiva seguida de consolidación y/o trasplante de progenitores hematopoyéticos, están concebidas para erradicar la enfermedad a niveles mínimos, incluyendo la MRD (Sanz et al., 2019), con el fin de minimizar el riesgo de recaída y prolongar la supervivencia libre de enfermedad.

Dentro del espectro de combinaciones farmacológicas relevantes en el tratamiento de la LMA, se destaca el régimen clásico de inducción “7+3”, consistente en citarabina y una antraciclina (daunorrubicina o idarrubicina) (Döhner et al., 2017). La citarabina, un antimetabolito, inhibe la síntesis de ADN, mientras que las antraciclinas, inhibidores de la topoisomerasa II, dañan el ADN. La combinación de estos agentes, con mecanismos de acción diferenciados, ejerce un efecto sinérgico en el daño al ADN y la inducción de muerte celular en las células leucémicas. En el contexto de la LMA con mutaciones FLT3-ITD o TKD, se ha incorporado a la inducción el uso de inhibidores de FLT3, como midostaurina, gilteritinib o quizartinib (Kayser & Levis, 2019), en adición al régimen “7+3”. Estos inhibidores bloquean específicamente la actividad tirosina quinasa FLT3, aberrante en estas mutaciones, complementando el efecto de la quimioterapia intensiva. Para pacientes de edad avanzada o con comorbilidades que limitan la tolerancia a la quimioterapia intensiva, se ha establecido la combinación de venetoclax, un inhibidor de BCL2, con agentes hipometilantes (azacitidina o decitabina) o citarabina de baja dosis (DiNardo & Cortes, 2016; Guerra et al., 2019). El venetoclax inhibe la proteína antiapoptótica BCL2, frecuentemente sobreexpresada en LMA, mientras que los agentes hipometilantes actúan a nivel epigenético, y la citarabina de baja dosis ejerce un efecto citotóxico atenuado. En la Leucemia Promielocítica Aguda (LPA), un subtipo específico de LMA, el tratamiento de inducción estándar difiere sustancialmente, empleándose la combinación de ácido transretinoico (ATRA) y trióxido de arsénico (ATO) (Lo-Coco et al., 2013). El ATRA induce la diferenciación de las células promielocíticas leucémicas, mientras que el ATO induce apoptosis y también exhibe efectos diferenciadores. En la terapia de consolidación post-remisión, la citarabina a altas dosis (HiDAC) se emplea comúnmente, especialmente tras la inducción con “7+3”. El trasplante alogénico de células hematopoyéticas, aunque no es una combinación farmacológica en sí, implica un régimen de acondicionamiento quimioterápico intensivo, a menudo combinatorio, seguido de la infusión de células de un donante sano, donde el efecto injerto contra leucemia (GvL) contribuye al control de la enfermedad. En la terapia de mantenimiento, los inhibidores de FLT3, como midostaurina o gilteritinib, se utilizan en monoterapia tras combinaciones previas en inducción y/o consolidación, para prolongar la remisión en pacientes con mutaciones FLT3 (Kayser & Levis, 2019).

La idoneidad de un paciente para recibir quimioterapia intensiva, régimen de inducción clásico, o alternativa, fármacos menos agresivos, se evalúa principalmente en función de su edad y la presencia de comorbilidades significativas. Generalmente, los pacientes mayores de 75 años se consideran con contraindicación relativa para este tratamiento intensivo, dado que existen alternativas de quimioterapia menos agresivas que pueden resultar efectivas. La FDA establece criterios de exclusión para la quimioterapia en pacientes con insuficiencia hepática, renal, cardíaca o pulmonar significativa. Estos parámetros, validados en estudios previos, permiten prever el riesgo de mortalidad a corto plazo posterior al tratamiento. Sin embargo, incluso en los pacientes considerados “elegibles”, puede no ser “apropiado” implementar quimioterapia intensiva si su perfil biológico sugiere un pronóstico desfavorable, ya que los resultados podrían ser subóptimos (Shimony et al., 2023).

A pesar de los beneficios inherentes al uso de combinaciones farmacológicas, existen dificultades y retos significativos (Döhner et al., 2017; Estey, 2018). El incremento de la toxicidad es una preocupación primordial, ya que la combinación de múltiples agentes, particularmente la quimioterapia intensiva, aumenta el riesgo de efectos adversos y toxicidades, incluyendo mielosupresión, mucositis, náuseas, vómitos y daño orgánico. El manejo de estas toxicidades exige un soporte médico intensivo y puede limitar la intensidad y duración del tratamiento. Así mismo, la administración concomitante de múltiples fármacos incrementa la probabilidad de interacciones farmacológicas complejas, que pueden alterar la eficacia o potenciar la toxicidad. El tratamiento con combinaciones farmacológicas, especialmente los regímenes intensivos, requiere un manejo altamente especializado en centros con experiencia en LMA, con una infraestructura y un equipo multidisciplinario adecuado. El costo de las terapias más recientes y las combinaciones complejas puede representar una barrera de acceso en diversos contextos sanitarios. Finalmente, a pesar de las estrategias combinatorias diseñadas para superar la resistencia, las células leucémicas pueden eventualmente desarrollar mecanismos de resistencia, conduciendo a la recaída, la cual representa un desafío terapéutico significativo (Walter et al., 2015). En el panorama actual, uno de los retos fundamentales reside en la personalización del tratamiento, con el objetivo de identificar las combinaciones farmacológicas óptimas para cada paciente, considerando sus características genéticas, moleculares y clínicas, y minimizando las toxicidades innecesarias (Estey, 2018; Shimony et al., 2023). Este enfoque demanda un análisis exhaustivo de cada caso individual y la integración de la información genómica y molecular en la toma de decisiones terapéuticas. La investigación continua se orienta a la optimización de las combinaciones existentes, al desarrollo de nuevas terapias dirigidas e inmunoterapias, y a la personalización del tratamiento, con el propósito de mejorar los resultados clínicos y reducir las toxicidades en pacientes con LMA (Shimony et al., 2023).

Trasplante de Médula Ósea

El trasplante de médula ósea (TMO) representa una opción terapéutica relevante para pacientes con LMA que presentan características de alto riesgo o que no logran una remisión completa con quimioterapia. Este tratamiento puede realizarse mediante trasplante autólogo o alogénico, según el origen del injerto (Jacobsohn & Vogelsang, 2007). Sin embargo, el TMO presenta varias limitaciones importantes. Una de las principales barreras es la disponibilidad de donantes compatibles, lo que puede dificultar el acceso al tratamiento, especialmente en poblaciones con una diversidad genética amplia, donde la compatibilidad HLA es menos común (Shaw et al., 2018). Además, los pacientes sometidos a TMO enfrentan el riesgo de complicaciones postrasplante, tales como enfermedad injerta contra huésped (EICH), infecciones recurrentes y toxicidad orgánica, que pueden impactar gravemente su pronóstico y recuperación (Jacobsohn & Vogelsang, 2007). La recuperación tras el TMO puede extenderse considerablemente, requiriendo cuidados intensivos y prolongados, lo cual influye negativamente en la calidad de vida del paciente y puede requerir varios meses o incluso años para su resolución completa (Majhail et al., 2012).

Terapias dirigidas

En los últimos años, las terapias dirigidas han emergido como una estrategia innovadora para atacar específicamente las alteraciones genéticas en las células leucémicas, siendo los inhibidores de FLT3 y los agentes epigenéticos ejemplos de tratamientos que han mostrado eficacia en subgrupos específicos de pacientes con LMA (Cortes et al., 2019). Sin embargo, estas terapias presentan limitaciones importantes. Una de las principales barreras es la especificidad de las mutaciones diana, ya que no todos los pacientes presentan las mutaciones necesarias para estas terapias, lo que limita su aplicación universal (Lachowiec et al., 2023). Además, los costos elevados de las terapias dirigidas representan una barrera considerable, dado que su financiamiento no siempre está garantizado en los sistemas de salud, afectando el acceso a estas opciones de tratamiento (Salas-Vega et al., 2017). Si bien estas terapias suelen ser mejor toleradas que la quimioterapia convencional, pueden inducir efectos adversos importantes que requieren atención especializada, como toxicidad cardiovascular o hepática, lo que resalta la necesidad de un manejo especializado y un monitoreo continuo (Cortes et al., 2019). Las limitaciones inherentes a las terapias actuales en la LMA subrayan la necesidad de una investigación continua de estrategias terapéuticas innovadoras que puedan no solo mejorar los resultados clínicos, sino también optimizar la calidad de vida de los pacientes diagnosticados con esta neoplasia hematológica. En este contexto, estudios recientes han identificado al factor de transcripción ZEB2 como un candidato de interés terapéutico, dado su rol fundamental en la patogénesis de la LMA (H. Li et al., 2017).

ZEB2

El Factor de Transcripción ZEB2: Definición y Función General

El cáncer se caracteriza por la adquisición de *hallmarks* o rasgos distintivos que son esenciales para su desarrollo y progresión, incluyendo la proliferación celular sostenida, la evasión de la apoptosis, la resistencia a señales inhibitorias del crecimiento y la capacidad de evadir la respuesta inmune (Hanahan, 2022). A nivel genético, el cáncer representa un desequilibrio entre oncogenes, que promueven el crecimiento tumoral, y genes supresores de tumores, que actúan como protectores contra la malignidad (Hanahan, 2022). Las alteraciones genéticas en estos genes pueden clasificarse como mutaciones *driver*, que confieren una ventaja proliferativa y son directamente responsables de la transformación tumoral, y mutaciones *passenger*, que aunque presentes, no contribuyen directamente al crecimiento o supervivencia tumoral (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2013; Hanahan, 2022).

En la LMA, una característica patológica central es el bloqueo en la diferenciación de las células hematopoyéticas y la consecuente depleción de la médula ósea. Un regulador clave en este proceso es el gen zinc finger E-box-binding homeobox 2 (ZEB2) (también conocido como *Zfhx1b* o *SIP1*) (H. Li et al., 2017).

ZEB2 codifica para un factor de transcripción de la familia ZEB, conocido por su capacidad de unirse a secuencias E-box en el ADN y regular la expresión de genes cruciales en procesos biológicos como la transición epitelio-mesénquima (TEM), un proceso fundamental en el desarrollo embrionario y que también juega un papel importante en patologías malignas, incluyendo la LMA (H. Li et al., 2017). La TEM implica la pérdida de polaridad celular y adhesión célula-célula, así como la adquisición de propiedades migratorias e invasivas. La expresión principal de ZEB2 se encuentra en tejidos como el cerebro, apéndice, ovarios, bazo y médula ósea tumoral (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2013).

ZEB2 actúa principalmente como un represor transcripcional al asociarse con co-represores como la proteína de unión C-terminal (CtBP) y las histonas deacetilasas (HDAC). Esta interacción facilita la modificación de la cromatina hacia un estado más condensado y menos accesible para la maquinaria de transcripción, silenciando la expresión de genes específicos (Peinado et al., 2007; Vandewalle et al., 2005). Uno de los genes blanco clave de ZEB2 es *CDH1*, que codifica la E-cadherina, una proteína esencial para la adhesión celular. La represión de *CDH1* por ZEB2 facilita la migración celular y, en el contexto de la LMA, se ha asociado con un fenotipo celular más agresivo y resistente a la apoptosis, lo que dificulta el tratamiento efectivo de la leucemia (Peinado et al., 2007).

Se ha encontrado a ZEB2 ampliamente implicado en procesos de TEM, diferenciación celular y evasión de la apoptosis, todos ellos considerados rasgos fundamentales en el desarrollo y progresión tumoral. Su disfunción ha sido descrita en diversos tipos de cáncer, incluyendo melanoma, carcinoma colorrectal, cáncer de mama y cáncer gástrico, donde su sobreexpresión se ha asociado a mayor agresividad, resistencia terapéutica y peor pronóstico. En otros contextos, como glioblastoma y cáncer de pulmón, también se ha reportado su participación en la regulación de la plasticidad celular y en la promoción de fenotipos invasivos. Para ilustrar la frecuencia y tipo de alteraciones genómicas que afectan a ZEB2 en distintos cánceres (Qi et al., 2012), la Figura 2 muestra un análisis integrado de mutaciones, deleciones y amplificaciones del gen ZEB2 en cohortes de pacientes disponibles en la plataforma cBioPortal.

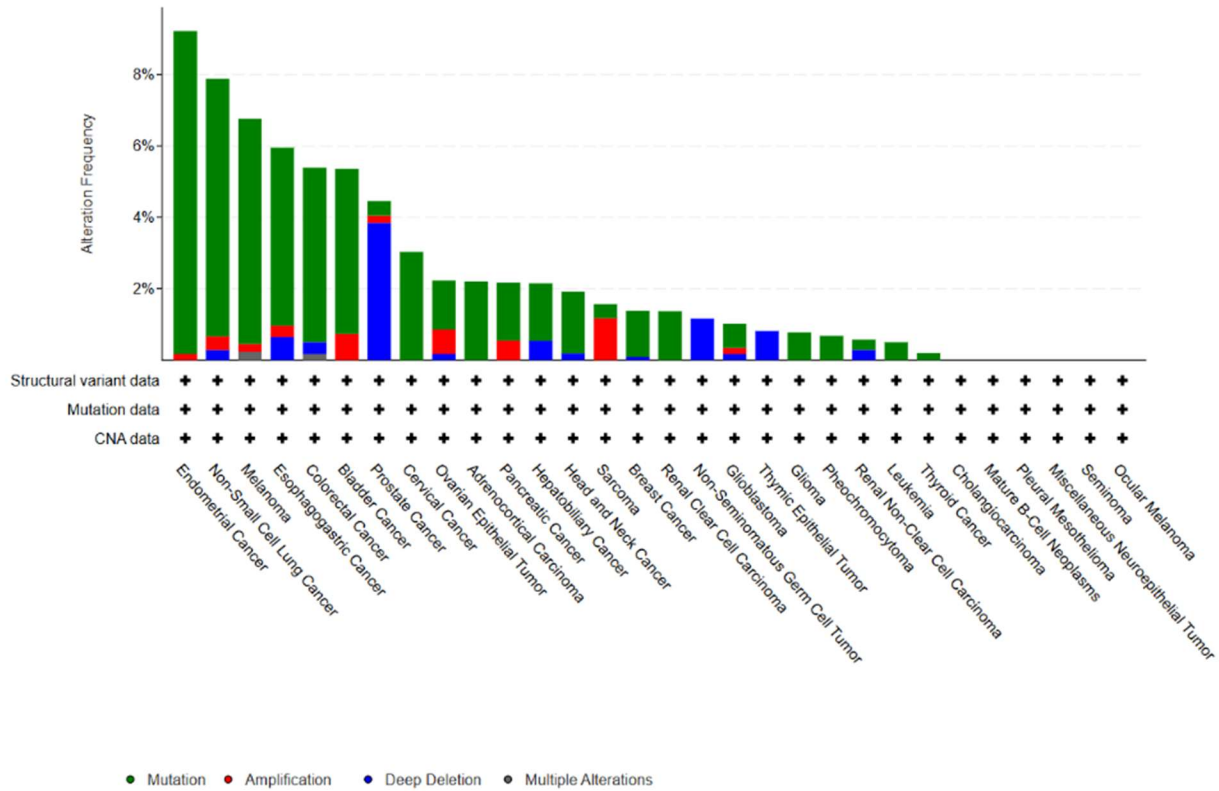


Figura 2. Alteraciones genómicas del gen ZEB2 en distintos tipos de cáncer. El gráfico fue generado a partir de datos públicos disponibles en cBioPortal (*cBioPortal for Cancer Genomics: ZEB2 in Bladder Urothelial Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas) and 31 other studies*), e incluye la frecuencia de mutaciones puntuales, amplificaciones y deleciones homocigotas en múltiples cohortes de pacientes con cáncer. Se observa que ZEB2 presenta alteraciones genéticas en diversos contextos oncológicos, lo que respalda su potencial relevancia como diana molecular más allá de la leucemia mieloide aguda.

Rol de ZEB2 en las Células Madre Hematopoyéticas

El factor de transcripción ZEB2 ha cobrado relevancia por su papel en la regulación de las células madre hematopoyéticas (CMH). A través de su función como represor transcripcional, ZEB2 regula la expresión de genes clave mediante la modificación de la cromatina, en colaboración con co-represores como CtBP y HDAC, lo cual facilita un ambiente propicio para la autorrenovación y el mantenimiento de las CMH (Peinado et al., 2007). En el nicho hematopoyético, ZEB2 influye en la capacidad de las CMH para responder a señales del microambiente y mantener su estado indiferenciado, siendo esencial para la longevidad y funcionalidad de estas células (Qi et al., 2012). Estudios han demostrado que la manipulación genética de ZEB2 en CMH altera su capacidad para responder a las señales del microambiente, indicando que ZEB2 es un mediador clave en la comunicación célula-nicho (H. Li et al., 2017). Por ejemplo, ZEB2 reprime la expresión de E-cadherina, crucial para la adhesión celular e interacción con el microambiente hematopoyético, lo que puede influir en el estado de diferenciación de las CMH, manteniéndolas en un estado menos diferenciado y más adecuado para la autorrenovación (Peinado et al., 2007).

Además, en el contexto de la leucemia, la alteración por sobreexpresión en la regulación de ZEB2 ha sido asociada con un aumento en la proliferación descontrolada y resistencia a la diferenciación de las CMH, lo que contribuye al desarrollo y progresión de enfermedades hematológicas malignas, como la LMA (H. Li et al., 2017). Específicamente en la LMA, ZEB2 también regula la proliferación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas, promoviendo su expansión sin diferenciación y permitiendo la acumulación de células inmaduras que caracterizan esta patología. Este proceso es facilitado por la represión de genes que controlan la maduración celular y por la activación de genes antiapoptóticos como *Bcl-2* y *c-Myc*, confiriendo resistencia a la quimioterapia (H. Li et al., 2017). Estudios han demostrado que la sobreexpresión de ZEB2 en CMH promueve la autosuficiencia en el crecimiento y la resistencia a la apoptosis (Qi et al., 2012). ZEB2 puede aumentar la expresión de Ciclina D1 (Qi et al., 2012) y del oncogén MYC (Luo et al., 2016), ambos fundamentales para la proliferación celular.

ZEB2 como Regulador de la Expresión de ID2

ZEB2 es un factor de transcripción que regula la expresión de múltiples proteínas, entre ellas la proteína Inhibidor de la Unión al ADN 2 (ID2) a través de la unión a secuencias específicas en su región promotora conocidas como E-boxes (Scott et al., 2016). ZEB2 actúa como un represor transcripcional de ID2 mediante un mecanismo de unión directa a estas secuencias, lo que impide la activación de su transcripción y mantiene bajos los niveles de expresión de ID2 en células hematopoyéticas (Scott et al., 2016). Esta represión es esencial para la diferenciación de células específicas, como las células progenitoras hematopoyéticas, al modular su maduración en respuesta a señales específicas.

Mecanismo Molecular de la Represión de ID2 por ZEB2

ZEB2 se une a las secuencias E-box (CANNTG) en la región promotora de ID2 (Figura 2), lo cual es facilitado por los dominios de dedos de zinc de ZEB2, específicos para la interacción con el ADN (Scott et al., 2016). Esta unión de ZEB2 bloquea el acceso de otros factores de transcripción que podrían activar la transcripción de ID2, manteniendo su expresión en niveles bajos y permitiendo el control preciso sobre la diferenciación (Scott et al., 2016). Además, ZEB2 también recluta co-represores como las histonas deacetilasas (HDACs), que modifican la estructura de la cromatina y limitan aún más la accesibilidad de ID2 a la maquinaria transcripcional, reforzando su represión (Scott et al., 2016). La represión de ID2 por ZEB2 es crítica para el proceso de diferenciación de células dendríticas (DCs) y otras células hematopoyéticas (Scott et al., 2016). Esta regulación específica de ID2 permite que las DCs y otros linajes hematopoyéticos se desarrollen de manera adecuada y cumplan sus funciones en la inmunidad y la homeostasis hematológica.

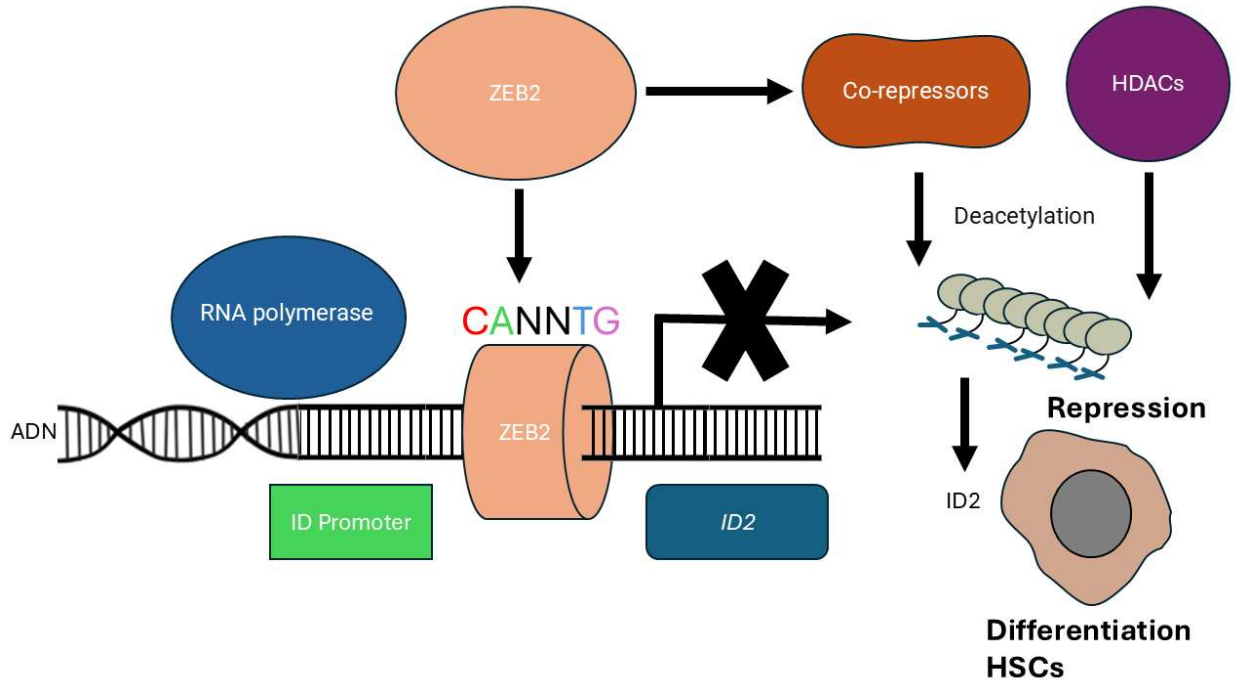


Figura 3. Regulación transcripcional de ID2 mediada por ZEB2 en células hematopoyéticas. ZEB2 se une a la secuencia E-box (CANNTG) en la región promotora del gen ID2 mediante sus dominios de dedos de zinc, bloqueando el acceso de la ARN polimerasa y de otros factores de transcripción activadores. Esta unión facilita el reclutamiento de co-represores y de histonas deacetilasas (HDACs), que inducen modificaciones epigenéticas represivas, como la desacetilación de histonas, lo cual compacta la cromatina e inhibe la transcripción de ID2. La represión de ID2 interfiere con la diferenciación de células madre hematopoyéticas (HSCs), destacando el rol clave de ZEB2 en el control de la diferenciación hematológica.

Papel de ID2 en la Inhibición de la Diferenciación en la Hematopoyesis

La proteína Inhibidor de la Unión al ADN 2 (ID2) desempeña un rol fundamental en la regulación de la hematopoyesis, proceso mediante el cual se forman las células sanguíneas a partir de CMH. ID2 actúa como un inhibidor de la diferenciación celular en CMH, contribuyendo a la preservación de su pluripotencia y evitando una diferenciación prematura. Esta función de ID2 es esencial para mantener el equilibrio entre la auto-renovación y la diferenciación de las CMH, lo cual asegura una población suficiente de células madre para mantener la homeostasis del sistema hematopoyético (Sun, 2015). Alteraciones en la expresión de ID2 están asociadas con trastornos hematológicos, como leucemias y anemias, resaltando la importancia de su regulación precisa en el desarrollo y mantenimiento del sistema hematopoyético (Sun, 2015).

Relevancia de ZEB2 e ID2 en la Leucemia Mieloide Aguda (LMA) y Necesidad del Estudio

En la LMA, la alteración en la regulación de ZEB2 se ha asociado con un aumento en la proliferación descontrolada y la resistencia a la diferenciación de las CMH (H. Li et al., 2017). ZEB2 promueve la expansión de las CMH sin diferenciación y activa genes antiapoptóticos, lo que puede conferir resistencia a la quimioterapia (H. Li et al., 2017). Dada la capacidad de ZEB2 para regular negativamente la expresión de ID2, un inhibidor de la diferenciación en la hematopoyesis, la sobreexpresión de ZEB2 podría contribuir al bloqueo de la diferenciación característico de la LMA al mantener bajos los niveles de ID2. Estudios preclínicos han explorado la modulación de ZEB2 como una estrategia terapéutica en diversos tipos de cáncer. Se han identificado compuestos como HK, CD3245 y Teniposide a través de la revisión bibliográfica por su potencial para inhibir la actividad de ZEB2 (Jain et al., 2017; Jin et al., 2023; W. Li et al., 2014; Metge et al., 2024). Además, mediante análisis bioinformáticos de bases de datos como DepMap en líneas celulares de leucemia, se identificó Nilotinib, un inhibidor de tirosina kinasa, como un candidato relevante para células leucémicas.

Sin embargo, el papel específico de la sobreexpresión de ZEB2 e ID2 en la generación de resistencia a la muerte celular mediada por quimioterapéuticos en la LMA no está completamente elucidado. Por lo tanto, es crucial investigar si la sobreexpresión de ZEB2 e ID2 efectivamente confiere resistencia a los tratamientos convencionales en la LMA y si la modulación farmacológica de ZEB2, utilizando compuestos como HK, CD3245, Teniposide y, en combinación con Nilotinib en células leucémicas, podría representar una estrategia terapéutica para superar la resistencia y mejorar los resultados clínicos en pacientes con LMA.

Problema científico

La investigación sobre ZEB2 en LMA se presenta como fundamental para evaluar su papel como biomarcador de pronóstico y diana terapéutica, debido a su influencia en la agresividad del cáncer y en la resistencia a quimioterapéuticos. La sobreexpresión de ZEB2, al regular la expresión de ID2, está asociada con un fenotipo más invasivo en las células de LMA, favoreciendo su capacidad para evadir la apoptosis y responder a estímulos de diferenciación, lo que contribuye a una mayor resistencia al tratamiento. La comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a esta regulación es esencial, pues ZEB2 actúa modulando vías críticas como la transición epitelio-mesenquimal y su interacción con ID2 contribuye a la plasticidad y supervivencia celular en un entorno agresivo de cáncer. Estudios centrados en la regulación cruzada entre ZEB2 e ID2 ofrecen perspectivas para desarrollar terapias que inhiban esta interacción, promoviendo la diferenciación celular y potencialmente restaurando la sensibilidad de las células leucémicas a la quimioterapia. Así, ZEB2 e ID2 no solo son elementos cruciales para entender los procesos de resistencia en LMA, sino que también representan oportunidades innovadoras para el diseño de tratamientos que puedan mejorar la eficacia terapéutica y los resultados clínicos en pacientes afectados por esta enfermedad.

Hipótesis

La sobreexpresión de ZEB2 y/o su blanco transcripcional ID2 generarán resistencia al tratamiento en Leucemia mieloide aguda.

Objetivo general

Evaluar si la sobreexpresión de ZEB2 y/o ID2 genera resistencia a la muerte celular mediada por quimioterapéuticos en leucemia mieloide aguda.

Objetivos específicos

1. Caracterizar modelos celulares de leucemia mieloide con delección o sobreexpresión de ZEB2 y/o ID2.
2. Evaluar el efecto de drogas quimioterapéuticas en la resistencia a la muerte celular de células de leucemia mieloide que presenten alteración de ZEB2 y/o ID2.

Metodología

Líneas celulares

Los modelos celulares de AML con sobreexpresión o delección de ZEB2 se realizarán en tres líneas celulares. La línea celular THP-1 (ATCC código TIB-202) corresponde a células de leucemia monocítica humana. La línea celular KASUMI-1 (ATCC código CRL-2724) corresponde a células de leucémica mieloide aguda que presenta una translocación cromosómica 8;21. Esta translocación coloca los genes AML1 y ETO (o MTG8) en proximidad, lo que da lugar al gen de fusión AML1-ETO (también conocido como AML1-MTG o RUNX1-CBF2T1). Como resultado, las células producen la proteína quimérica AML1-ETO. Esta proteína regula a la baja la expresión de CEBPA, tanto a nivel de ARN mensajero como de actividad de unión al ADN, lo cual es crucial para la diferenciación de los granulocitos (THP-1 - TIB-202 | ATCC, n.d.). La línea celular HEK293T (ATCC código CRL-3216) perteneciente a células epiteliales provenientes del riñón se utilizará para la transfección de ZEB2 e ID2 y luego posterior infección a de las THP-1 y KASUMI-1.

Cultivo celular

La línea celular THP-1 se mantendrá en medio de cultivo RPMI-1640 + 2mM L-glutamina + 10% suero bovino fetal (FBS) + Penicilina (100 U/ml)-Estreptomicina (100 µg/ml). Se conservarán las células en suspensión, en frascos T75 a 37C, con un 5% de CO₂ en aire humidificado en una incubadora con pasajes entre 3 y 4 días. Nivel de densidad entre 2×10^5 y 1.5×10^6 células. La línea celular KASUMI-1 se mantendrá en medio de cultivo RPMI-1640 + 2mM L-glutamina + 20% FBS inactivado previamente a 50C durante 30 min + Penicilina (100 U/ml)-Estreptomicina (100 µg/ml). Se conservarán las células en suspensión, en frascos T75 a 37C, con un 5% de CO₂ en aire humidificado en una incubadora con pasajes entre 3 y 4 días. Nivel de densidad entre 3×10^5 y 3×10^6 células. La línea celular HEK-293T se mantendrá en medio de cultivo DMEM + 2mM L-glutamina + 10% FBS + Penicilina (100 U/ml)-Estreptomicina (100 µg/ml) al descongelar y se pasaran a DMEM + 2mM L-glutamina + 10% FBS + Penicilina (100 U/ml)-Estreptomicina (100 µg/ml) combinado con RPMI-1640 + 2mM L-glutamina + 10% FBS + Penicilina (100 U/ml)-Estreptomicina (100 µg/ml) a razón de 8:2, 5:5 y 7:3, en el quinto día post-congelación, 7 día post-congelación y mantenimiento para los experimentos respectivamente. Se conservarán las células adheridas en placas de 100 mm a 37C, con un 5% de CO₂ en aire humidificado en una incubadora con pasajes entre 3 y 4 días. Nivel de densidad máximo de 10×10^6 células.

Modelo CRISPR-Cas9 de ZEB2

Generación de vector control de CRSIPR-Cas9-RFP

Para poder eliminar el oligonucleótido guía de ZEB2 y generar un vector control que exprese Cas9-RFP vacío, se agrega a un eppendorf 5 µg de Paprika RFP ZEB2, 1 µg de enzima de digestión Nde1, 1 µg de rCutSmart y se completa con agua ultrapura hasta los 10 µL de volumen total. Se incuba a 37C toda la noche. Se prepara un gel de agarosa al 1%, para ello se mezcla 0.25 g de agarosa y 25 ml de Buffer TAE 1X. Se calienta a hasta que homogenice y se le agrega 1 µL de Maestro Gen (Cat. # MR-031203). Se deja enfriar a temperatura ambiente en un molde para geles de agarosa de 25 ml. Se realiza la electroforesis del gel de agarosa al 1% a 100 V durante 45 min para comprobar la digestión del plásmido usando como control de carga al Master safe (Cat. # MR-031201).

Transformación bacteriana de vectores CRISPR-Cas9

El proceso de transformación bacteriana se realizó siguiendo el protocolo descrito a continuación. Inicialmente, se agregaron 50 µL de bacterias competentes Top Ten a un tubo Eppendorf estéril, seguido de la adición de 7 µL de los plásmidos de interés. La mezcla se incubó en hielo durante 5 minutos para facilitar la adsorción del ADN a la membrana bacteriana. Posteriormente, se aplicó un choque térmico sumergiendo el tubo en un baño de agua a 42°C durante 42 segundos, con el fin de inducir la entrada del plásmido al citoplasma bacteriano. Inmediatamente después, el tubo se colocó nuevamente en hielo por 1 minuto para detener el choque térmico.

Para la recuperación celular, se añadieron 600 µL de medio de cultivo LB líquido estéril al tubo, y la suspensión se incubó en agitación constante a 240 rpm durante 30 minutos a 37C, permitiendo la expresión de genes de resistencia a antibióticos. La mezcla se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos para sedimentar las células, y el sobrenadante fue descartado cuidadosamente. El pellet bacteriano se resuspendió en 100 µL de medio LB fresco y se sembró en

placas de Petri con agar LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron a 37 C durante 16 horas para permitir el crecimiento de colonias transformadas.

Una colonia aislada fue seleccionada e inoculada en 3 mL de medio LB líquido con kanamicina (dilución 1:1000) y cultivada bajo agitación a 240 rpm durante 16 horas a 37 C para la expansión del cultivo. Finalmente, para la preservación a largo plazo, se mezclaron 700 μ L del cultivo bacteriano con 300 μ L de glicerol estéril al 50%, y la muestra se almacenó a -80°C.

Este protocolo permitió la obtención de clones bacterianos transformados con los plásmidos de interés, garantizando su viabilidad y estabilidad genética para estudios posteriores.

Metodología de Electroporación para la Generación de Modelos Knock-Out de Zeb2 en Líneas Celulares THP-1 y KASUMI-1

Para la generación de modelos knock-out de Zeb2 en las líneas celulares THP-1 (ATCC® TIB-202™) y KASUMI-1 (DSMZ ACC 220), se empleó el plásmido Paprika RFP ZEB2 (ATUM, Plasmid pD1301-AP:55690) junto con su control Paprika RFP ZEB2 control (creado anteriormente).

Preparación celular

Las células THP-1 se centrifugaron a 500 \times g durante 5 minutos a temperatura ambiente (centrífuga Eppendorf 5810R, rotor A-4-62). El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 5 mL de PBS 1X estéril (Sigma-Aldrich, cat. #P3813). El lavado se repitió con una segunda centrifugación a 500 \times g durante 5 minutos, eliminando completamente el sobrenadante.

Electroporación

Se preparó una mezcla de 20 μ g del plásmido Paprika RFP ZEB2 o su control en 100 μ L de Buffer de Resuspensión (Thermo Fisher Scientific, cat. #ECM6401). La suspensión celular se transfirió a una cubeta de electroporación de 100 μ L (Bio-Rad, cat. #1652088). La electroporación se realizó utilizando el sistema Neon™ Transfection System (Thermo Fisher Scientific) bajo los siguientes parámetros: 1600 V, 10 ms y 3 pulsos. Inmediatamente después de la electroporación, las células se incubaron en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, cat. #11875093) suplementado con 10% FBS (Gibco, cat. #10437028) y se mantuvieron a 37 C con 5% de CO₂ durante 48 horas para la recuperación.

Estandarización de la Técnica

Para optimizar las condiciones de electroporación, se evaluaron tres protocolos alternativos utilizando los plásmidos Paprika RFP ZEB2 y Paprika RFP ZEB2 control. Los parámetros probados fueron: Condición 1: 1600 V, 10 ms, 3 pulsos, 10 x 10⁶ células en 100 μ L de buffer. Condición 2: 1600 V, 20 ms, 2 pulsos, 10 x 10⁶ células en 100 μ L de buffer. Condición 3: 1600 V, 10 ms, 3 pulsos, 20 x 10⁶ células en 100 μ L de buffer.

La condición 1 mostró la mayor eficiencia de transfección (mayor a 80%) y viabilidad celular (mayor a 70%), determinada mediante citometría CellCounter(Thermo Fisher, cat. #AMQAF2000).

Cultivo Post-Electroporación

Las células electroporadas se sembraron en placas de 6 pozos (Corning, cat. #3516) con medio selectivo suplementado con penicilina/estreptomicina (Gibco, cat. #15140122) y se monitorizaron diariamente para evaluar la expresión de mCherry y la formación de colonias.

Para la realización de la técnica se usan 20 μ g de Paprika RFP Zeb2 y 20 μ g de Paprika RFP Zeb2 control en 100 μ L de Buffer de Resuspensión. Se electropora a 1600 V, 10 ms y 3 pulsos. Se incuban a 37 C con 5% de CO₂.

Metodología de Transducción Lentiviral para la Expresión de ZEB2 e ID2 en Líneas Celulares THP-1 y KASUMI-1

Vectores y plásmidos utilizados

Se empleó el plásmido Tet-O-FUW-EGFP (Addgene, cat. Plasmid #30130) como vector control, un plásmido lentiviral Tet-inducible que expresa EGFP. La proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) presenta un pico de excitación a 488 nm (luz azul) y emite luz de manera óptima a 507 nm. Adicionalmente, se utilizaron los plásmidos Tet-O-FUW-ZEB2-P2A-mCherry (que expresa ZEB2) (Addgene, cat. Plasmid #203857) y Tet-O-FUW-ID2-P2A-mCherry (que expresa ID2, un gen regulador de ZEB2) (Addgene, cat. Plasmid #203865). Para la producción de partículas virales en células HEK-293T, se emplearon los plásmidos de empaquetamiento pMD2.G (Addgene, cat. #12259) que codifica para la proteína VSV-G (*Vesicular Stomatitis Virus Protein*) y psPAX2 (Addgene, cat. #12260) que codifica para *HIV-1 gag* y *HIV-1 pol*.

Expansión de plásmidos comerciales

Se añadieron muestras de los tubos con los plásmidos comerciales EGFP, ID2, EGFP a 6 mL de medio de cultivo LB líquido estéril a un falcon cada uno, se incubó en agitación constante a 240 rpm durante 16 horas a 37 C, permitiendo la expansión de las bacterias. La mezcla se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos para sedimentar las células, y el sobrenadante fue descartado cuidadosamente. El pellet bacteriano se resuspendió en 100 μ L de medio LB fresco y se sembró en placas de Petri con agar LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron a 37 C durante 16 horas para permitir el crecimiento de colonias. Una colonia aislada fue seleccionada e inoculada en 3 mL de medio LB líquido con ampicilina (dilución 1:1000) y cultivada bajo agitación a 240 rpm durante 16 horas a 37 C para la expansión del cultivo. Finalmente, para la preservación a largo plazo, se generaron *Glicerol stocks*. Se mezclaron 700 μ L del cultivo bacteriano con 300 μ L de glicerol estéril al 50%, y la muestra se almacenó a -80°C.

Preparación de modelos celulares

Se utilizaron las líneas celulares THP-1 y HEK-293T. Las células THP-1 se usaron en cantidades de 5×10^6 , 10×10^6 y 20×10^6 células. Se centrifugaron a $500 \times g$ durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 5 mL de PBS 1X. Este paso se repitió una vez más para garantizar la eliminación de residuos del medio de cultivo.

Para las células HEK-293T, en cantidades de 10×10^6 células, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 3 mL de tripsina, incubando durante 5 minutos a 37 C. Posteriormente, se neutralizó la tripsina con 5 mL de medio DMEM completo y se recolectaron las células en un tubo Falcon de 15 mL. La suspensión se centrifugó a $1000 \times g$ durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante.ss

Transfección y producción de lentivirus

Se resuspendieron las células en Buffer de Resuspensión (Thermo Fisher Scientific, cat. #ECM6401) y se mezclaron con 25 μ g, 30 μ g y 60 μ g de los plásmidos de expresión (Tet-O-FUW-EGFP-P2A-mCherry, Tet-O-FUW-ZEB2-P2A-mCherry o Tet-O-FUW-ID2-P2A-mCherry) junto con 15 μ g de los plásmidos lentivirales (pMD2.G y psPAX2) en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. La electroporación se realizó utilizando puntas de 100 μ L y los parámetros para las HEK-293T fueron 800 V y 900 V, 20ms, 2 pulsos, y para las células THP-1 se usaron las condiciones de 1400 V y 1600 V, 20 ms, 2 pulsos, más la condición de 1600 V, 10 ms, 3 pulsos.

Posteriormente, las células se sembraron en matraces de 25 cm² con medio de cultivo adecuado: RPMI-1640 completo sin antibióticos para THP-1, y DMEM completo sin antibióticos para HEK-293T. Las células se incubaron a 37 C con 5% de CO₂. A las 24 horas, se reemplazó el medio por uno con antibióticos.

Transducción lentiviral

A las 48 horas post-transfección, se añadió polibreno (8 μ g/mL) al medio de cultivo de THP-1 y HEK-293T. El sobrenadante viral se recolectó a las 24, 72 y 96 horas posteriores a la adición de polibreno, se filtró usando filtros de 0.45 y 0.22 μ m y se almacenó a 4°C.

Para la transducción de células THP-1 *wild type*, estas se centrifugaron a 900 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en el medio viral conteniendo polibreno, es un polímero catiónico que aumenta la eficiencia de la trasfección. La transducción se realizó mediante espinoculación (2500 rpm y 1500 rpm, 90 y 45 minutos), seguida de incubación a 37 C con 5% CO₂ durante 24 horas. Finalmente, el medio se reemplazó por RPMI-1640 suplementado con 10% FBS y 1% penicilina/estreptomicina a las 24h y 48h. La expresión de fluorescencia se evaluó a las 24 horas post-transducción.

Separación de células mediante fluorescencia activada

Para el procedimiento se recolectan las células THP-1 en un falcon de 15 ml y se centrifugan a 1000 rpm por 5 min. Se elimina el sobrenadante y se resuspende en 1 ml de medio de citometría (2% FBS en PBS). Se agrega 1ml de medio de citometría se pasa a un tubo de citometría y se coloca en el citómetro. El citómetro clasifica y separa las células en las distintas poblaciones, de acuerdo con si presentan la fluorescencia roja del plásmido de ZEB2 e ID2 y verde para el control EGFP, para su posterior estudio en un falcon de 15 ml. Se agregan las células separadas a una placa de 100 mm. Se incuba a 37 C con 5% de CO₂.

Metodología y Análisis Computacional para la Identificación de Compuestos con Actividad Antitumoral en LMA

La identificación de compuestos con actividad inhibitoria contra ZEB2 se realizó mediante un enfoque dual que combinó revisión bibliográfica y modelado bioinformático. Los compuestos fueron seleccionados a partir de *webscraping* en bases de datos científicas (PubMed, Scopus y Nature), utilizando términos como *ZEB2*, *inhibitors* y *drug resistance in AML*. Por otro lado, se realizó un análisis predictivo basado en aprendizaje automático. Para esto, se emplearon datos públicos de la plataforma DepMap (*Cancer Dependency Map*), incluyendo conjuntos como *PRISM Repurposing Primary 23Q2* (perfiles de sensibilidad a fármacos en líneas celulares hematológicas), *Drug sensitivity (PRISM Repurposing Primary Screen)* (respuestas a compuestos en dosis replicadas), *Methylation (1kb upstream TSS)* (patrones de metilación en regiones promotoras), *Proteomics* (expresión proteica), *Metabolomics* (perfiles metabólicos) y CRISPR (*DepMap Public 23Q4 + Score, Chronos*) (dependencia génica mediante edición CRISPR).

Preprocesamiento de Datos

Los datos brutos fueron sometidos a un proceso de depuración en el que se eliminaron características con más del 80% de valores nulos o ceros, asegurando la robustez del conjunto de datos. Este filtrado minimizó el ruido analítico y optimizó la dimensionalidad para el entrenamiento algorítmico.

Configuración del Modelo Predictivo

Se implementó un modelo de *Random Forest Regressor* (mediante *scikit-learn v1.3*) para predecir la actividad antitumoral de compuestos químicos, utilizando variables moleculares integradas de naturaleza transcriptómica, metilómica, proteómica y metabolómica. El modelo se entrenó con 100 estimadores, garantizando equilibrio entre complejidad y eficiencia computacional, y se validó mediante una división estratificada 80-20 (entrenamiento-prueba) para preservar la distribución subyacente de los datos.

Evaluación de Importancia de Características

La relevancia predictiva de cada variable molecular se cuantificó mediante el método de reducción de impureza de Gini, que mide la contribución de cada característica a la homogeneidad de los nodos en los árboles de decisión. Para evitar sesgos por aleatoriedad inherente al algoritmo, se priorizaron aquellas características con alta frecuencia de aparición y valor predictivo consistente en múltiples iteraciones (n=30). Las 20 características más relevantes de cada modelo fueron agrupadas en una matriz de frecuencia absoluta, permitiendo identificar patrones transversales en las firmas moleculares asociadas a actividad antitumoral.

Selección de Compuestos Candidatos

A partir de las características con mayor frecuencia absoluta, se realizó un filtrado bioinformático orientado a compuestos con aplicabilidad clínica en leucemia, priorizando inhibidores de receptores de tirosina quinasa (RTK) por su relevancia en terapias actuales (p. ej., Imatinib, Dasatinib). Este enfoque permitió identificar al Nilotinib como candidato principal. Este fármaco, aprobado por la FDA para leucemia mieloide crónica (Drugs@FDA: NDA

022068), mostró asociación consistente con firmas genéticas de resistencia en LMA, particularmente en la regulación de vías dependientes de BCR-ABL1 y KIT, mecanismos clave en la progresión tumoral.

Implementación Técnica

Todo el análisis se ejecutó en Python 3.10, utilizando pandas para la manipulación de datos, scikit-learn para el modelado, y seaborn para la visualización de resultados. Los scripts y datos complementarios están disponibles en un repositorio GitHub (https://github.com/kuhakucode/Drugs_finder), asegurando transparencia y reproducibilidad.

Ensayo de viabilidad celular mediante imagen en tiempo real: Incucyte

Estandarización de las concentraciones de los compuestos.

Se sembraron 4×10^6 células en 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con Sytox Green (1 nM, Invitrogen™, cat. # S7020) para marcar células muertas. La suspensión celular se distribuyó en alícuotas de 40 μ L por pocillo en una placa de 96 pocillos, siguiendo el protocolo Incucyte®. El diseño experimental se organizó en concentraciones crecientes de Teniposide (1, 5, 10 y 100 μ M), HK (HK: 10, 20, 50 y 100 μ M), Cd3254 (0.5, 5, 50 y 100 μ M), Nilotinib (10, 20, 50 y 100 μ M) y controles con DMSO 1% por cada concentración. Cada condición se replicó en triplicado. Las placas se incubaron en el sistema Incucyte® S3 (Sartorius) a 37 C con 5% de CO₂, monitorizándose la viabilidad celular cada 2 horas durante 48 horas mediante imágenes de fase (análisis de confluencia) y fluorescencia (Sytox Green, 488/523 nm). Los datos brutos se procesaron para cuantificar la muerte celular normalizada al control DMSO y evaluar posibles efectos sinérgicos entre combinaciones de fármacos. Los datos crudos de fluorescencia y cinética celular se exportaron a archivos CSV y se procesaron en Python 3.10.15 utilizando las bibliotecas pandas 2.2.3 y matplotlib 3.9.3 para calcular el porcentaje de células muertas (fluorescencia relativa al control positivo de muerte) y los IC_{50} .

Preparación de los datos.

El archivo XML generado por el Incucyte (formato de placa de 8×12 pozos) se procesó mediante un script de Python para generar un archivo CSV de dos columnas ('Well', 'Condition'). Este CSV vinculó cada pozo con su condición experimental, como concentraciones de compuestos (e.g., Teniposide).

Segmentación de imágenes y detección de células.

Las imágenes de fase y fluorescencia verde (Sytox) se adquirieron en intervalos temporales definidos (días, horas, minutos) con el sistema Incucyte. Cada imagen se nombró siguiendo el formato:

[PlateID]_[Well]_[Replicate]_[Day]d[Hour]h[Minute]m.tiff

Para la segmentación celular, se utilizó el script de Python con el modelo preentrenado 'cyto' de Cellpose. Los parámetros clave incluyeron un diámetro celular estimado de 9 píxeles, un umbral de flujo ('flow_threshold') de 0.4 para controlar la fusión de máscaras, y un umbral de probabilidad celular ('cellprob_threshold') de 0.0 para maximizar la sensibilidad en células de baja intensidad. El procesamiento se optimizó utilizando GPU cuando estuvo disponible. Las máscaras resultantes se guardaron como archivos TIFF, y se generaron imágenes de superposición con contornos celulares para validación visual.

Análisis de muerte celular.

Se aplicaron métodos de corrección de fondo a las imágenes Sytox para reducir el ruido: desenfoco gaussiano ($\omega = 50$ píxeles), morfología matemática tophat con kernel elíptico (50 píxeles), y reducción de resolución (downsample). La intensidad fluorescente corregida se midió en cada máscara celular.

El umbral de muerte celular se determinó usando el percentil 95 de intensidad en controles con DMSO. Las células cercanas al borde de la imagen (dentro de 10 píxeles) se excluyeron para evitar artefactos. El porcentaje de células Sytox-positivas se calculó como la proporción de células por encima del umbral respecto al total, generando series temporales para cada condición.

Análisis de curvas dosis-respuesta e IC_{50} .

Los datos se agruparon por condición y tiempo usando un script de Python, calculando la media y desviación estándar del porcentaje de muerte celular. Se ajustaron modelos logísticos para estimar el IC_{50} :

- Modelo de 4 parámetros:

$$y = bottom + \frac{top - bottom}{1 + (x/IC50)^{hill}}$$

- Modelo de 3 parámetros (asumiendo $bottom = 0$):

$$y = \frac{top}{1 + (x/IC50)^{hill}}$$

Se priorizó el ajuste en el último tiempo registrado, con tiempos alternativos (36, 24, 12, 6 horas) si faltaban datos. Se calcularon R^2 , valores p, y la concentración para alcanzar el 50% de muerte celular. Los resultados se exportaron a CSV y PDF, incluyendo gráficos de curvas de ajuste y resúmenes de IC_{50} .

Herramientas y validaciones.

El análisis empleó Python 3.10.15 con bibliotecas como Cellpose 3.1.0, scikit-image 0.24.0, OpenCV 4.10.0.84, pandas 2.2.3, matplotlib 3.9.3 y SciPy 1.14.1. Las validaciones visuales incluyeron imágenes de superposición con contornos celulares y marcadores 'X' para células Sytox-positivas en controles. Se garantizó reproducibilidad mediante tres réplicas técnicas por condición y exclusiones automáticas por inconsistencias en nombres de archivo (validado en modo 'dry_run').

Validación de IC_{50} .

Se realizó otro análisis donde se sembraron 4×10^6 células en 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con Sytox Green (1 nM, Invitrogen™, cat. # S7020) para marcar células muertas. La suspensión celular se distribuyó en alícuotas de 40 μ L por pocillo en una placa de 96 pocillos, siguiendo el protocolo Incucyte®. El diseño experimental se organizó con concentraciones seriadas decrecientes de Teniposide, HK, Cd3254 y Nilotinib (100–0.5 μ M), distribuidas de la siguiente manera: cada fila correspondió a una concentración decreciente del mismo fármaco (A: 100 μ M; B: 50 μ M; C: 25 μ M; D: 12.5 μ M; E: 6.25 μ M; F: 3.13 μ M; G: 1.56 μ M; H: 0.5 μ M); y cada bloque de tres columnas albergó un fármaco específico (Teniposide, HK, Cd3254 y Nilotinib), replicándose cada concentración en triplicado técnico. Los tratamientos se aplicaron utilizando DMSO 0.1% como control de vehículo. Las placas se incubaron en el sistema Incucyte® S3 (Sartorius) a 37°C con 5% de CO_2 , monitorizándose la viabilidad celular cada 2 horas durante 48 horas mediante imágenes de fase (análisis de confluencia) y fluorescencia (Sytox Green, 488/523 nm). Los datos se procesaron para evaluar la muerte celular normalizada al control y analizar posibles efectos dependientes de la concentración. Los datos de muerte celular obtenidos del sistema Incucyte, se procesaron mediante un script de Python.

Preparación de los datos.

Los archivos CSV de entrada, con series temporales del porcentaje de membrana permeable (Sytox-positivas), se analizaron identificando columnas relevantes que contenían concentraciones en μ M de los compuestos, excluyendo aquellas con errores estándar ('Std Err Well'). Las concentraciones numéricas se extrajeron de los nombres de las columnas (ejemplo: 'Nilo 100 μ M' \rightarrow 100 μ M), se ordenaron de forma ascendente, organizándose en matrices de valores medios y errores estándar, ajustados al rango [0, 100%]. Para cada condición, se generaron curvas temporales con intervalos de confianza (bandas de error) y barras de desviación estándar, junto con el cálculo del área bajo la curva (AUC) mediante integración trapezoidal. El tiempo para alcanzar el 50% de muerte celular (T50) se determinó mediante interpolación lineal entre puntos consecutivos o ajuste polinómico de segundo grado. Adicionalmente, para tiempos específicos (opción -time), se estimó el IC_{50} mediante interpolación lineal entre dosis. Los resultados se integraron en informes PDF automatizados, generados con bibliotecas de Python (pandas 2.2.3, matplotlib 3.9.3, numpy 2.0.2 y SciPy 1.14.1), incluyendo gráficos estandarizados y resúmenes textuales. Los

datos se validaron excluyendo valores no numéricos, normalizando porcentajes al rango [0, 100], y asumiendo tres réplicas técnicas por condición para garantizar reproducibilidad.

Sinergia entre compuestos.

Para determinar la sinergia entre los compuestos se realizó otro experimento donde se sembraron 4×10^6 células en 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con Sytox Green (1 nM, Invitrogen™, cat. # S7020) para marcar células muertas. La suspensión celular se distribuyó en alícuotas de 40 μ L por pocillo en una placa de 96 pocillos, siguiendo el protocolo Incucyte®. El diseño experimental se organizó en concentraciones decrecientes (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 0.5 μ M) de HK, Cd3254 o Nilotinib combinadas con Teniposide 10 μ M, así como controles de DMSO 1% para cada concentración. Cada combinación (ejemplo: “HK X μ M Teniposide 10 μ M”) se dispuso en triplicado técnico. También se usó Teniposide 10 μ M como control positivo de muerte celular. Las placas se incubaron en el sistema Incucyte® S3 (Sartorius) a 37°C y 5% de CO₂, monitoreándose la viabilidad celular cada 2 horas durante 48 horas mediante imágenes de fase (confluencia) y fluorescencia (Sytox Green, 488/523 nm).

Preparación de los datos.

Para el análisis de sinergia, se utilizó un script personalizado en Python 3.10.15 que procesó los datos brutos en formato CSV. El algoritmo seleccionó la última medición temporal o la más cercana a un tiempo específico (argumento “-time”), calculando la fracción de muerte celular (FK) normalizada al control DMSO:

$$FK = 1 - \frac{\text{valor_muestra}}{\text{valor_DMSO}}$$

con error estándar aproximado:

$$SE_{FK} \approx \frac{SE_{\text{muestra}}}{\text{valor_DMSO}}$$

La sinergia se cuantificó como la diferencia entre la (FK) de Teniposide y la combinación:

$$\text{Sinergia} = FK_{\text{Teniposide}} - FK_{\text{combinación}}$$

propagando los errores:

$$SE_{\text{sinergia}} = SE_{FK_{\text{Teniposide}}} + SE_{FK_{\text{combinación}}}$$

La significancia estadística se determinó mediante prueba z, asignando estrellas según el valor p ($p < 0.05$: *, $p < 0.01$: **), etc.). Los resultados se integraron en un informe PDF con gráficos de barras para (FK) y subgráficos de sinergia por fármaco, manteniendo escalas unificadas y anotaciones de significancia. El diseño evitó solapamientos y aseguró triplicados técnicos para todas las condiciones, garantizando robustez en la interpretación de datos.

Ensayo para la cuantificación de ARN

Se realizó el ensayo de RT-qPCR para la cuantificación de la expresión de ARN mensajero de los genes ZEB1, ZEB2 e ID2. Se prepararon 6×10^6 células en 2 ml de medio RPMI 1640 + 10% de suero fetal bovino (FBS) + 1% de Penicilina/Estreptomycin en una placa de 6 pocillos de 60 mm y se dejaron crecer 24h. Se agregó 2 μ L de Teniposide a 10mM para una concentración final de 10 μ M + 2 μ L de DMSO, 2 μ L de Nilotinib a 50 mM para una concentración final de 50 μ M + 2 μ L de DMSO, y el control con 4 μ L de DMSO. Se realizó el experimento en triplicado con células procedentes de diferentes Flask de manera independiente. Se colectaron las muestras a las 24h y se realizó la extracción de ARN utilizando el E.Z.N.A. Total RNA Kit I de Omega Bio Tek siguiendo sus instrucciones de manual. Luego se realizó el mix con 40 μ L de RNA (concentración promedio de 250 ng/ μ L) + 10 μ L de Buffer 5x + 1 μ L de MMLV + 2 μ L de dNTPs. Se realizó el anclaje en termociclador MiniAmp Plus Thermal Cycler con 4 μ L de Oligo dT a 70°C por 5 min, luego se enfrió a 4°C por 10 min donde se le agrega el mix preparado con anterioridad a cada muestra. Se calienta a 42°C por 1h, luego a 65°C por 15 min y por último se enfrió a 4°C. Se realiza la preparación de placa de 96 pocillos con las muestras por triplicado y se cuantifica mediante qPCR con el equipo LightCycler®480. Se analizan los datos obtenidos en el software LightCycler®480

versión 1.5.1.62 con la extracción de los CT y las *Melting Curves* mediante el método de la Derivada Máxima. Luego se realizó el cálculo del delta-delta-CT en Python.

Ensayo para la cuantificación de proteínas

Preparación del tampón RIPA

El tampón RIPA Tabla 2 se preparó fresco mezclando los componentes. Los reactivos se agregaron secuencialmente en un volumen final de 50 mL, ajustando el pH a 8.0 con HCl. Posteriormente, la solución se alícuotó en tubos de 1.5 mL, añadiendo 1 μ L de inhibidores de proteasas por alícuota según las recomendaciones del fabricante, y se almacenó a -20°C .

Tabla 2. Composición del tampón RIPA (50 mL)

Reactivo	Concentración final	Concentración stock	Volumen (mL)
NaCl	150 mM	5 M	1.5
Tris HCl (pH 8.0)	50 mM	1 M	2.5
SDS	0.1%	10%	0.5
Triton X-100	1%	100%	0.5
Desoxicolato de sodio	0.5%	10%	2.5
Agua destilada	–	–	42.5

Cultivo y recolección de células THP-1

Las células THP-1, mantenidas en suspensión, se recolectaron por triplicado para cada condición experimental (DMSO, Teniposide, Nilotinib, Teniposide+Nilotinib). Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones. Los pélets celulares se resuspendieron en 80 μ L de tampón RIPA, se incubaron en hielo durante 10 minutos y se homogenizaron mediante vortex a 4 rpm durante 10 minutos a 4°C . Tras una centrifugación a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C , los sobrenadantes se almacenaron a -20°C para su posterior cuantificación proteica.

Cuantificación de proteínas mediante ensayo de Bradford

La concentración proteica se determinó usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar, preparando una curva de calibración con concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para cada muestra, se mezclaron 800 μ L de reactivo de Bradford con 200 μ L de agua ultrapura, añadiendo 1 μ L de estándar o muestra proteica. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro, utilizando un blanco para calibrar el equipo.

Desnaturalización de proteínas y electroforesis SDS-PAGE

Las muestras se ajustaron a una concentración uniforme y se mezclaron con 7.0 μ L de tampón de carga 6X, calentándose a 100°C durante 5 minutos. Se cargaron 40 μg de proteína por pozo en geles de poliacrilamida en gradiente al 8% y 15% (

Tabla 3

Tabla 3), realizando la electroforesis a 180 V durante 180 minutos con refrigeración. Se utilizó el marcador de peso molecular AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder (MaestroGen, cat. #02101-250), que abarca un rango de 10 a 180 kDa e incluye bandas de referencia coloreadas en rojo (~75 kDa) y verde (~25 kDa) para facilitar la estimación del tamaño de las proteínas.

Tabla 3. Composición de geles de poliacrilamida

Reactivo	Gel separador 8% (mL)	Gel separador 15% (mL)	Gel concentrador (mL)
Acrilamida	1.33	2.5	1.83
Tris 1.5M (pH 8.8)	1.3	1.3	0.63
SDS 10%	0.05	0.05	0.05
APS 10%	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.005	0.005	0.005
Agua destilada	2.27	1.1	3.4

Transferencia Western

Se preparó un tampón de transferencia 1X mezclando 800 mL de Tris-Glicina 1X con 200 mL de metanol. La membrana PVDF se activó en metanol al 100% durante 5 minutos antes de ensamblar el *sándwich* de transferencia. La transferencia se realizó a 30 V durante 16 horas.

Inmunodetección

La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en TBST (24.8 g Tris-base, 8.8 g NaCl en 400 mL agua destilada, pH 7.6) durante 1 hora. Tras tres lavados de 5 minutos con TBST, se incubó overnight a 4°C con anticuerpos primarios anti-actina (1:1000), anti-ZEB2 de conejo (1:300). Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 min y se incubó con anticuerpos secundarios *anti-mouse* para ZEB2, y *anti-rabbit* para Actina durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se realizaron tres lavados de 5 min. Finalmente, se aplicó el sustrato ECL durante 5 min y las señales se capturaron en un sistema quimioluminiscente (Omega LumTM G Chemiluminescent Imaging Systems) con la opción Multiple con exposiciones de 30 seg, 1, 3, 5 y 15 minutos.

Citometría de flujo

Cultivo celular y tratamiento de drogas para citometría de flujo para viabilidad y diferenciación

Se sembraron 6×10^6 células THP-1 en 2 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina/estreptomicina, en placas de 6 pocillos (diámetro 60 mm), y se incubaron durante 24 horas a 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO₂. Posteriormente, se aplicaron los tratamientos de la siguiente manera:

- Grupo Teniposide + DMSO: 2 μ L de Teniposide (stock 10 mM) para alcanzar una concentración final de 10 μ M, más 2 μ L de DMSO como vehículo.

- Grupo Nilotinib + DMSO: 2 μL de Nilotinib (stock 50 mM) para una concentración final de 50 μM , más 2 μL de DMSO.
- Grupo Teniposide + Nilotinib: 2 μL de Teniposide (stock 10 mM) + 2 μL de Nilotinib (stock 50 mM) para una concentración final de 50 μM .
- Grupo Control: 4 μL de DMSO, equivalente al volumen total de vehículo utilizado en los grupos tratados.

Los tratamientos se realizaron en triplicado biológico, utilizando células provenientes de cultivos independientes (diferentes flascos de cultivo) para garantizar la robustez de los resultados. Tras 24 horas de incubación, las células se recolectaron mediante centrifugación (1000 rpm, 5 min, 4°C), se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en tampón de citometría (PBS con 2% FBS)

Tinción para citometría de flujo

La tinción se realizó siguiendo el protocolo optimizado descrito en el Cuadro 1. Brevemente, las células se incubaron con los anticuerpos conjugados y Zombie (APC-Cy7) (para evaluar viabilidad) en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Los detalles de los reactivos utilizados se resumen en la (Tabla 4).

Tabla 4. Anticuerpos para la citometría de flujo

Reactivo	Fluorocromo	Concentración final	Volumen de anticuerpo (μL)*	Proveedor
Anti-human CD68	Alexa Fluor® 647	1–2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1–2	BD Biosciences
Anti-mouse/human CD11b	FITC	1–2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1–2	Thermo Fisher
Zombie APC-Cy7 (viabilidad)	Zombie APC-Cy7	Según fabricante	0.5–1	Invitrogen

- Volúmenes ajustados según la concentración del stock.

Adquisición y análisis en citómetro de flujo

Las muestras se analizaron en un citómetro BD FACSAria III, utilizando controles de compensación y puertas secuenciales para excluir agregados y células muertas (Zombie APC-Cy7+). Los datos se procesaron con FlowJo v10.8, cuantificando las poblaciones vivas y muertas positivas o no para el marcador CD68 con el objetivo de evaluar integridad de membrana y/o diferenciación.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm SEM. Las diferencias entre grupos se determinaron mediante ANOVA unidireccional con corrección de Tukey ($p < 0.05$). Los triplicados biológicos y técnicos aseguraron la reproducibilidad de los datos.

Resultados

Pipeline bioinformático

El primer objetivo de esta tesis se centró en la identificación de compuestos candidatos con actividad inhibitoria contra ZEB2. Mediante una estrategia dual que combinó la revisión bibliográfica y el modelado bioinformático, se lograron identificar cuatro compuestos principales: Teniposide, HK, Cd3254 y Nilotinib.

Los compuestos Teniposide, HK y Cd3254 fueron seleccionados a través de un algoritmo de *webscrapping* utilizando términos clave relacionados con los términos: “ZEB2” AND “Cell death”.

Por otro lado, la identificación de Nilotinib, compuesto aprobado por la FDA usando extensivamente en Leucemia Mieloide Crónica (LMC). Esta droga es un inhibidor de la quinasa BCR-ABL1 (Jain et al., 2017) se realizó mediante un análisis predictivo basado en un modelo de Random Forest Regressor entrenado con datos públicos de la plataforma DepMap. Este modelo integró información multiómica, incluyendo perfiles de sensibilidad a fármacos, datos de metilación, expresión proteica, perfiles metabólicos y dependencia génica mediante CRISPR.

La Figura 4 en el Panel A muestra un esquema del modelo de Random Forest utilizado. La Figura 4 en el Panel B ilustra la importancia de las características identificadas por el modelo de Random Forest para la predicción de la eficacia de los compuestos en líneas celulares mieloides. En este gráfico, se observa la frecuencia absoluta con la que diferentes compuestos y características moleculares fueron considerados importantes por el modelo en múltiples iteraciones. Nilotinib se destaca como uno de los compuestos con mayor frecuencia dentro de las características predictivas relevantes. Su identificación a través de este análisis bioinformático, junto con su aprobación por la FDA para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y su vinculación previa con mecanismos de resistencia en LMA, lo posicionan como un candidato prometedor para futuras investigaciones sobre la inhibición de ZEB2.

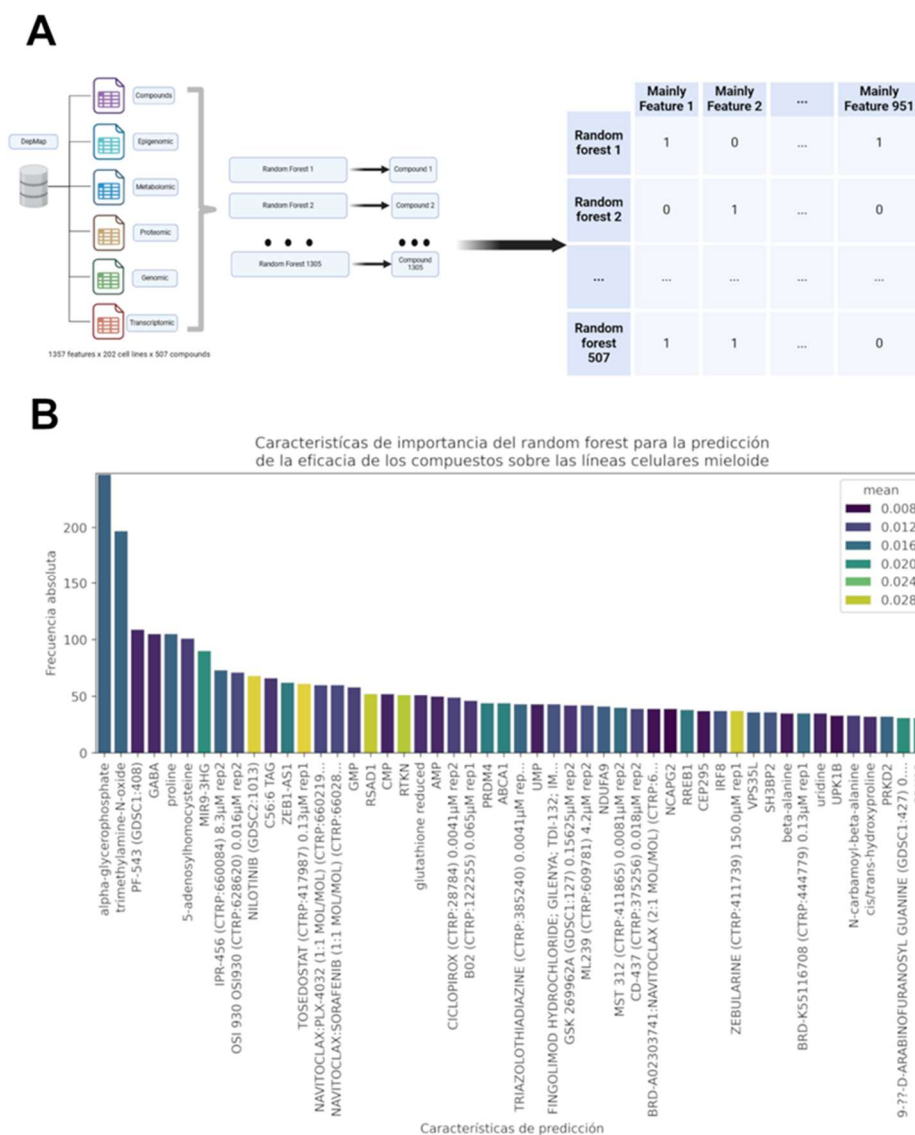
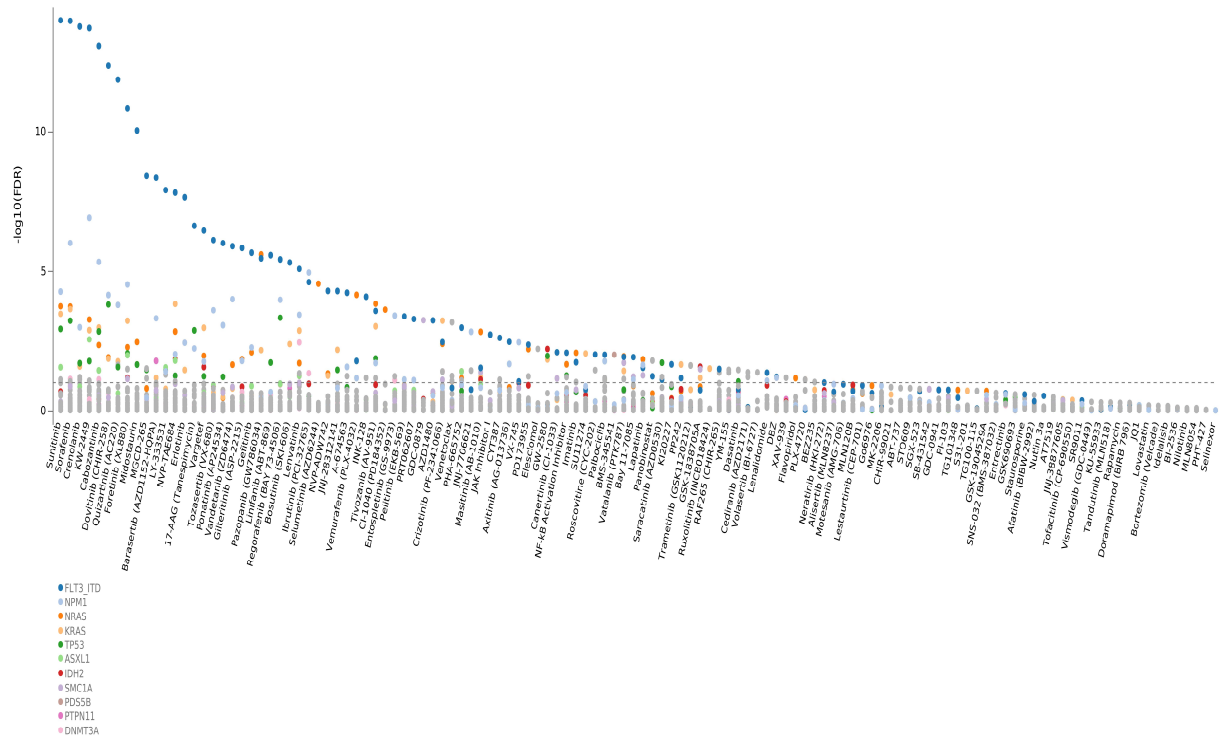


Figura 4. **Identificación de compuestos candidatos mediante modelado bioinformático.** A) Esquema del modelo de Random Forest Regressor entrenado con datos multiómicos de la plataforma DepMap para predecir la actividad antitumoral de compuestos. B) Importancia de las características identificadas por el modelo de Random Forest para la predicción de la eficacia de los compuestos en líneas celulares mieloides. Se muestra la frecuencia absoluta de cada característica y compuesto en las predicciones del modelo, coloreadas según su importancia media.

Se realizó una evaluación adicional en la plataforma Vizome (<http://vizome.org/aml/inhibitor/>), que recopila datos de compuestos con relevancia clínica y preclínica en LMA (Figura 5). El análisis reveló que la mayoría de los inhibidores evaluados están dirigidos principalmente a receptores de tirosina quinasas (RTK), con especial énfasis en FLT3_ITD, una diana terapéutica ampliamente estudiada en LMA debido a su frecuencia en alteraciones oncogénicas.

Sin embargo, no se detectó actividad significativa de los compuestos evaluados sobre ZEB2 en esta base de datos, lo que sugiere que este factor de transcripción no es una diana farmacológica priorizada en los esquemas actuales de inhibición en LMA. Estos hallazgos respaldan la necesidad de explorar estrategias terapéuticas alternativas para alteraciones genómicas no cubiertas por los inhibidores de RTK.



Thu Apr 03 2025 17:09:15 GMT-0300 (Chile Summer Time)
 :: Active variant-based filters ::
 Some variants have been excluded by default. See the Variant Filter view to add them back in.

Figura 5. Gráfico de inhibidores en LMA que muestra la significancia estadística (-log10(FDR)) de compuestos dirigidos a genes específicos. Los puntos representan inhibidores, con nombres etiquetados para los más relevantes. Las variantes genéticas asociadas (ej. FLT3_ITD, NPM1, KRAS) se indican en la parte inferior. El umbral de significancia (FDR < 0.05) corresponde a -log10(FDR) > 1.3. Datos extraídos de Vizome (<http://vizome.org/aml/inhibitor/>)

Creación del Plásmido Control CRISPR Zeb2

Generación de un plásmido control CRISPR Zeb2 mediante digestión enzimática con Nde1.

Para generar un plásmido control inactivo para el sistema CRISPR-Cas9 dirigido al gen ZEB2, se realizó una digestión enzimática del plásmido CRISPR ZEB2 comercial utilizando la enzima de restricción Nde1. Esta enzima presenta dos sitios de corte en el plásmido: uno ubicado al final de la secuencia de la guía de ARN específica para ZEB2 y otro dentro de la secuencia del gen de resistencia a la ampicilina. El objetivo de esta digestión era inactivar la función de la guía de ARN para ZEB2 mediante su escisión, generando un plásmido que sirviera como control en experimentos posteriores de knockout génico. Los resultados de la digestión se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 6). En el carril 1 del gel, se observa el plásmido CRISPR ZEB2 comercial sin digerir, presentando una única banda correspondiente a la forma superenrollada del plásmido (por ende migra más rápido en un gel con respecto a un plásmido linealizado). En el carril 2, se muestra el patrón de bandas resultante de la digestión del plásmido CRISPR ZEB2 comercial con la enzima Nde1. Se observan dos bandas distintas: una banda de mayor tamaño y otra de menor tamaño. La presencia de estas dos bandas indica que la enzima Nde1 realizó los dos cortes esperados en el plásmido, liberando un fragmento del tamaño previsto correspondiente a la región entre los dos sitios de corte, que incluye la secuencia de la guía de ARN para ZEB2. Los carriles 3 y 4 corresponden al análisis de una colonia bacteriana individual (Colonia 5) transformada con el plásmido CRISPR ZEB2. El carril 3 muestra el plásmido aislado de esta colonia sin digerir, presentando una única banda. El carril 4 muestra el mismo plásmido digerido con Nde1, donde se observa una única banda de tamaño similar al plásmido sin digerir. La presencia de una única banda tras la digestión sugiere que, en el plásmido aislado de la Colonia 5, o bien uno de los sitios de corte de Nde1 está ausente o mutado, o la digestión fue incompleta. Dado que el objetivo era asegurar la inactivación de la guía de ARN para ZEB2, y la digestión en la Colonia 5 no generó el patrón de dos bandas esperado, este plásmido no se consideró adecuado como control para los experimentos de knockout. En base al patrón de dos bandas observado en el carril 2, correspondiente a la digestión del plásmido CRISPR ZEB2 comercial con Nde1, se concluyó que este plásmido fue digerido correctamente en los dos sitios previstos, incluyendo la región de la guía de ARN para ZEB2. Por lo tanto, este material se consideró un control adecuado para los experimentos de knockout, ya que la escisión de la guía de ARN debería impedir su correcta función en la edición génica del gen ZEB2.

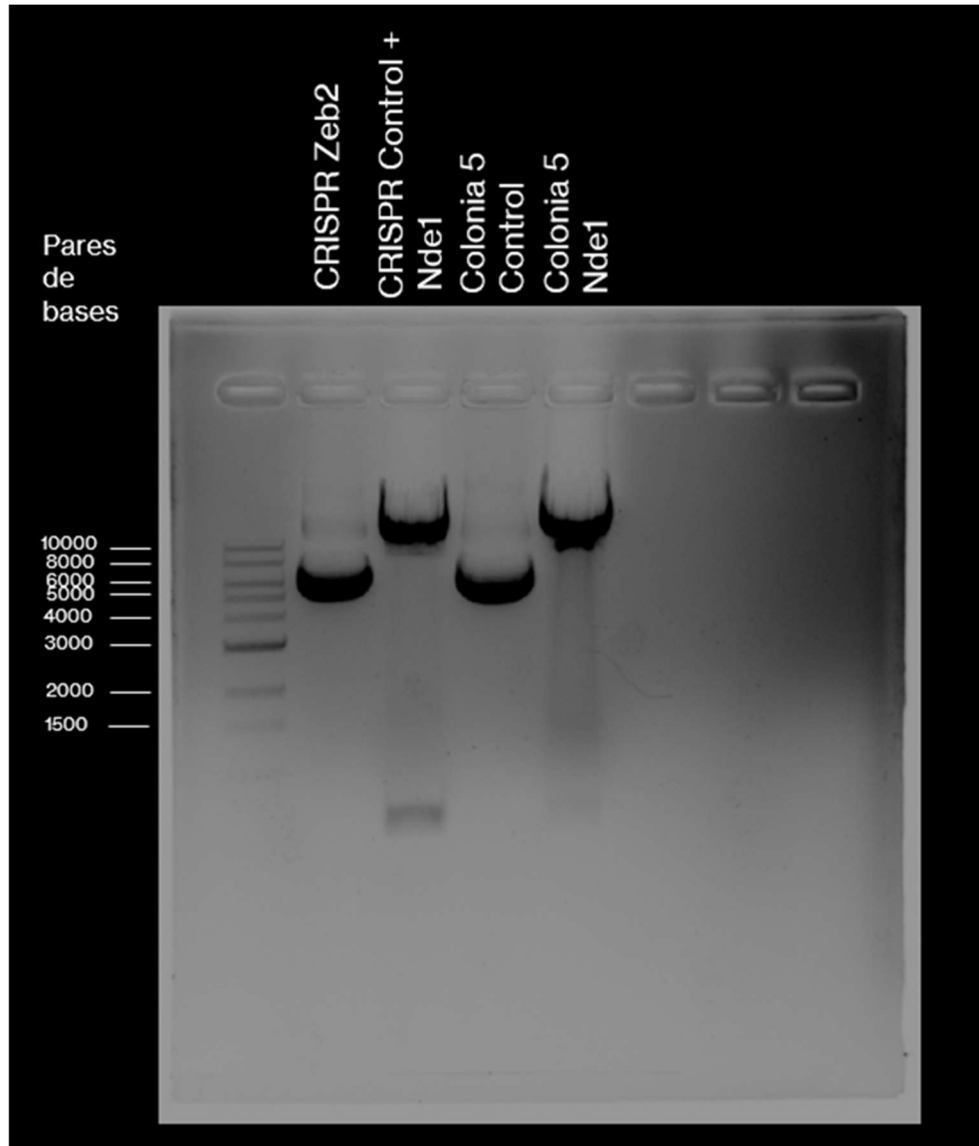


Figura 6. Análisis de la digestión enzimática con *Nde1* del plásmido CRISPR ZEB2 comercial y de una colonia transformada. Se muestra un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio visualizado bajo luz UV. **Carril 1:** CRISPR ZEB2: Plásmido CRISPR ZEB2 comercial sin digerir. Se observa una única banda correspondiente a la forma superenrollada del plásmido. **Carril 2:** CRISPR Control + *Nde1*: Plásmido CRISPR ZEB2 comercial digerido con la enzima de restricción *Nde1*. Se observan dos bandas de ADN, indicando que la enzima cortó el plásmido en los dos sitios de restricción previstos, liberando un fragmento que incluye la secuencia de la guía de ARN para ZEB2. **Carril 3:** Colonia 5 Control: Plásmido aislado de la Colonia 5 transformada con el plásmido CRISPR ZEB2, sin digerir. Se observa una única banda correspondiente a la forma superenrollada del plásmido. **Carril 4:** Colonia 5 *Nde1*: Plásmido aislado de la Colonia 5 digerido con la enzima de restricción *Nde1*. Se observa una única banda de ADN de tamaño similar al plásmido sin digerir. A la izquierda del gel se muestra un marcador de peso molecular (Master Safe) para estimar el tamaño de las bandas de ADN.

Para evaluar la eficiencia de la transfección del plásmido CRISPR con fluorescencia roja en las células THP1 mediante electroporación, se analizaron las células infectadas con partículas virales mediante microscopía de fluorescencia. La Figura 7 muestra imágenes representativas de las células en dos condiciones: un control (Panel A) y células infectadas con partículas virales conteniendo el plásmido CRISPR ZEB2 (Panel B). En las células del grupo control, se observó una mínima o nula fluorescencia roja, indicando la ausencia significativa del plásmido transfectado. En contraste, las células en la condición CRISPR ZEB2 mostraron una presencia notable de fluorescencia roja, lo que sugiere una transfección exitosa del plásmido que codifica para la proteína fluorescente roja. La mayor cantidad de células fluorescentes observadas en la condición CRISPR ZEB2 en comparación con el control indica que el protocolo de electroporación, precedido por la infección con partículas virales, fue efectivo para introducir el plásmido CRISPR en las células THP1.

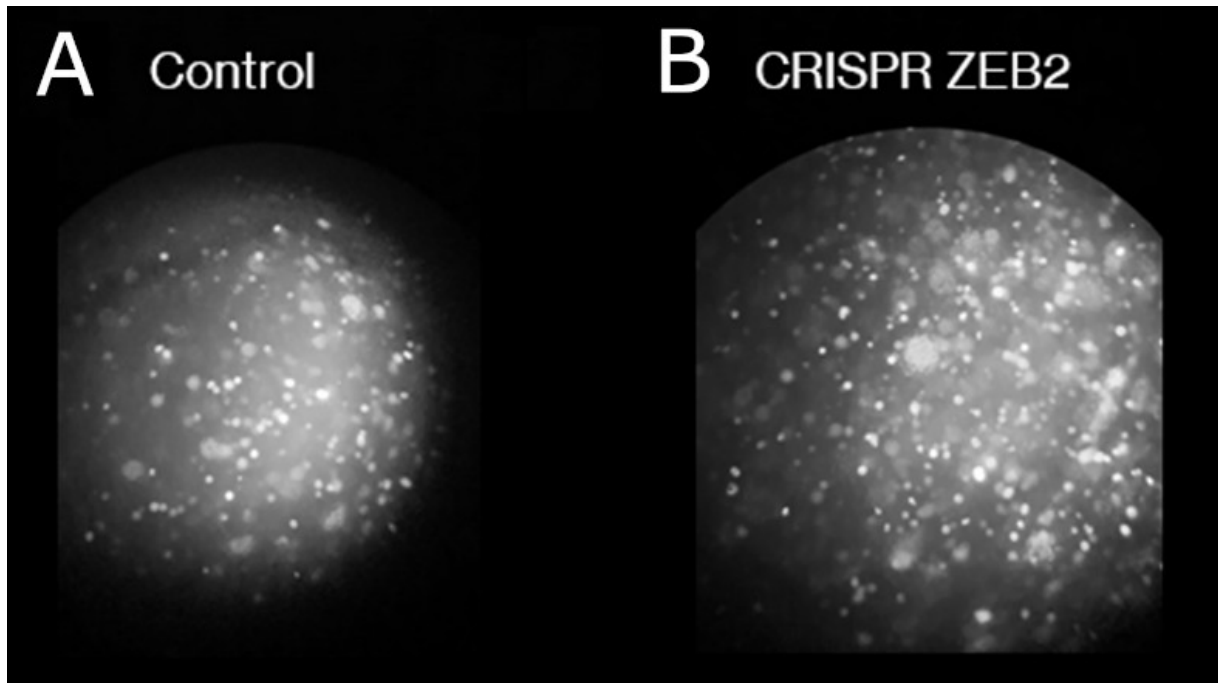


Figura 7. Evaluación de la expresión del plásmido CRISPR con fluorescencia roja en células THP1 mediante microscopía de fluorescencia. Se utilizaron células HEK293T para producir partículas virales conteniendo el plásmido CRISPR ZEB2. Estas partículas virales se utilizaron para infectar células THP-1. Posteriormente, las células THP-1 fueron sometidas a electroporación (1600 V, 10 ms, 3 pulsos). Panel A: Células THP-1 infectadas y electroporadas en ausencia del plásmido CRISPR con fluorescencia roja (control). Panel B: Células THP-1 infectadas y electroporadas con el plásmido CRISPR ZEB2, mostrando fluorescencia roja indicativa de la expresión del plásmido. Las imágenes son representativas de 5 experimentos independientes. Aumento de 40x.

Para determinar si el sistema CRISPR dirigido a ZEB2 logró disminuir su expresión en células THP1, se realizó un Western blot. La Figura 8 muestra los resultados de dos experimentos independientes. En ambos experimentos, se observó una banda correspondiente a la proteína ZEB2 en las células WT (carril 1 y 4) y en las células transfectadas con un control CRISPR (carril 2 y 5). Sorprendentemente, en las células transfectadas con el CRISPR específico para ZEB2 (carril 3 y 6), la expresión de ZEB2 no mostró una disminución significativa e incluso se observó una intensidad de banda similar o ligeramente mayor en comparación con el control CRISPR. La banda de Actina se muestra como control de carga, confirmando que se cargaron cantidades similares de proteína en cada carril. Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones experimentales utilizadas, el sistema CRISPR dirigido a ZEB2 no produjo la esperada disminución en la expresión de la proteína ZEB2 en las células THP1.

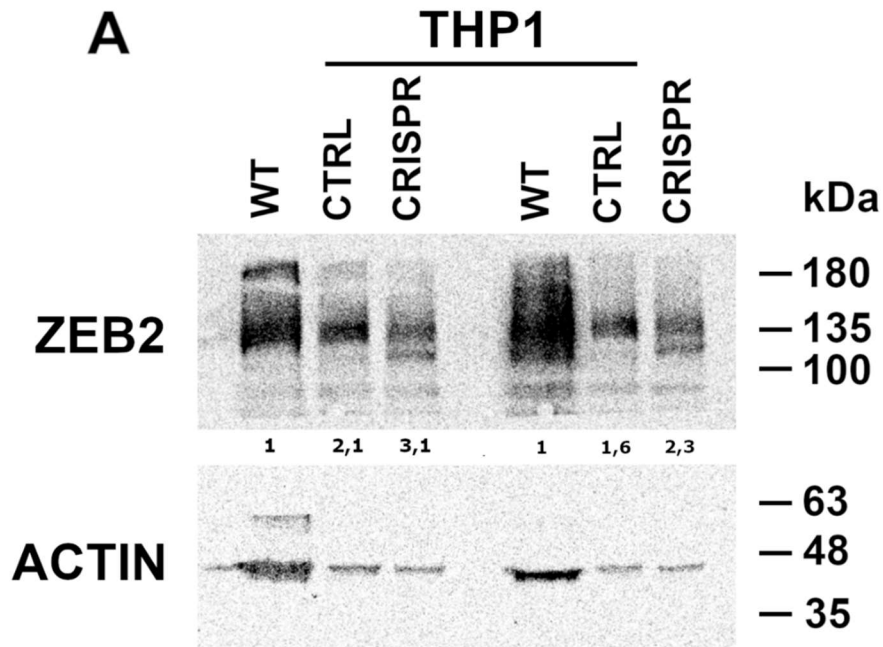


Figura 8. Análisis de la expresión de ZEB2 en células THP1 mediante Western blot. Se analizaron lisados de células THP1 en dos experimentos independientes. Los carriles corresponden a: WT (células no modificadas), CTRL (células transfectadas con un control CRISPR) y CRISPR ZEB2 (células transfectadas con el CRISPR dirigido a ZEB2). Se utilizaron anticuerpos para detectar la proteína ZEB2 (banda superior, 135 kDa) y Actina (banda inferior, 42 kDa) como control de carga. Debajo de las bandas de ZEB2 se muestran los valores de expresión normalizados a la intensidad de la banda de Actina.

Producción e Infección Viral con Constructos de ZEB2, ID2 y EGFP

Generación de partículas lentivirales para la sobreexpresión de ZEB2 e ID2 y evaluación de la eficiencia de transducción en células THP-1.

Con el objetivo de generar un modelo de sobreexpresión de ZEB2 e ID2 en células THP-1 (Figura 9), se procedió a la producción de partículas lentivirales mediante la co-transfección de células HEK293T con los plásmidos de interés (ZEB2-mCherry, ID2-mCherry o el control EGFP), junto con los plásmidos de empaquetamiento (PSPAX2) y la envoltura viral (PMD2G).

La evaluación de la eficiencia de transfección en las células HEK293T, realizada mediante microscopía de fluorescencia usando un microscopio óptico, reveló una transfección exitosa para los constructos de ID2-mCherry y EGFP. Se observó una fluorescencia roja intensa en el citoplasma de las células transfectadas con ID2-mCherry y una fluorescencia verde igualmente notable en el citoplasma de las células transfectadas con el plásmido EGFP. En el caso del constructo ZEB2-mCherry, si bien se detectó fluorescencia roja en los núcleos de las células HEK293T, la intensidad de la señal fue menor en comparación con los otros dos constructos, lo que sugiere una menor eficiencia de expresión o posibles diferencias en la estabilidad de la proteína fusionada. Sin embargo de estos resultados se observa que en las células HEK293T la fluorescencia de ZEB2-mCherry aparece en el núcleo, mientras que ID2-mCherry aparece en el citoplasma.

Posteriormente, las partículas virales producidas se utilizaron para infectar células THP-1. La evaluación de la eficiencia de transducción en estas células se realizó mediante microscopía de fluorescencia usando un microscopio óptico 48 horas post-infección. De manera inesperada, la eficiencia de infección en las células THP-1 resultó ser muy baja para los tres constructos virales. En múltiples campos microscópicos analizados, se observó un número muy limitado de células fluorescentes. Para el constructo ID2-mCherry, se detectaron aproximadamente 7 células positivas por campo (mostrando fluorescencia roja en el citoplasma). Una eficiencia similar se observó para el constructo control EGFP, con alrededor de 2 células positivas por campo (mostrando fluorescencia verde en el citoplasma). La eficiencia de infección fue aún menor para el constructo ZEB2-mCherry, donde se identificó aproximadamente 2 células positivas por campo (mostrando fluorescencia roja en el núcleo). Estos resultados indican que, a pesar de una transfección aparentemente exitosa en las células productoras HEK293T (especialmente para ID2-mCherry y EGFP), la infección de las células THP-1 con las partículas virales generadas fue altamente ineficiente para los tres constructos evaluados. Esta baja eficiencia de transducción impidió la obtención de un modelo celular robusto para la sobreexpresión de ZEB2 e ID2 en células THP-1 utilizando el protocolo de producción e infección viral empleado.

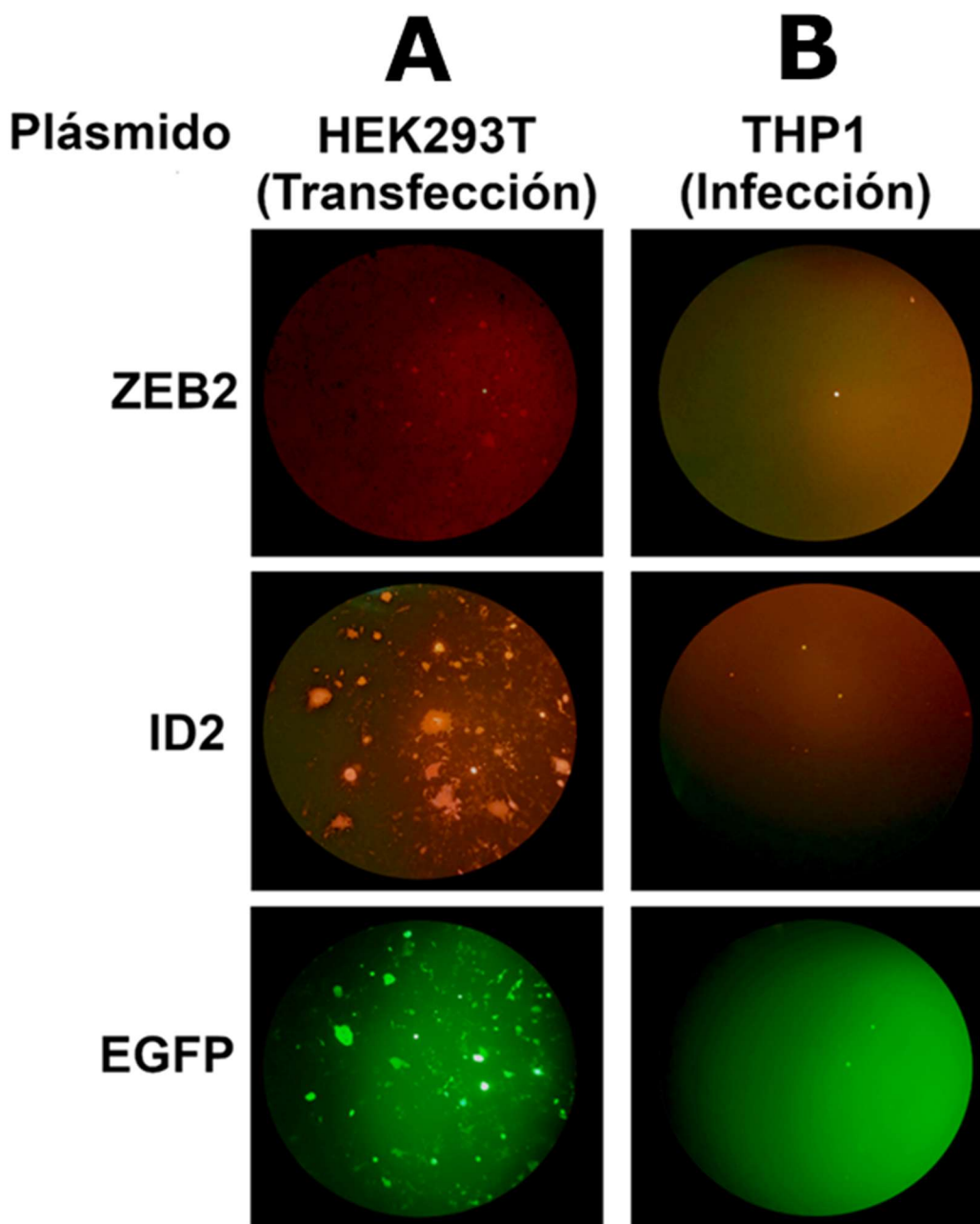


Figura 9. Transfección de células HEK293T para la producción de partículas lentivirales e infección de células THP1 con constructos de ZEB2-mCherry, ID2-mCherry y EGFP. (A) Imágenes representativas de células HEK293T transfectadas para la producción de partículas virales. Las células HEK293T fueron co-transfectadas mediante electroporación (1600 V, pulsos de 10 ms, 3 repeticiones) con los plásmidos de interés (ZEB2-mCherry, ID2-mCherry) o el plásmido control EGFP, junto con los plásmidos de empaquetamiento PSPAX2 y la envoltura viral PMD2G. La fluorescencia de EGFP (verde) se utilizó como indicador de la eficiencia de transfección. Las imágenes fueron adquiridas a las 48 horas post-transfección. (B) Imágenes representativas de células THP1 infectadas con las partículas virales. Las partículas virales se recolectaron del medio de cultivo de las células HEK293T a las 24, 48 y 72 horas post-transfección. Las células THP1 fueron infectadas con estas partículas virales en presencia de polibreno (añadido al medio de infección). Las imágenes fueron adquiridas 48 horas post-infección y muestran la fluorescencia roja (mCherry) indicativa de la expresión de ZEB2 o ID2, y la fluorescencia verde (EGFP) indicativa de la infección con el virus control. Todas las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio óptico con un objetivo de 40x y capturadas mediante la cámara de un dispositivo móvil.

Resultados del Ensayo de Viabilidad Celular mediante Incucyte

El ensayo de viabilidad celular en tiempo real utilizando el sistema Incucyte permitió evaluar la cinética de la muerte celular inducida por diferentes concentraciones de Teniposide, HK (HK), Cd3254 y Nilotinib durante un periodo de 48 horas. La tinción con Sytox Green se empleó para marcar las células con la membrana permeable, indicativas de muerte celular.

En la Figura 10 panel C, se observan las curvas de muerte celular para Teniposide a concentraciones de 0.15625 μM , 0.3125 μM , 0.625 μM , 1.25 μM , 2.5 μM , 5 μM y 10 μM , comparadas con el control de DMSO al 1%. Los resultados muestran un incremento en el porcentaje de células muertas dependiente de la concentración de Teniposide y del tiempo de exposición. A las concentraciones más altas (2.5 μM , 5 μM y 10 μM), se alcanza un porcentaje de muerte celular significativamente mayor en comparación con el control de DMSO a las 48 horas.

La Figura 10 panel D presenta los resultados para HK a las mismas concentraciones. Se observa también una respuesta dependiente de la dosis y el tiempo, aunque la magnitud del efecto difiere en menor medida comparación con Teniposide. Las concentraciones más elevadas de HK muestran una mayor inducción de la muerte celular con el tiempo que no supera el 20% a las 48 horas.

La Figura 10 panel A muestra las curvas de muerte celular para Cd3254 a las mismas concentraciones. Al igual que los otros compuestos, no se observa un aumento en la muerte celular con el incremento de la concentración y el tiempo de incubación.

Finalmente, la Figura 10 panel B presenta los resultados para Nilotinib a las mismas concentraciones. Los datos indican que **Nilotinib** no induce la muerte celular de forma dependiente de la dosis y el tiempo sin superar el 15% de muerte celular.

En todas las figuras, el control con DMSO al 1% muestra un porcentaje basal de muerte celular que se mantiene relativamente bajo durante el periodo de observación, lo que indica que el solvente utilizado no tiene un efecto citotóxico significativo en las condiciones experimentales.

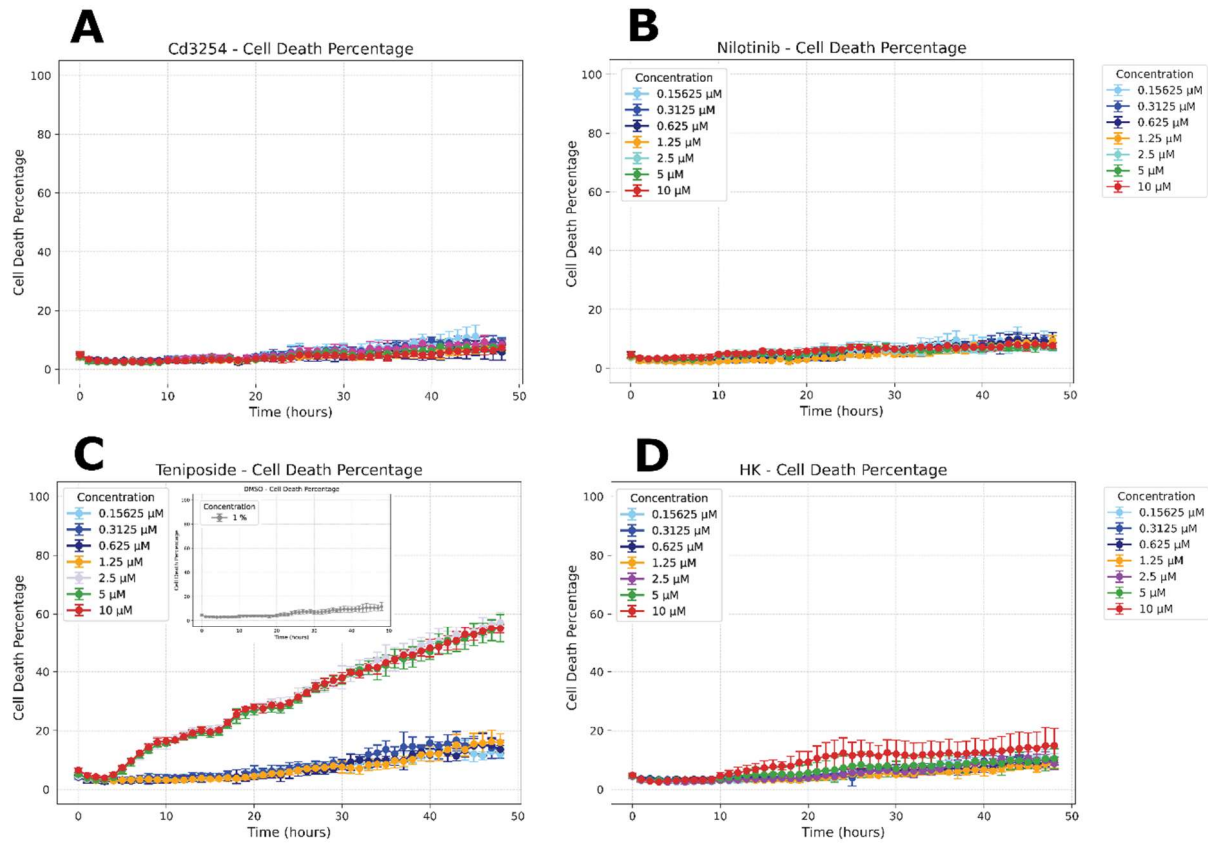


Figura 10. Cinética de la muerte celular inducida por Cd3254, Nilotinib, Teniposide y HK en el ensayo Incucyte. Se representa el porcentaje de células con membrana permeable (Sytox Green positivas) a lo largo del tiempo (hasta 48 horas) para diferentes concentraciones de A) Cd3254 B) Nilotinib C) Teniposide y D) HK, comparado con el control de DMSO al 1%. Cada curva representa la media de tres réplicas técnicas.

Validación de IC₅₀

Para validar los resultados iniciales y obtener una estimación más precisa de los valores de IC₅₀, se realizó un experimento adicional utilizando concentraciones seriadas decrecientes de Teniposide, HK, Cd3254 y Nilotinib (100–0.5 μ M). La permeabilidad de la membrana celular, indicativa de muerte celular, se monitorizó durante 48 horas utilizando Sytox Green.

La Figura 11 muestra los resultados obtenidos para Cd3254 (Panel A) y Nilotinib (Panel B). En ambos casos, no se observa una respuesta dependiente de la concentración, ya que las dosis más elevadas presentan niveles de permeabilidad de membrana similares a los observados con las dosis más bajas. Además, estos valores se mantienen estables a lo largo del tiempo, sin diferencias apreciables respecto al inicio del experimento.

También se presentan en la Figura 11 los resultados de este experimento para Teniposide (Panel C) y HK (Panel D). Se observa una clara relación dosis-respuesta a lo largo del tiempo para ambos compuestos. A concentraciones más altas, el porcentaje de células con la membrana permeable aumenta significativamente más rápido y alcanza un valor máximo superior en comparación con las concentraciones más bajas. Las curvas muestran intervalos de confianza, lo que permite visualizar la variabilidad entre las réplicas técnicas.

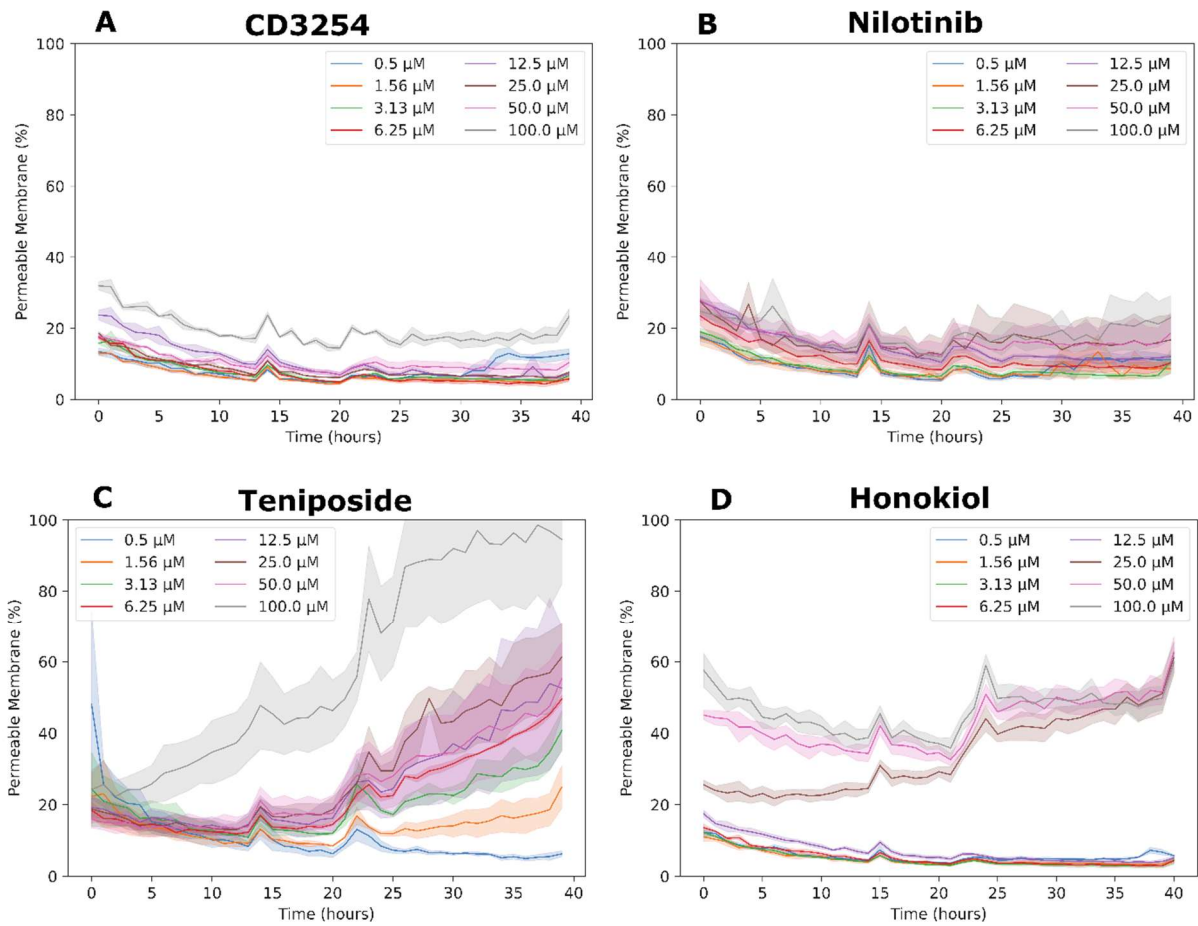


Figura 11. Validación de la permeabilidad de la membrana celular mediante Incucyte utilizando concentraciones seriadas decrecientes de A) Cd3254 y B) Nilotinib C) Teniposide D) HK. Se muestra el porcentaje de células con membrana permeable (Sytox Green positivas) en función del tiempo (hasta 40 horas) para las concentraciones indicadas. Las líneas representan la media y el área sombreada el intervalo de confianza.

Curvas Dosis-Respuesta, IC₅₀ y Sinergia

Para determinar la potencia de los compuestos y evaluar posibles interacciones sinérgicas, se realizaron análisis adicionales a partir de los datos obtenidos mediante el sistema Incucyte. Dado que únicamente Teniposide y HK indujeron una respuesta efectiva en términos de permeabilización de la membrana celular, se procedió a generar curvas dosis-respuesta exclusivamente para estos dos compuestos. En contraste, Cd3254 y Nilotinib no permitieron calcular una curva dosis-respuesta, debido a la ausencia de un efecto citotóxico significativo medido por pérdida de integridad de membrana en las condiciones experimentales utilizadas.

La Figura 12 presenta las curvas dosis-respuesta a las 48 horas para Teniposide (panel superior) y HK (panel inferior). El eje x representa la concentración de los compuestos en escala logarítmica, mientras que el eje y muestra el porcentaje de células con membrana permeable. A partir de estos datos, se calcularon los valores de IC₅₀, que representan la concentración del fármaco necesaria para inhibir el 50% de la viabilidad celular. El valor de IC₅₀ para Teniposide fue de aproximadamente 7.20 μM , mientras que para HK fue de alrededor de 22.51 μM .

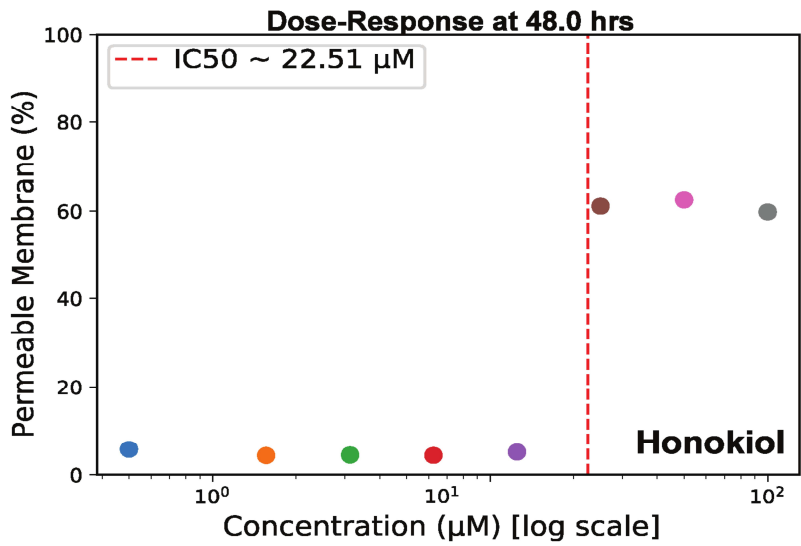
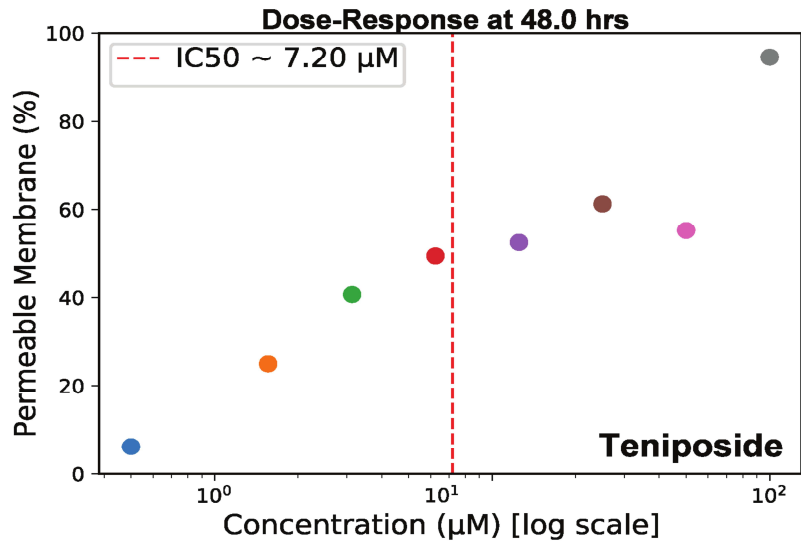


Figura 12. Curvas dosis-respuesta a las 48 horas obtenidas mediante el ensayo Incucyte para A) Teniposide y B) **HK**. El eje x representa la concentración del fármaco (escala logarítmica) y el eje y el porcentaje de células con membrana permeable. Se indican los valores de IC₅₀ calculados.

La

Figura 13 muestra el análisis de sinergia de Nilotinib, HK y Cd3254 en combinación con una concentración fija de Teniposide ($10 \mu\text{M}$) en células THP-1. El panel superior de cada subfigura representa la fracción de muerte celular (Fraction Kill, FK) medida a las 47 horas para distintas concentraciones del compuesto correspondiente, evaluadas en combinación con Teniposide. El panel inferior de cada subfigura muestra el valor de sinergia, calculado como la diferencia entre la fracción de muerte celular inducida por Teniposide sola y la inducida por la combinación: $\text{FK}(\text{Teni}) - \text{FK}(\text{Combo})$ graficado como una *Gaussian Kernel Density Estimate*. En este análisis, valores más negativos reflejan una mayor sinergia entre los compuestos, mientras que valores cercanos a cero o positivos indican un efecto aditivo o antagonista, respectivamente. Adicionalmente un área bajo la curva más grande indicará más sinergia.

Para Nilotinib (

Figura 13 Panel A), la fracción de muerte celular aumenta progresivamente desde 0.3 hasta un valor cercano a 0.6 con el incremento de concentración, alcanzando su efecto máximo a $100 \mu\text{M}$. El histograma de sinergia presenta un valor mínimo cercano a -0.3, con la mayoría de los valores distribuidos en torno a -0.1, lo que indica una sinergia consistente desde $0.5 \mu\text{M}$ en algunas condiciones.

En el caso de HK (

Figura 13 Panel B), se observa un perfil similar, con una fracción de muerte celular que va desde 0.1 hasta aproximadamente 0.5 a la concentración más alta (100 μM). El valor de sinergia mínimo registrado es desde 25 μM presentando un AUC menor a Nilotib.

Para Cd3254 (

Figura 13 Panel C), la fracción de muerte celular también aumenta con la concentración, alcanzando un valor máximo de aproximadamente 0.4. El análisis de sinergia arroja una sinergia mínima registrado desde 25 μM presentando un AUC menor que el AUC registrada por Nilotinb.

En conjunto, estos resultados indican que todos los compuestos evaluados presentan cierto grado de sinergia con Teniposide, siendo Nilotinib el que exhibe el efecto sinérgico más pronunciado.

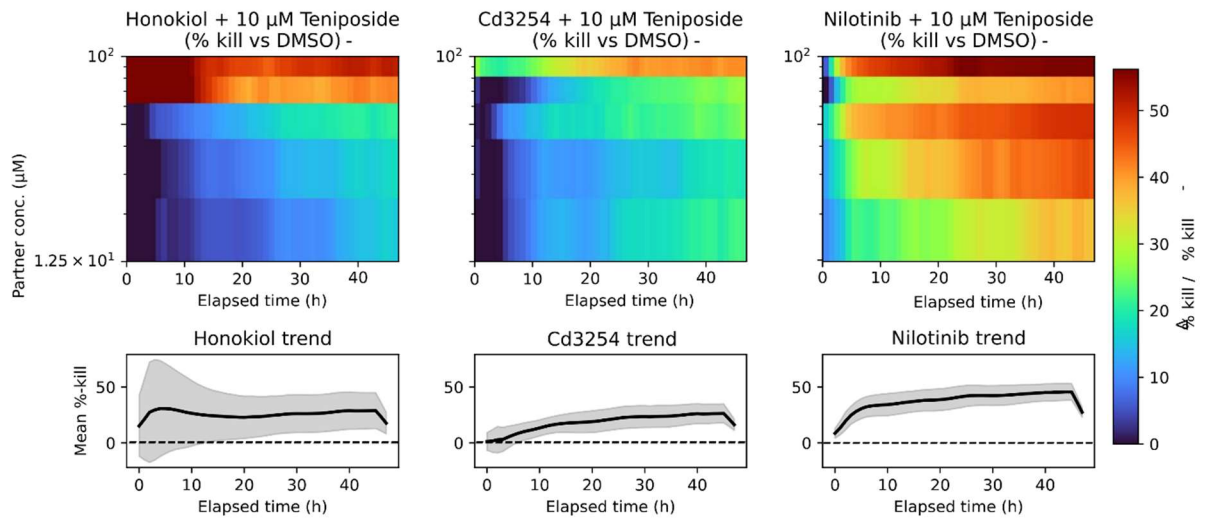


Figura 13. Análisis de sinergia a las 48 horas de Nilotinib (A), HK (B) y Cd3254 (C) en combinación con Teniposide (10 μM). El panel superior muestra la fracción de muerte celular (FK) para diferentes concentraciones del compuesto en combinación con Teniposide. El panel inferior representa la sinergia (FK de Teniposide - FK de la combinación) en función de la concentración del segundo compuesto.

Efecto de Teniposide, Nilotinib y su combinación en la expresión de ZEB1, ZEB2 e ID2 en células THP-1

Debido a la sinergia observada entre Nilotinib y Teniposide, se realizaron experimentos posteriores con esta combinación. Para evaluar el impacto de los tratamientos con Teniposide, Nilotinib y su combinación (Dual Treat) sobre la expresión génica de ZEB1, ZEB2 e ID2 en células de leucemia mieloide aguda THP-1, se realizó un análisis de RT-qPCR. Los resultados, presentados en la Figura 14, muestran la expresión relativa de cada gen, normalizada primeramente a la Polimerasa II y luego al grupo control no tratado.

En cuanto al gen ZEB1, se observó una disminución altamente significativa ($p < 0.0001$) en la expresión tras el tratamiento con Teniposide (aproximadamente 0.2 veces el control) y Dual Treat (aproximadamente 0.3 veces el control). En contraste, el tratamiento con Nilotinib no mostró un cambio significativo (ns) en la expresión de ZEB1 en comparación con el grupo control.

De manera similar, la expresión del gen ZEB2 se vio significativamente disminuida ($p < 0.001$) con los tratamientos de Teniposide (0.3 veces el control) y Dual Treat (0.3 veces el control). Al igual que con ZEB1, el tratamiento con Nilotinib no resultó en un cambio significativo (ns) en la expresión de ZEB2 en comparación con el grupo control. En contraste con ZEB1 y ZEB2, la expresión del gen ID2 no mostró cambios significativos (ns) en ninguno de los tratamientos evaluados (Teniposide, Nilotinib y Dual Treat) en comparación con el grupo control.

En resumen, los resultados de RT-qPCR indican que Teniposide y la combinación Dual Treat reducen significativamente la expresión de los genes ZEB1 y ZEB2 en células THP-1. Es notable que la combinación de Teniposide y Nilotinib mantiene el efecto inhibitorio de Teniposide sobre ZEB1 y ZEB2. Por otro lado, ninguno de los tratamientos afectó significativamente la expresión del gen ID2 en estas células.

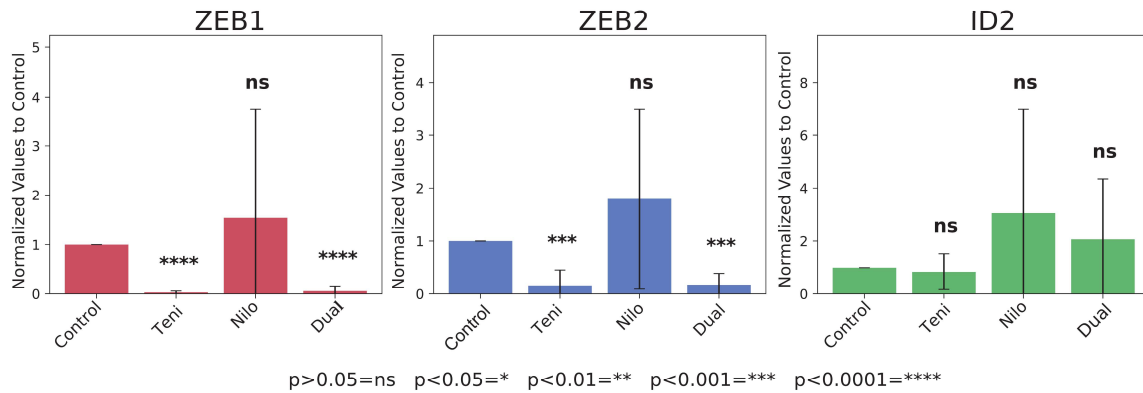


Figura 14. **Expresión relativa de ZEB1, ZEB2 e ID2 en células THP-1 tras tratamiento con Teniposide, Nilotinib y su combinación.** Células THP-1 fueron tratadas con Teniposide (10 μ M), Nilotinib (50 μ M), la combinación de ambos (Dual Treat), o DMSO (Control) durante 48h. La expresión de los genes ZEB1, ZEB2 e ID2 fue determinada por RT-qPCR y normalizada al grupo control no tratado. Los valores representan la media de 3 experimentos. Las barras de error representan el error estándar. La significancia estadística fue determinada mediante Mann-Whitney. ns = no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Análisis de la expresión de proteína ZEB2 en células THP-1 mediante Western Blot tras tratamiento con Teniposide, Nilotinib y su combinación

Para investigar el efecto de los tratamientos con Teniposide, Nilotinib y su combinación (Dual Treat) a nivel de proteína, se realizó un análisis de Western blot para evaluar la expresión de ZEB2 en células THP-1. Los resultados se presentan en la Figura 15.

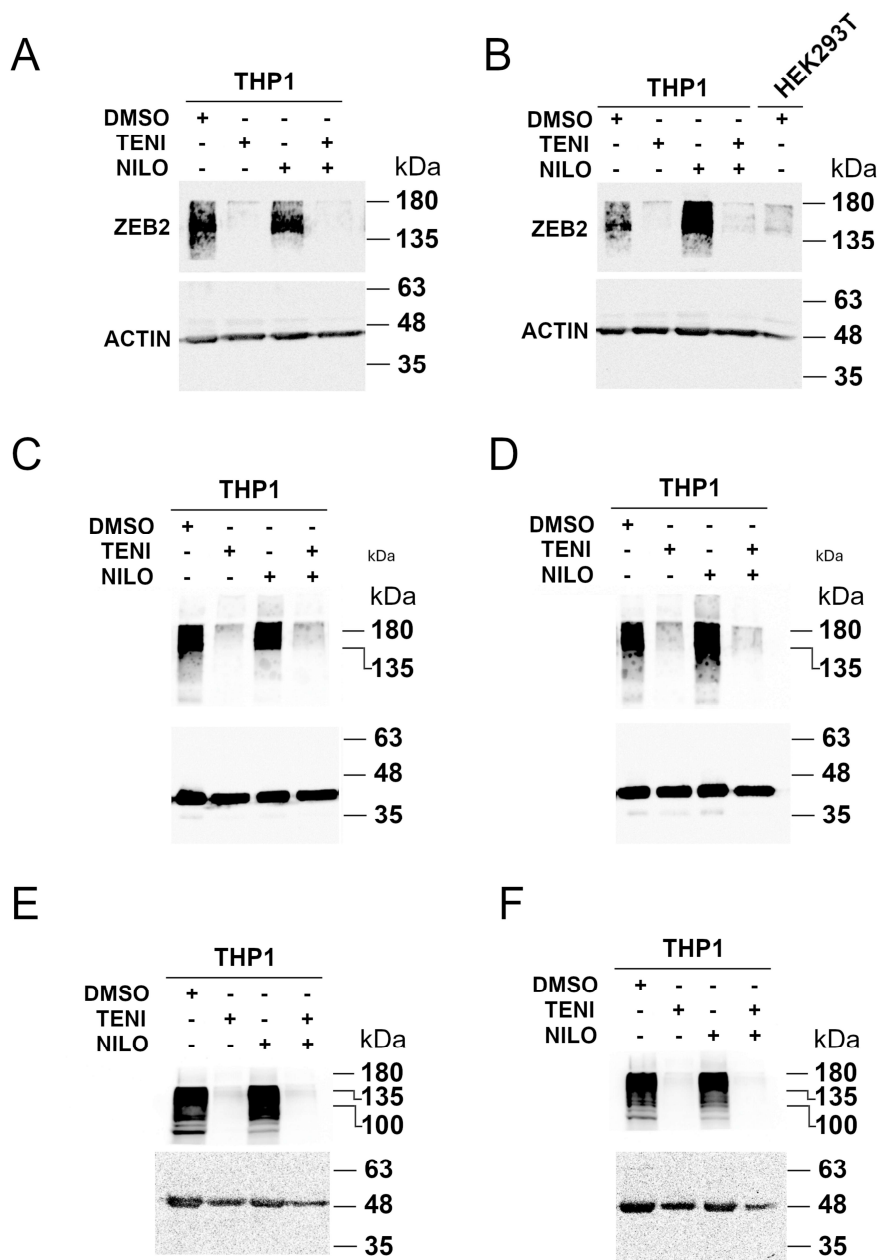


Figura 15. Expresión de proteína ZEB2 en células THP-1 tras tratamiento con Teniposide, Nilotinib y su combinación, evaluada por Western blot. Células THP-1 fueron tratadas con DMSO (vehículo control), Teniposide (10 μ M), Nilotinib (50 μ M) o la combinación de Teniposide y Nilotinib (Teni+Nilo) durante 48h. Se muestran seis paneles en la imagen con la expresión de la proteína ZEB2 para 6 muestras independientes. La proteína ACTINA (ACTIN) se utilizó como control de carga. Los pesos moleculares (kDa) se indican a la derecha. El primer panel presenta la expresión de ZEB2 de la línea celular HEK293T como control negativo.

El análisis visual de las bandas de Western blot (Figura 16, Panel A) sugirió una modulación en la expresión de ZEB2 en respuesta a los tratamientos. Específicamente, se observó una reducción marcada en la intensidad de la banda de ZEB2 en células tratadas con Teniposide y la combinación de Teniposide con Nilotinib, mientras que el tratamiento con Nilotinib pareció inducir un ligero aumento, aunque menos pronunciado, en comparación con el grupo control tratado con DMSO.

Para cuantificar estos cambios, se realizó un análisis densitométrico de las bandas de ZEB2, normalizando los valores a la señal de la proteína de carga ACTINA (Figura 16, Panel B). Este análisis confirmó una disminución significativa (0.1 veces el control) en la expresión de proteína ZEB2 tras el tratamiento con Teniposide **. De manera similar, el tratamiento con la combinación de Teniposide y Nilotinib también resultó en una disminución significativa (0.1 veces el control) en la expresión de ZEB2 **. En contraste, aunque visualmente se sugirió un ligero aumento en la banda de Nilotinib, el análisis densitométrico reveló que el tratamiento solo con Nilotinib no indujo un cambio significativo (ns) en la expresión de proteína ZEB2 en comparación con el control.

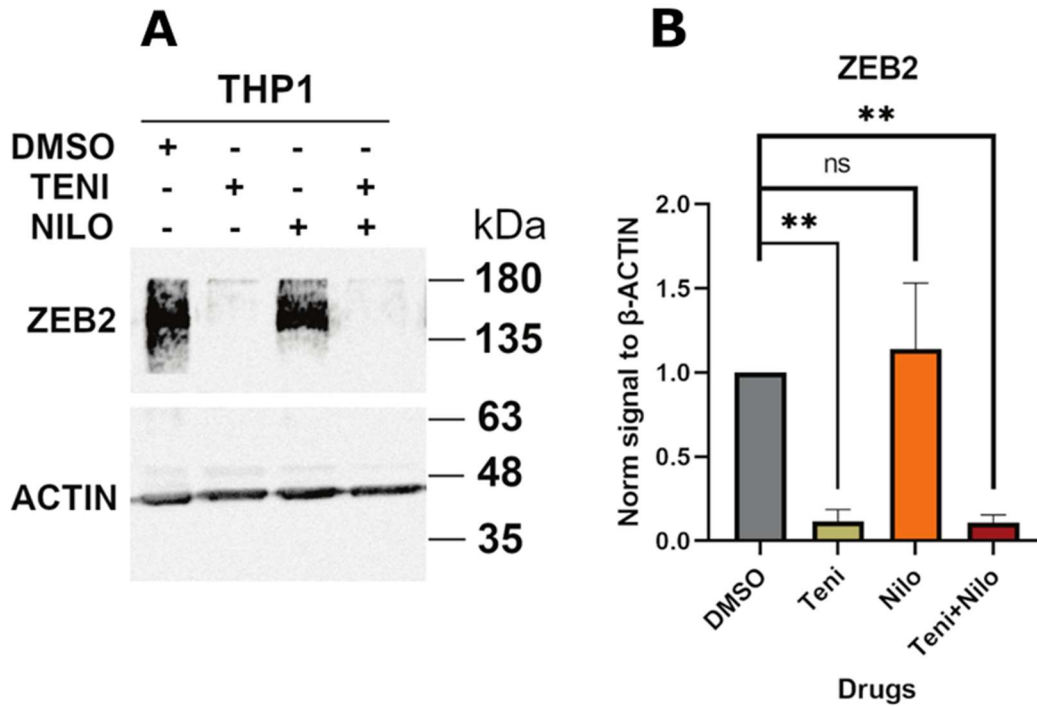


Figura 16. Expresión de proteína ZEB2 en células THP-1 tras tratamiento con Teniposide, Nilotinib y su combinación, evaluada por Western blot. Células THP-1 fueron tratadas con DMSO (vehículo control), Teniposide (10 μ M), Nilotinib (50 μ M) o la combinación de Teniposide y Nilotinib (Teni+Nilo) durante 48h. (A) Imagen representativa del Western blot mostrando la expresión de la proteína ZEB2. La proteína ACTINA (ACTIN) se utilizó como control de carga. Los pesos moleculares (kDa) se indican a la derecha. (B) Gráfico de barras que representa la cuantificación densitométrica de la señal de ZEB2, normalizada a la señal de ACTINA para cada tratamiento. Los valores están representados como la media de 3 experimentos. Las barras de error representan el error estándar. La significancia estadística fue determinada mediante ANOVA. ns = no significativo, ** $p < 0.01$.

Para la visualización del tiempo de disminución de la expresión de ZEB2, se realizó un Western blot por horas (Figura 17). Se analizó la cuantificación de las bandas de ZEB2 normalizada contra la ACTINA (ACTIN) mediante densitometría. Se observó la disminución de la expresión de ZEB2 bajo tratamiento con Teniposide (Figura 17 Panel A) a las 8h (0.5 veces el control) y una disminución marcada a las 24h (0.22 veces el control). En cambio, el tratamiento con Nilotinib (Figura 17 Panel B) aumenta la expresión de ZEB2 a las 24h (1.66 veces el control).

En conjunto, los resultados del Western blot demuestran que Teniposide y la combinación de Teniposide y Nilotinib disminuyen significativamente la expresión de proteína ZEB2 en células THP-1. Si bien la inspección visual del blot sugería un posible aumento con Nilotinib, la cuantificación densitométrica y el análisis estadístico indicaron que este cambio no es significativo. **Es notable que la combinación de Teniposide y Nilotinib reproduce el mismo efecto inhibitorio de Teniposide solo en la represión de ZEB2 a nivel proteico y de ARN.**

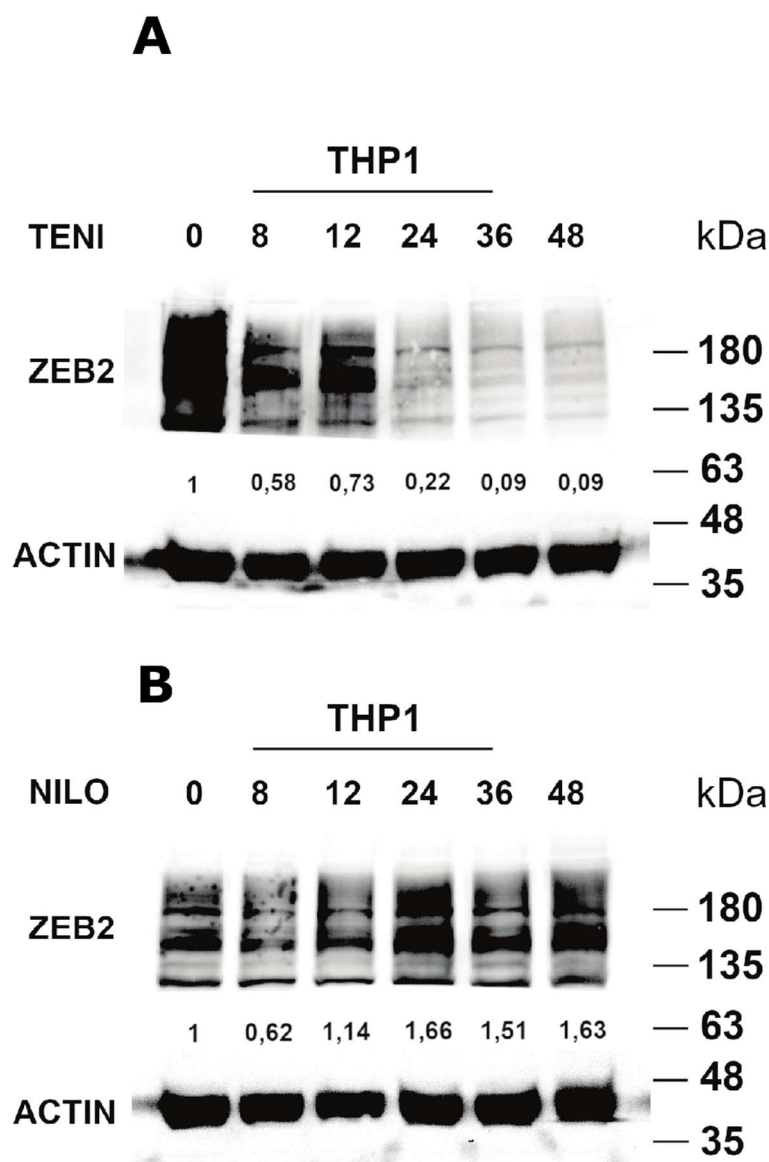


Figura 17. Expresión de proteína ZEB2 en células THP-1 tras tratamiento con Teniposide, Nilotinib y su combinación, evaluada por Western blot. Células THP-1 fueron tratadas con DMSO (vehículo control), Teniposide (10 μ M), Nilotinib (50 μ M) o la combinación de Teniposide y Nilotinib (Teni+Nilo) durante a las 8h, 12h, 24h, 36h y 48h. **(A)** Imagen de bajo el tratamiento con Teniposide. **(B)** Imagen bajo tratamiento con Nilotinib. Imágenes representativas del Western blot mostrando la expresión de la proteína ZEB2. La proteína ACTINA (ACTIN) se utilizó como control de carga. Los pesos moleculares (kDa) se indican a la derecha. Se representa la cuantificación densitométrica de la señal de ZEB2, normalizada a la señal de ACTINA para cada tratamiento en parte inferior a las bandas de ZEB2. Los valores están representados 1 experimento.

Para evaluar la eficacia de los compuestos en cultivos celulares primarios, se replicó el estudio en células de médula ósea adulta de ratón utilizando dos muestras biológicamente independientes (Figura 18). El análisis por Western blot reveló que la expresión de ZEB2 no presentó una disminución significativa tras el tratamiento con Teniposide (10 μM) en comparación con el control. En contraste, la administración de Nilotinib (50 μM), así como la combinación de ambos compuestos, indujo una reducción marcada en los niveles de expresión de ZEB2, evidenciando un efecto sinérgico en la regulación de este marcador. Cabe notar que el efecto de represión de Zeb2 por parte de Nilotinib no se observa en las células THP-1.

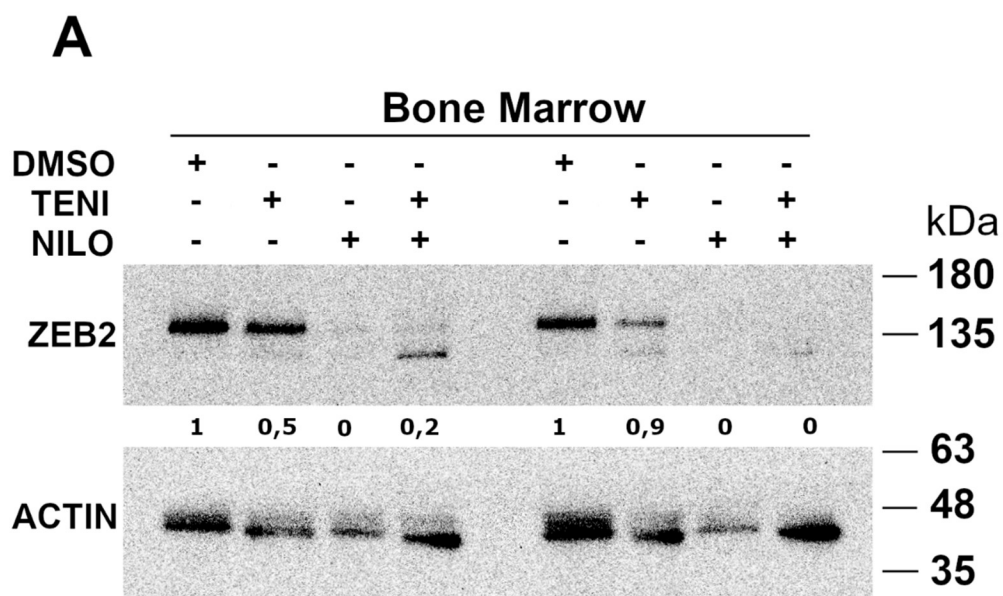


Figura 18. *Expresión de proteína ZEB2 en células de médula ósea adulta de ratón tratamiento con Teniposide, Nilotinib y su combinación, evaluada por Western blot.* Células de médula ósea adulta de ratón fueron tratadas con DMSO (vehículo control), Teniposide (10 μ M), Nilotinib (50 μ M) o la combinación de Teniposide y Nilotinib (Teni+Nilo) durante 48h de dos muestras independientes. Imágen representativa del Western blot mostrando la expresión de la proteína ZEB2. La proteína ACTINA (ACTIN) se utilizó como control de carga. Los pesos moleculares (kDa) se indican a la derecha. Se representa la cuantificación densitométrica de la señal de ZEB2, normalizada a la señal de ACTINA para cada tratamiento en parte inferior a las bandas de ZEB2.

Evaluación del efecto de Teniposide, Nilotinib y su combinación sobre la viabilidad y diferenciación de células THP-1 mediante citometría de flujo: Predominio de la citotoxicidad y aumento significativo del marcador CD68 con la combinación de Teniposide y Nilotinib

Para caracterizar el impacto de Teniposide, Nilotinib y su combinación en células THP-1, se realizó un análisis de citometría de flujo, evaluando la viabilidad celular y la expresión de marcadores de diferenciación mielóide (CD68).

La Figura 19 muestra la proporción de células vivas y muertas, clasificadas además por expresión de CD68, bajo cuatro condiciones experimentales: control (C), Nilotinib (N), Teniposide (T) y tratamiento dual (Dual) en células THP-1. Los resultados se presentan como porcentaje de fracción celular sobre el total de eventos analizados.

En la Figura 19 Panel A, se muestra la comparación global entre células vivas y muertas para cada condición. Se observa una disminución significativa en la proporción de células vivas en la condición Dual respecto al control, con un valor de ANOVA $p = 1.06 \times 10^{-9}$ para las células vivas y $p = 1.06 \times 10^{-9}$ para las células muertas, indicando diferencias estadísticamente significativas en ambas poblaciones entre condiciones.

En la Figura 19 Panel B, se muestra la proporción de células vivas CD68⁺. Teniposide y el tratamiento Dual genera un aumento significativo de esta población, con una diferencia estadísticamente significativa entre condiciones (ANOVA $p = 0.017$), lo que sugiere un efecto de diferenciación fagocítica (Compromiso a macrófagos).

En la Figura 19 Panel C, se muestra la proporción de células vivas CD68⁻. En esta subpoblación, la reducción en células vivas bajo tratamiento Dual es aún más pronunciada, con un valor de ANOVA $p = 1.01 \times 10^{-10}$, indicando una fuerte sensibilidad de estas células al tratamiento combinado.

Por último, en la Figura 19 Panel D representa la proporción de células muertas CD68⁺. Esta población aumenta significativamente bajo el tratamiento Dual, con ANOVA $p = 7.78 \times 10^{-10}$. CD68 es un marcador que reside de forma intracelular estricta en células THP-1. Por consiguiente, cualquier pérdida de la integridad de la membrana permitirá que el anticuerpo anti-CD68 pueda marcar dichas células.

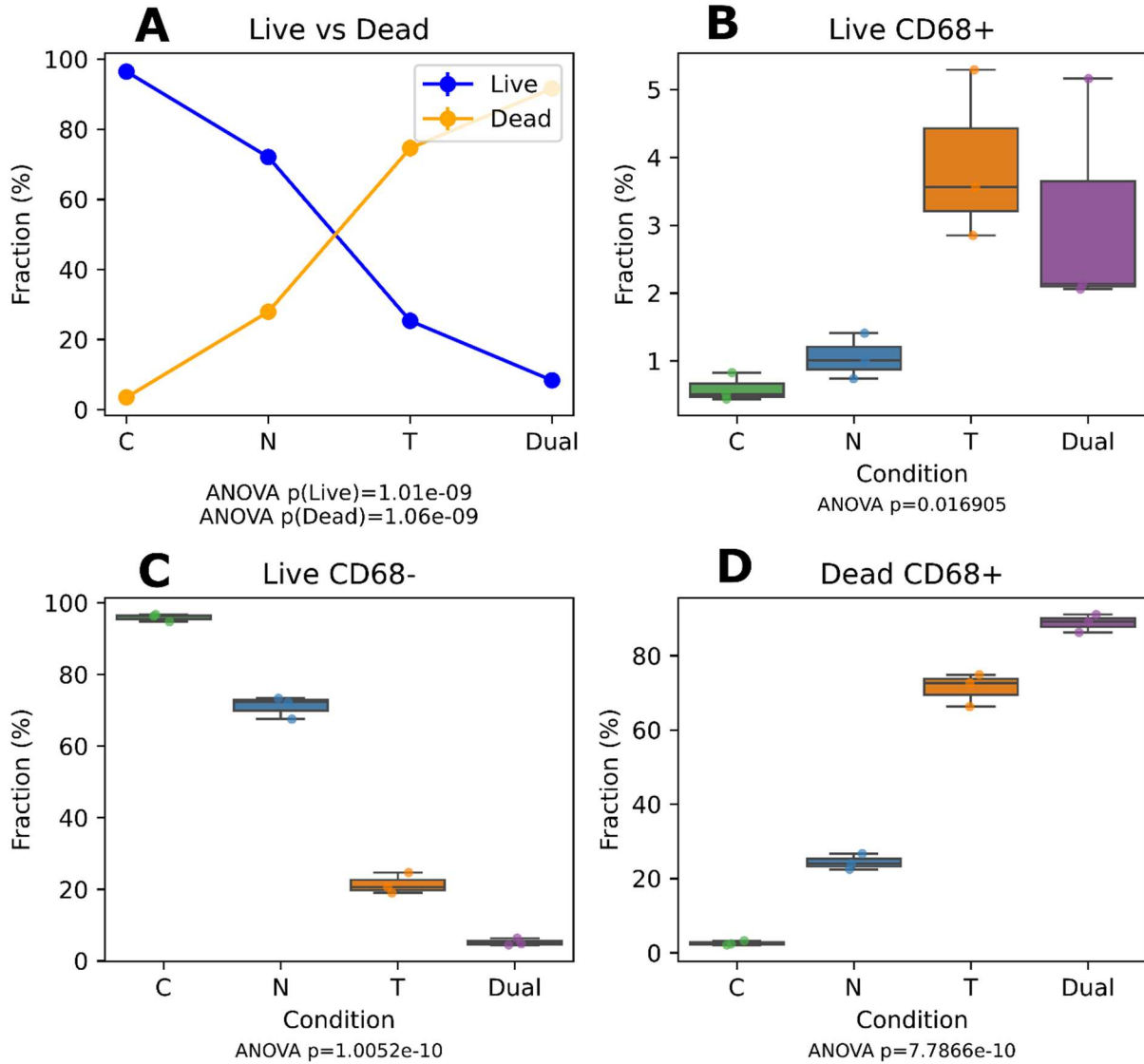


Figura 19. Porcentaje de células vivas y muertas, clasificadas según la expresión de CD68, en células THP-1 tratadas con Nilotinib (N)(50 μ M), Teniposide (T)(10 μ M), o la combinación de ambos (Dual), comparadas con control sin tratamiento (C). (A) muestra la proporción total de células vivas y muertas por condición. (B) representa la fracción de células vivas CD68⁺. (C) muestra las células vivas CD68⁻. (D) indica la fracción de células muertas CD68⁺. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante ANOVA de una vía.

Para una mejor visualización del patrón de diferenciación en células THP-1, se realizó un análisis de la expresión del marcador CD68 mediante citometría de flujo, discriminando además la viabilidad celular con Zombie APC-Cy7.

La Figura 20 muestra el análisis por citometría de flujo del efecto de tratamientos individuales y combinados con Teniposide y Nilotinib sobre la viabilidad y diferenciación de células THP-1. Se evaluaron cuatro poblaciones celulares basadas en la viabilidad (Zombie⁻) y expresión de CD68: células vivas CD68⁺, células muertas CD68⁺, células vivas CD68⁻ y células muertas CD68⁻.

En la condición control (Figura 20 panel A), se observa una población mayoritaria de células vivas CD68⁻ (94.7%), con una baja proporción de células muertas CD68⁺ (3.25%).

Tras el tratamiento con Teniposide (Figura 20 panel B), se evidencia una marcada citotoxicidad, con un incremento sustancial en la población de células muertas CD68⁺ (74.9%) y una reducción de las células vivas CD68⁻ a 19%.

El tratamiento con Nilotinib (Figura 20 panel C) también indujo un aumento en la fracción de células muertas CD68⁺ (26.7%) y una disminución de las células vivas CD68⁻ a 67.5%, aunque de forma menos intensa que Teniposide.

Finalmente, en la condición combinada (Figura 20 panel D), se observa el efecto más pronunciado: la población de células muertas CD68⁺ alcanza el 86.3%, mientras que las células vivas CD68⁻ se reducen a solo 6.37%, lo que sugiere un efecto sinérgico entre ambos fármacos. Además, se incrementa la proporción de células vivas CD68⁺ (de 0.83% en el control a 5.16% en el tratamiento dual), indicando una posible inducción de diferenciación hacia el fenotipo monocítico.

Estos resultados demuestran que la combinación de Teniposide y Nilotinib no solo potencia la muerte celular, sino que también favorece la diferenciación mieloide, evidenciada por el aumento de células CD68⁺ vivas y muertas.

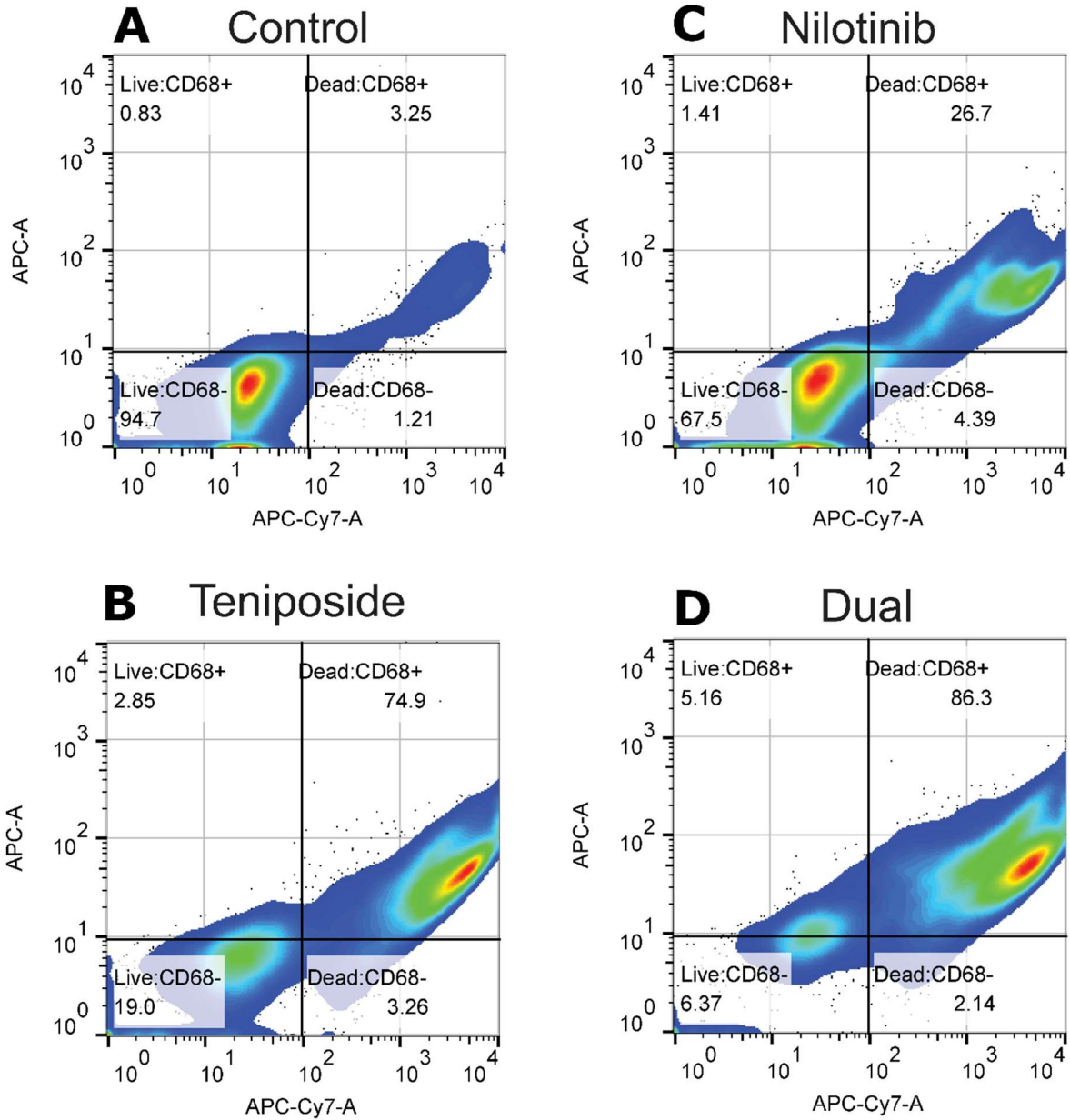


Figura 20. Análisis de citometría de flujo en células THP-1 tras tratamiento con Teniposide (10 μ M), Nilotinib (50 μ M) y su combinación durante 48 h. Se muestran los diagramas de dispersión representativos de cuatro condiciones: **A)** Control (DMSO), **B)** Teniposide, **C)** Nilotinib, y **D)** Tratamiento combinado. Las poblaciones se clasifican en función de la viabilidad celular (Zombie APC-Cy7) y expresión de CD68 (APC): células vivas CD68⁻ (inferior izquierdo), vivas CD68⁺ (superior izquierdo), muertas CD68⁻ (inferior derecho), y muertas CD68⁺ (superior derecho). Se observa un aumento progresivo en la muerte celular, especialmente en la subpoblación CD68⁺, siendo más pronunciado en la condición combinada, que alcanza un 86.3% de células muertas CD68⁺. Simultáneamente, la población viva CD68⁻ disminuye de 94.7% (control) a 6.37% (combinado), indicando un fuerte efecto citotóxico y potencial diferenciador del tratamiento dual.

Discusión

Los hallazgos de este estudio demuestran que la sobreexpresión de ZEB2 e ID2 en células de LMA podría modular la resistencia a quimioterapéuticos, aunque los resultados revelan complejidades en su interacción y efectos terapéuticos. A continuación, se analizan las implicaciones de estos hallazgos en el contexto de la literatura existente, las limitaciones del estudio y las proyecciones futuras.

Eficiencia del Knock-Out de ZEB2 mediante CRISPR/Cas9

La generación de modelos *knockout* para ZEB2 mediante la tecnología CRISPR/Cas9 mostró resultados limitados en términos de eficiencia funcional. Aunque la presencia de fluorescencia en microscopía sugiere una transfección exitosa del plásmido codificante para Cas9-RFP, el análisis por Western blot no evidenció una disminución significativa en los niveles de proteína ZEB2. Este hallazgo sugiere que la edición fue incompleta o ineficaz, probablemente debido a una baja eficiencia de los gRNAs o a la presencia de mecanismos de reparación celular, como la unión por extremos no homólogos (NHEJ), que podrían haber restablecido el marco de lectura (Doench et al., 2016). Otra posibilidad es que los eventos de edición no hayan afectado regiones funcionales críticas del gen.

A este obstáculo técnico se sumó una elevada mortalidad celular posterior a la electroporación, lo cual plantea la hipótesis de que ZEB2 es esencial para la viabilidad de las células THP-1, como se ha descrito previamente en modelos de hematopoyesis donde ZEB2 regula la autorrenovación y diferenciación celular (Vandewalle et al., 2005; Wang et al., 2020). Esta observación subraya la necesidad de considerar cuidadosamente los efectos colaterales al diseñar estrategias de pérdida de función en genes que podrían ser esenciales para la homeostasis celular.

Por otro lado, los intentos de generar modelos de sobrepresión de ZEB2 e ID2 mediante transducción lentiviral también fueron ineficaces. La baja eficiencia observada puede atribuirse a varios factores: (i) el uso de espínoculación en lugar de ultracentrifugación para concentrar las partículas virales, técnica que ha demostrado menor rendimiento (Segura et al., 2010); (ii) la baja eficiencia de transfección inicial en las células HEK-293T productoras, posiblemente influida por la sobreexpresión de ZEB2, que puede inducir cambios morfológicos tipo mesenquimal y pérdida de adherencia (Peinado et al., 2007; Thomas & Smart, 2005); y (iii) la limitada infectabilidad de células de origen mieloide como THP-1 mediante métodos lentivirales estándar.

Ante estas limitaciones técnicas, se plantea que métodos alternativos como vectores adenovirales modificados, aunque transientes, podrían ofrecer una ventana experimental suficiente para estudiar tanto pérdida como ganancia de función con mayor eficiencia. Dichos vectores han demostrado buenos niveles de expresión en células hematopoyéticas difíciles de transducir (Park et al., 2017).

Finalmente, la decisión de adoptar un enfoque farmacológico permitió sortear estos desafíos técnicos. El uso de compuestos como Teniposide y Nilotinib, capaces de modular la expresión de ZEB2, facilitó el análisis funcional indirecto de este factor. En particular, la combinación farmacológica mostró un efecto sinérgico sobre la muerte celular, evidenciando una restauración de la sensibilidad a agentes quimioterapéuticos y sugiriendo que ZEB2 actúa como un modulador clave de resistencia en LMA, incluso sin manipulación genética directa.

Inhibición de ZEB2: oportunidades terapéuticas y limitaciones farmacológicas

La identificación de compuestos capaces de inhibir específicamente la expresión o actividad funcional de ZEB2 continúa siendo un reto importante en biología traslacional. ZEB2, como factor de transcripción sin un dominio enzimático catalítico definido y con regiones estructuralmente desordenadas, escapa a los métodos clásicos de diseño racional de fármacos (Hanahan, 2022; Latchman, 1997). Por lo tanto, la mayoría de los inhibidores descritos hasta la fecha actúan de forma indirecta, modulando vías transcripcionales, epigenéticas o postraduccionales que afectan su expresión o estabilidad.

Uno de los compuestos más estudiados en este contexto es Cd3254, un agonista selectivo del receptor RXR α que actúa como ligando del receptor de ácido retinoico α (RAR α). Según estudios recientes, Cd3254 induce reprogramación celular mediante la activación del complejo exosoma de ARN, lo que conlleva la represión de múltiples factores de la EMT, entre ellos ZEB2, SNAI1 y TWIST1 (Jin et al., 2023). No obstante, este efecto se manifiesta tras tratamientos prolongados (>40 días), lo que sugiere una dependencia de procesos de remodelación

epigenética progresiva. Esta limitación temporal dificulta su evaluación en protocolos experimentales de corta duración, como los realizados en este estudio (<48 h), donde el efecto inhibitorio de Cd3254 sobre ZEB2 podría no haberse expresado completamente.

Otro compuesto de interés es HK, un derivado polifenólico aislado de especies del género *Magnolia*, que ha mostrado actividad antitumoral en diversos contextos, incluyendo cáncer de mama, renal y melanoma. Se ha reportado que HK reprime la expresión de ZEB2 mediante la vía miR-141/ZEB2, bloqueando así la EMT (W. Li et al., 2014). Sin embargo, su acción pleiotrópica sobre múltiples vías celulares, incluyendo NF- κ B, PI3K/Akt/mTOR y Wnt/ β -catenina, complica su empleo como inhibidor selectivo de ZEB2, y limita su utilidad en estudios mecanísticos centrados en esta diana molecular.

Más recientemente, Teniposide, un inhibidor de la topoisomerasa II β , ha sido identificado como un modulador indirecto de la expresión de ZEB2. Su acción primaria consiste en estabilizar complejos de rotura de doble hebra en el ADN, generando tensión replicativa y muerte celular. Sin embargo, evidencia emergente indica que Teniposide también puede suprimir ZEB2 a través del eje IRF7–NMI, una vía de regulación transcripcional específica de monocitos (Metge et al., 2024). Esta doble funcionalidad, que combina actividad citotóxica y modulación génica, lo posiciona como un compuesto de alto potencial terapéutico. En modelos de cáncer de mama, se ha demostrado que Teniposide a dosis bajas reduce significativamente la expresión de ZEB2 y disminuye la capacidad de colonización pulmonar de las células tumorales (Metge et al., 2024). Sin embargo, su uso en el tratamiento de LMA ha sido asociado con recaídas, lo que justifica explorar esquemas de combinación farmacológica que potencien su eficacia y minimicen efectos secundarios (Burnett et al., 2013).

En conjunto, estos resultados respaldan el potencial de Teniposide, HK y Cd3254 como moduladores de la red transcripcional EMT en el contexto de la LMA. Aunque ninguno de estos compuestos fue diseñado originalmente para inhibir ZEB2, sus efectos funcionales sobre esta diana sugieren un valor terapéutico emergente, particularmente cuando se emplean en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Futuros esfuerzos podrían centrarse en el cribado de bibliotecas químicas con modelos celulares sensibles a ZEB2, así como en el uso de fármacos epigenéticos que faciliten la inhibición indirecta de este factor de transcripción considerado "no drogable".

Análisis bioinformático: Nilotinib como candidato reposicionado para LMA mediante aprendizaje automático

La aplicación de modelos de *machine learning* al estudio de la LMA ha permitido identificar nuevos candidatos terapéuticos a partir de datos multiómicos. En este trabajo, se empleó un enfoque basado en un Random Forest Regressor utilizando como fuente la base de datos DepMap, la cual integra información sobre sensibilidad farmacológica (PRISM), expresión génica, metilación, proteómica, metabolómica y dependencia génica por CRISPR. Para evitar sesgos en la predicción, el modelo fue entrenado únicamente con líneas celulares en las que más del 50% correspondían a LMA, minimizando así la sobreestimación de compuestos activos en otras estirpes celulares como leucemias linfoides o linfomas.

El modelo identificó múltiples compuestos con potencial antitumoral, desde metabolitos esenciales hasta fármacos aprobados. Dentro del grupo más predictivo emergieron varios inhibidores de tirosina quinasas, destacando Nilotinib, un inhibidor de segunda generación dirigido contra BCR-ABL, aprobado actualmente para el tratamiento de LMC. A pesar de que los coeficientes de correlación por variable individual fueron bajos ($r < 0.03$), Nilotinib se posicionó de forma consistente entre los 10-11 primeros lugares predictivos en 30 iteraciones del modelo, lo que otorga robustez estadística a su potencial terapéutico en LMA.

Un análisis cruzado utilizando la base de datos Vizome (<http://vizome.org/aml/inhibitor/>), que evalúa la sensibilidad de compuestos frente a perfiles genómicos de LMA, mostró que los inhibidores dirigidos a FLT3-ITD son los más relevantes clínicamente, mientras que Nilotinib aparece con menor sensibilidad promedio. Esta diferencia puede explicarse por el mecanismo de acción primario de Nilotinib, centrado en BCR-ABL, aunque diversos estudios indican que también puede actuar sobre otras dianas como c-Kit, PDGFR, e incluso TGF- β , vías relevantes en la regulación de células madre hematopoyéticas (Lachowiec et al., 2023; J. Li et al., 2017).

Evidencia clínica adicional apoya su reposicionamiento: un ensayo clínico de fase II (NCT01806571) evaluó la combinación de Nilotinib con daunorrubicina y citarabina en pacientes con LMA recién diagnosticada, logrando una tasa de remisión completa del 61.8%, comparable a las tasas observadas con regímenes estándar en este contexto

(Burnett et al., 2013). A pesar de que dicho estudio no abordó explícitamente la inhibición de ZEB2, sus resultados refuerzan la viabilidad clínica del compuesto. En el contexto de esta tesis, la combinación de Nilotinib con Teniposide, un agente que sí regula negativamente a ZEB2, sugiere una estrategia sinérgica que podría aprovechar la modulación de múltiples vías de resistencia.

Estos hallazgos posicionan a Nilotinib como una droga de reposicionamiento prometedora para LMA, capaz de potenciar la eficacia de compuestos como Teniposide y posiblemente mejorar el perfil terapéutico en pacientes con fenotipos resistentes.

Reducción de ZEB2 y su impacto en la sensibilidad a quimioterapéuticos

Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento con Teniposide, tanto solo como en combinación con Nilotinib, redujo de forma significativa la expresión de ZEB2 en células THP-1, tanto a nivel de ARN mensajero (a las 24 horas, evaluado por RT-qPCR) como a nivel proteico (a las 48 horas, medido por Western blot). Este efecto se asoció con un incremento notable en la muerte celular, lo cual respalda la hipótesis de que ZEB2 actúa como un regulador clave de la resistencia farmacológica en leucemia mieloide aguda. Este rol ha sido previamente descrito en estudios que vinculan a ZEB2 con la promoción de la autorrenovación de células madre leucémicas, la inhibición de diferenciación y la evasión de la apoptosis (J. Li et al., 2017; Peinado et al., 2007; Scott et al., 2016; Wang et al., 2020).

Además, se detectó una reducción concurrente en la expresión de ZEB1, lo cual es relevante dado que ZEB1 y ZEB2 comparten funciones redundantes como represores transcripcionales: ambos se unen a secuencias E-box (CANNTG) mediante sus dominios de dedos de zinc, y reclutan complejos represores como CtBP, HDACs y NuRD para silenciar genes blancos, incluyendo reguladores de la diferenciación y de la apoptosis (Peinado et al., 2007; Sánchez-Tilló et al., 2012; Vandewalle et al., 2005). Esta doble inhibición sugiere una disrupción funcional significativa en el programa transcripcional EMT, que ha sido asociado no sólo a la progresión tumoral, sino también a mecanismos de resistencia a terapias en cáncer hematológico y epitelial (Dongre & Weinberg, 2019).

Sin embargo, a pesar de esta inhibición simultánea de ZEB1 y ZEB2, no se observaron cambios significativos en la expresión de ID2 a las 24 horas, lo que contrasta con la hipótesis inicial que planteaba una regulación directa y negativa de ZEB2 sobre ID2. Esta aparente contradicción podría explicarse por varias razones. En primer lugar, es posible que el análisis de RT-qPCR realizado a las 24 horas no haya captado un efecto transcripcional que ocurre posteriormente, considerando que la caída proteica de ZEB2 se observa con mayor claridad recién a las 48 horas. En este contexto, la desrepresión de ID2 podría requerir una inhibición sostenida de ZEB2 a nivel de proteína, junto con el recambio de complejos represores previamente ensamblados.

En segundo lugar, es probable que existan mecanismos compensatorios que mantengan reprimido a ID2 incluso en ausencia de ZEB1/2. Por ejemplo, se ha descrito que E2A y HES1 pueden actuar como represores alternativos en contextos hematopoyéticos (Fischer & Gessler, 2007; Ikawa et al., 2004), mientras que la represión epigenética mediada por HDACs y complejos NuRD también ha sido implicada en el silenciamiento de ID2 en células madre (Scott et al., 2016; Wu et al., 2016). Estos mecanismos podrían estar activos o incluso compensatoriamente reforzados en células THP-1, impidiendo la desrepresión de ID2 a pesar de la inhibición de ZEB2.

Por último, es importante considerar que la relación funcional ZEB2-ID2 podría depender del subtipo molecular de LMA o del contexto del microambiente hematopoyético. Estudios recientes han sugerido que la interacción entre estos genes puede estar condicionada por mutaciones específicas (por ejemplo, en TET2, RUNX1 o IDH1/2), así como por señales extrínsecas del nicho medular como citoquinas, hipoxia o contacto célula-célula (Buenrostro et al., 2018; Cabezas-Wallscheid et al., 2017). En consecuencia, la falta de respuesta de ID2 en este modelo celular no descarta una interacción funcional en otros contextos biológicos más representativos de la enfermedad primaria.

Efecto sinérgico de Teniposide y Nilotinib en células THP-1

Se evaluó la citotoxicidad de los compuestos Teniposide, Nilotinib, Cd3254 y HK en células THP-1, utilizando concentraciones moderadas y altas. A concentraciones bajas (<10 μ M), solo Teniposide indujo una muerte celular

significativa. A continuación, se generaron curvas dosis-respuesta para estimar la IC_{50} de cada compuesto. Se determinó que la IC_{50} de Teniposide fue de 7.22 μM , y la de HK fue de 22.51 μM . Por el contrario, Nilotinib y Cd3254 no alcanzaron niveles suficientes de inhibición para estimar una IC_{50} confiable dentro del rango de concentraciones evaluado (0.1–50 μM). Esta limitación puede atribuirse a un bajo efecto citotóxico de estos compuestos en el modelo THP-1 o a una cinética de acción más lenta, como es el caso de Cd3254, cuyo mecanismo implica reprogramación epigenética progresiva y requiere tratamientos superiores a 40 días (Jin et al., 2023).

A pesar de no presentar una IC_{50} calculable en este contexto, se decidió continuar con Nilotinib para los ensayos de combinación por varias razones: (i) su uso clínico aprobado en leucemias, (ii) su perfil farmacológico bien caracterizado, y (iii) su aparición consistente como candidato prioritario en los análisis de *machine learning* realizados en este estudio. En cambio, Cd3254, a pesar de su acción documentada sobre ZEB2, requiere ventanas experimentales prolongadas incompatibles con el diseño de los experimentos actuales. Además, su uso como herramienta farmacológica sigue limitado a estudios preclínicos sin aplicación clínica directa.

Para mejorar la detección de una IC_{50} para Nilotinib o Cd3254, podrían explorarse metodologías alternativas, como: aumentar la duración del tratamiento (por ejemplo, hasta 72 o 96 h), para permitir que se acumulen los efectos citotóxicos o epigenéticos; utilizar ensayos de mayor sensibilidad, como el ensayo CellTiter-Glo®, que mide ATP como indicador de viabilidad; e incrementar la densidad de puntos en la curva de concentración, especialmente en el rango de 10–100 μM .

En la literatura, se han reportado valores de IC_{50} para Nilotinib en líneas celulares como MOLM-13 y MV4-11, en rangos de 3 a 6 μM , dependiendo del contexto mutacional y del tiempo de exposición (Weisberg et al., 2007; Wu et al., 2016). Estos valores sugieren que la respuesta a Nilotinib es dependiente del perfil genético de la célula, y que THP-1 podría ser intrínsecamente menos sensible.

Al evaluar la combinación de Teniposide y Nilotinib, se observó una sinergia significativa: el tratamiento conjunto generó una mayor citotoxicidad que los compuestos por separado, y además indujo la expresión del marcador CD68, relacionado con la diferenciación hacia un fenotipo fagocítico. Este hallazgo es relevante, ya que la maduración mieloide representa un objetivo terapéutico clave en LMA, donde el bloqueo de diferenciación es una característica patológica central (Caligiuri et al., 2015).

Desde el punto de vista farmacocinético, tanto Nilotinib como Teniposide son metabolizados por CYP3A4 y son sustratos de P-glicoproteína (P-gp). Nilotinib actúa como inhibidor moderado de estas vías, lo que puede prolongar la vida media intracelular de Teniposide, potenciando su efecto citotóxico (DrugBank DB04868, DB00342). Esta interacción metabólica podría explicar, en parte, el efecto sinérgico observado.

En conjunto, estos resultados apoyan el uso racional de combinaciones farmacológicas que integren compuestos reposicionados como Nilotinib junto a agentes citotóxicos clásicos, alineándose con las propuestas actuales para superar la heterogeneidad y resistencia en LMA (Döhner et al., 2017; Estey, 2018).

Limitaciones y desafíos técnicos

Un hallazgo crítico fue la baja eficiencia en la sobreexpresión de ZEB2 e ID2 mediante vectores lentivirales, lo que limitó la evaluación directa de su papel en la resistencia. Esto podría atribuirse a la toxicidad intrínseca de estas proteínas o a barreras técnicas en la transducción de células THP-1. Futuros estudios deberían optimizar protocolos de edición génica (p. ej., CRISPR activación) o emplear modelos in vivo para validar estos mecanismos. Además, el estudio se centró en una única línea celular (THP-1), que representa solo un subtipo de LMA. La heterogeneidad genética de la enfermedad exige validar estos resultados en otras líneas celulares o muestras primarias de pacientes, particularmente aquellas con alteraciones en ZEB2 (Arber, 2019).

Una de las principales limitaciones experimentales de este estudio fue la baja eficiencia en la sobreexpresión de ZEB2 e ID2 mediante vectores lentivirales en células THP-1, lo que restringió la posibilidad de evaluar de forma directa su papel funcional en la resistencia a quimioterapéuticos. Este fenómeno podría deberse a múltiples factores. Por un lado, tanto ZEB2 como ID2 son factores transcripcionales reguladores del destino celular, cuya

sobreexpresión ectópica puede resultar tóxica para la célula huésped, desencadenando procesos de estrés o pérdida de viabilidad, como ha sido reportado en otros sistemas hematopoyéticos (J. Li et al., 2017; Scott et al., 2016). Por otro lado, las células THP-1, derivadas de monocitos humanos, presentan baja infectabilidad con vectores lentivirales estándar, y requieren condiciones especializadas de transducción (p. ej., uso de poli-L-lisina, concentraciones virales altas, o sinergia con transducción en spinoculación) para lograr eficiencias óptimas.

Ante estas dificultades, se recomienda que futuros estudios consideren metodologías alternativas como la activación CRISPR (CRISPRa), que permite inducir la expresión endógena de genes mediante dCas9-fusionado a activadores transcripcionales (Hilton et al., 2015), evitando la toxicidad asociada a la sobreexpresión exógena. También podría explorarse el uso de vectores adenovirales modificados, que han mostrado mayor eficiencia de transfección en células hematopoyéticas y menor toxicidad global en comparación con lentivirus en ciertos contextos.

Otro desafío metodológico relevante fue la utilización de una única línea celular (THP-1) como modelo experimental. Aunque esta línea representa una LMA de tipo monocítico (M5), se reconoce que la heterogeneidad genética y epigenética de la LMA es amplia y clínicamente significativa. Alteraciones como mutaciones en FLT3, NPM1, IDH1/2, TET2 o DNMT3A pueden influir profundamente en la respuesta a tratamientos y en la regulación de factores como ZEB2 o ID2 (Arber, 2019; Papaemmanuil et al., 2016). Por tanto, los resultados aquí presentados deben ser interpretados como modelo de prueba de concepto, y se hace necesario validar estos hallazgos en otras líneas celulares representativas de distintos subtipos moleculares, así como en muestras primarias de pacientes con LMA, especialmente aquellas con sobreexpresión o mutaciones funcionales en ZEB2 o sus vías reguladoras.

En conjunto, estos desafíos subrayan la complejidad de estudiar factores transcripcionales en modelos celulares artificiales y refuerzan la necesidad de combinar enfoques genómicos, farmacológicos e *in vivo* para una comprensión integral de su rol en la resistencia terapéutica.

Implicaciones clínicas y proyecciones terapéuticas

La identificación de Nilotinib como posible modulador de la expresión de ZEB2, a través de enfoques de aprendizaje automático integrados con datos ómicos de LMA, plantea una estrategia novedosa de reposicionamiento farmacológico. Dado que Nilotinib ya cuenta con aprobación clínica para el tratamiento de LMC, su uso en LMA, en combinación con compuestos como Teniposide, representa una vía potencialmente acelerada de traducción clínica, evitando los costos y tiempos asociados al desarrollo de nuevos agentes. En este contexto, la sinergia observada entre ambos fármacos no solo refuerza el valor de Nilotinib como coadyuvante, sino que también destaca el rol funcional de ZEB2 como diana terapéutica emergente en LMA.

No obstante, antes de considerar su implementación clínica, es fundamental realizar estudios preclínicos avanzados que evalúen en profundidad tanto la eficacia como la toxicidad de esta combinación. En particular, se deben considerar los posibles efectos adversos en poblaciones vulnerables como pacientes de edad avanzada, pediátricos o con comorbilidades, en quienes Nilotinib ha mostrado efectos secundarios como prolongación del QT, hipertensión y hepatotoxicidad (Cortes et al., 2013; Shimony et al., 2023). Además, deben investigarse las interacciones farmacocinéticas, ya que Nilotinib puede inhibir enzimas metabólicas clave como CYP3A4, afectando la biodisponibilidad de otros fármacos coadministrados.

Desde una perspectiva más amplia, este estudio contribuye a la comprensión del rol de ZEB2 como mediador de resistencia a quimioterapia en LMA y resalta la relevancia de estrategias terapéuticas combinatorias basadas en mecanismos moleculares específicos. A pesar de las limitaciones técnicas y del uso de un único modelo celular, los hallazgos presentados refuerzan la necesidad de diseñar tratamientos personalizados que integren tanto los perfiles genómicos de los pacientes como la caracterización funcional de las rutas de resistencia.

Conclusión y proyecciones

Este estudio demuestra que la inhibición de ZEB2 mediante Teniposide, tanto en monoterapia como en combinación con Nilotinib, reduce significativamente su expresión a nivel génico y proteico en células THP-1, lo que se traduce en un aumento marcado de la citotoxicidad y en la progresión hacia un fenotipo más diferenciado, evidenciado por una mayor expresión del marcador CD68. Este hallazgo subraya el papel central de ZEB2 como regulador de la resistencia terapéutica en LMA, probablemente a través del control de vías de supervivencia, autorrenovación y bloqueo de diferenciación de las células leucémicas.

Por otra parte, la ausencia de cambios sustanciales en la expresión de ID2, incluso en presencia de una inhibición sostenida de ZEB2, sugiere que la regulación de este gen podría no depender exclusivamente del eje ZEB2-ID2 en este modelo celular. Este resultado apunta a la existencia de mecanismos reguladores independientes o compensatorios, que podrían variar según el contexto celular o el estado epigenético de la célula leucémica.

La combinación de Teniposide y Nilotinib evidenció un efecto sinérgico superior al de cada fármaco administrado individualmente, lo que refuerza el potencial de las estrategias combinatorias racionales para abordar la heterogeneidad biológica y la resistencia terapéutica en LMA. No obstante, persisten desafíos técnicos relevantes, como la baja eficiencia en la sobreexpresión de ZEB2 e ID2 mediante vectores lentivirales, que limitó la validación funcional directa. Estos obstáculos podrían superarse mediante nuevas aproximaciones de edición génica activadora o re-presora (CRISPRa/i) o el uso de vectores adenovirales, así como mediante la implementación de modelos in vivo que permitan evaluar los efectos de estas combinaciones farmacológicas en un entorno más fisiológicamente representativo.

Finalmente, será esencial replicar estos hallazgos en muestras primarias de pacientes y en otras líneas celulares que reflejen la diversidad genética de la LMA, especialmente aquellas con mutaciones de mal pronóstico, como FLT3-ITD, o con alteraciones funcionales en ZEB2. Aunque el modelo utilizado (THP-1) está asociado al reordenamiento MLL-AF9, los resultados obtenidos posicionan a Nilotinib como un candidato de reposicionamiento clínico que, en combinación con Teniposide, podría aportar beneficios terapéuticos en subtipos agresivos de LMA resistentes a quimioterapia convencional.

Bibliografía

Acute Myeloid Leukemia—Cancer Stat Facts. (n.d.). SEER. Retrieved November 22, 2023, from <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>

Arber, D. A. (2019). The 2016 WHO classification of acute myeloid leukemia: What the practicing clinician needs to know. *Seminars in Hematology*, *56*(2), 90–95. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2018.08.002>

Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M., & Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, *127*(20), 2391–2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>

Buenrostro, J. D., Corces, M. R., Lareau, C. A., Wu, B., Schep, A. N., Aryee, M. J., Majeti, R., Chang, H. Y., & Greenleaf, W. J. (2018). Integrated Single-Cell Analysis Maps the Continuous Regulatory Landscape of Human Hematopoietic Differentiation. *Cell*, *173*(6), 1535–1548.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.074>

Burnett, A. K., Russell, N. H., Hills, R. K., Hunter, A. E., Kjeldsen, L., Yin, J., Gibson, B. E. S., Wheatley, K., & Milligan, D. (2013). Optimization of chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: Results of the medical research council AML15 trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *31*(27), 3360–3368. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.47.4874>

Cabezas-Wallscheid, N., Buettner, F., Sommerkamp, P., Klimmeck, D., Ladel, L., Thalheimer, F. B., Pastor-Flores, D., Roma, L. P., Renders, S., Zeisberger, P., Przybylla, A., Schönberger, K., Scognamiglio, R., Altamura, S., Florian, C. M., Fawaz, M., Vonficht, D., Tesio, M., Collier, P., ... Trumpp, A. (2017). Vitamin A-Retinoic Acid Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Dormancy. *Cell*, *169*(5), 807–823.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.018>

Caligiuri, M., Levi, M. M., Kaushansky, K., Lichtman, M. A., Prchal, J., Burns, L. J., & Press, O. W. (2015). *Williams hematology*, 9E. McGraw-Hill Education. <https://books.google.cl/books?id=6MuXnQAACAAJ>

Cancer Genome Atlas Research Network, Ley, T. J., Miller, C., Ding, L., Raphael, B. J., Mungall, A. J., Robertson, A. G., Hoadley, K., Triche, T. J., Laird, P. W., Baty, J. D., Fulton, L. L., Fulton, R., Heath, S. E., Kalicki-Veizer, J., Kandoth, C., Klco, J. M., Koboldt, D. C., Kanchi, K.-L., ... Eley, G. (2013). Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *368*(22), 2059–2074. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal301689>

Cortes, J. E., Khaled, S., Martinelli, G., Perl, A. E., Ganguly, S., Russell, N., Krämer, A., Dombret, H., Hogge, D., Jonas, B. A., Leung, A. Y.-H., Mehta, P., Montesinos, P., Radsak, M., Sica, S., Arunachalam, M., Holmes, M., Kobayashi, K., Namuyinga, R., ... Levis, M. J. (2019). Quizartinib versus salvage chemotherapy in relapsed or refractory FLT3-ITD acute myeloid leukaemia (QuANTUM-R): A multicentre, randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, *20*(7), 984–997. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30150-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30150-0)

Cortes, J. E., Kim, D.-W., Pinilla-Ibarz, J., le Coutre, P., Paquette, R., Chuah, C., Nicolini, F. E., Apperley, J. F., Khoury, H. J., Talpaz, M., DiPersio, J., DeAngelo, D. J., Abruzzese, E., Rea, D., Baccarani, M., Müller, M. C., Gambacorti-Passerini, C., Wong, S., Lustgarten, S., ... PACE Investigators. (2013). A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *The New England Journal of Medicine*, *369*(19), 1783–1796. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal306494>

Departamento de Epidemiología de Chile, Ministerio de Salud de Chile. (n.d.). *Segundo Informe Registros Poblacionales de Cáncer Febrero 2023*. Retrieved November 21, 2023, from http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2023/04/Segundo-Informe-Registros-Poblacionales-de-Cancer_Febrero2023.pdf

DiNardo, C. D., & Cortes, J. E. (2016). Mutations in AML: Prognostic and therapeutic implications. *Hematology*, *2016*(1), 348–355. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.348>

Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H. W., Listgarten, J., & Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity

and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, 34(2), 184–191. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>

Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Larson, R. A., Levine, R. L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M. S., Tien, H.-F., ... Bloomfield, C. D. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129(4), 424–447. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>

Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(2), 69–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>

Estey, E. H. (2018). Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*, 93(10), 1267–1291. <https://doi.org/10.1002/ajh.25214>

Fischer, A., & Gessler, M. (2007). Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Research*, 35(14), 4583–4596. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm477>

Guerra, V. A., DiNardo, C., & Konopleva, M. (2019). Venetoclax-based therapies for acute myeloid leukemia. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, 32(2), 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2019.05.008>

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

Hilton, I. B., D'Ippolito, A. M., Vockley, C. M., Thakore, P. I., Crawford, G. E., Reddy, T. E., & Gersbach, C. A. (2015). Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology*, 33(5), 510–517. <https://doi.org/10.1038/nbt.3199>

Ikawa, T., Kawamoto, H., Wright, L. Y. T., & Murre, C. (2004). Long-term cultured E2A-deficient hematopoietic progenitor cells are pluripotent. *Immunity*, 20(3), 349–360. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(04\)00049-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(04)00049-4)

Jacobsohn, D. A., & Vogelsang, G. B. (2007). Acute graft versus host disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2, 35. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-35>

Jain, A., Tripathi, R., Turpin, C. P., Wang, C., & Plattner, R. (2017). Abl kinase regulation by BRAF/ERK and cooperation with Akt in melanoma. *Oncogene*, 36(32), 4585–4596. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.76>

Jin, Y., Lu, Y., & Zhu, S. (2023). Harnessing endogenous transcription factors directly by small molecules for chemically induced pluripotency inception. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2215155120>

Kayser, S., & Levis, M. J. (2019). Clinical implications of molecular markers in acute myeloid leukemia. *European Journal of Haematology*, 102(1), 20–35. <https://doi.org/10.1111/ejh.13172>

Lachowicz, C. A., DiNardo, C. D., & Loghavi, S. (2023). Molecularly Targeted Therapy in Acute Myeloid Leukemia: Current Treatment Landscape and Mechanisms of Response and Resistance. *Cancers*, 15(5), 1617. <https://doi.org/10.3390/cancers15051617>

Latchman, D. S. (1997). Transcription factors: An overview. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(12), 1305–1312. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(97\)00085-x](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(97)00085-x)

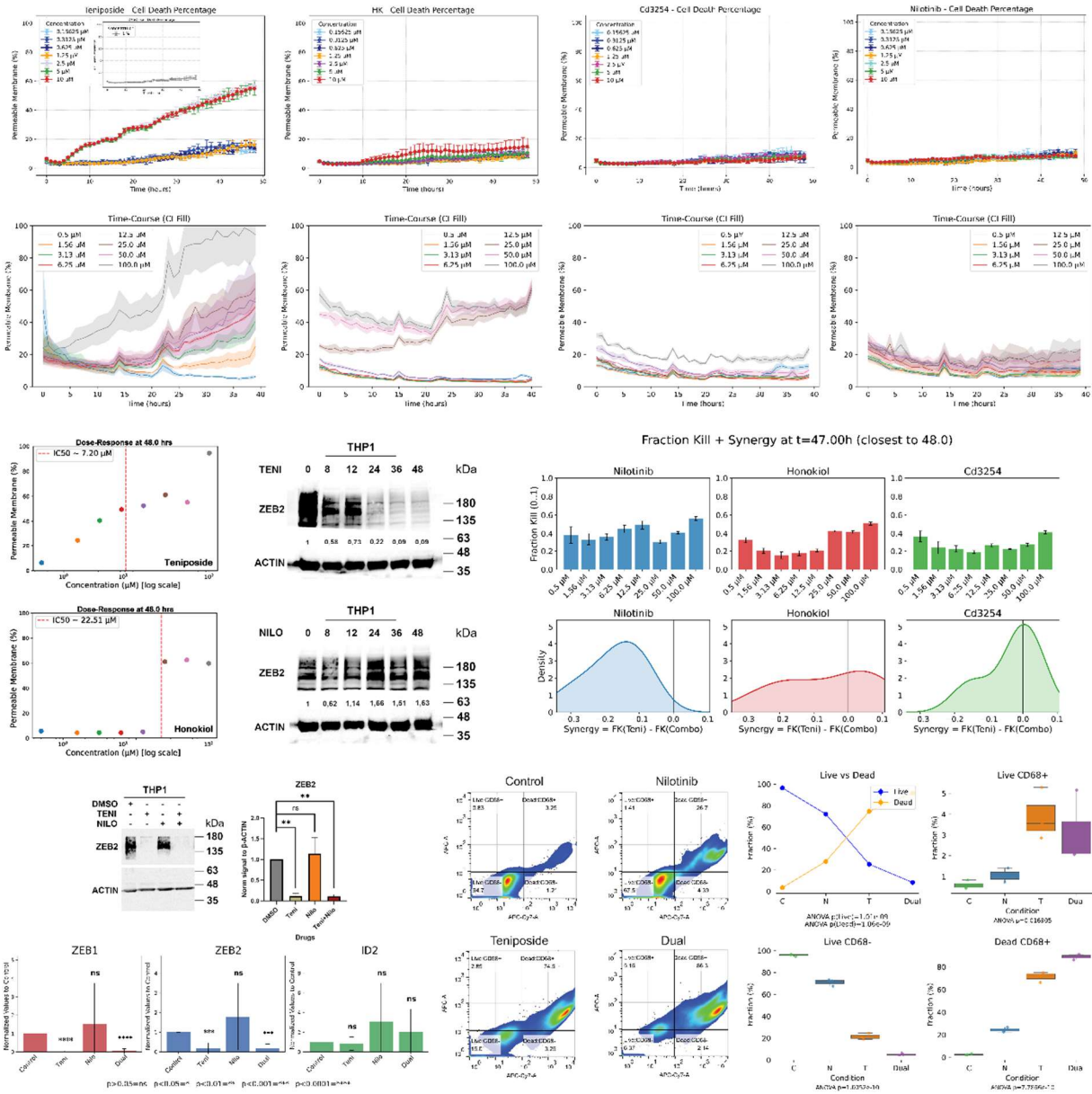
Li, H., Mar, B. G., Zhang, H., Puram, R. V., Vazquez, F., Weir, B. A., Hahn, W. C., Ebert, B., & Pellman, D. (2017). The EMT regulator ZEB2 is a novel dependency of human and murine acute myeloid leukemia. *Blood*, 129(4), 497–508. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-05-714493>

Li, J., Riedt, T., Goossens, S., Carrillo García, C., Szczepanski, S., Brandes, M., Pieters, T., Dobrosch, L., Gütgemann, I., Farla, N., Radaelli, E., Hulpiau, P., Mallela, N., Fröhlich, H., La Starza, R., Matteucci, C., Chen, T.,

- Brossart, P., Mecucci, C., ... Janzen, V. (2017). The EMT transcription factor Zeb2 controls adult murine hematopoietic differentiation by regulating cytokine signaling. *Blood*, *129*(4), 460–472. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-05-714659>
- Li, W., Wang, Q., Su, Q., Ma, D., An, C., Ma, L., & Liang, H. (2014). Honokiol Suppresses Renal Cancer Cells' Metastasis via Dual-Blocking Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cell Properties through Modulating miR-141/ZEB2 Signaling. *Molecules and Cells*, *37*(5), 383–388. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.0009>
- Lo-Coco, F., Avvisati, G., Vignetti, M., Thiede, C., Orlando, S. M., Iacobelli, S., Ferrara, F., Fazi, P., Cicconi, L., Di Bona, E., Specchia, G., Sica, S., Divona, M., Levis, A., Fiedler, W., Cerqui, E., Breccia, M., Fioritoni, G., Salih, H. R., ... Study Alliance Leukemia. (2013). Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *369*(2), 111–121. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1300874>
- Luo, W., Zhu, X., Liu, W., Ren, Y., Bei, C., Qin, L., Miao, X., Tang, F., Tang, G., & Tan, S. (2016). MYC associated zinc finger protein promotes the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by inducing epithelial mesenchymal transition. *Oncotarget*, *7*(52), 86420. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13416>
- Majhail, N. S., Rizzo, J. D., Lee, S. J., Aljurf, M., Atsuta, Y., Bonfim, C., Burns, L. J., Chaudhri, N., Davies, S., Okamoto, S., Seber, A., Socie, G., Szer, J., Van Lint, M. T., Wingard, J. R., Tichelli, A., Center for International Blood and Marrow Transplant Research, American Society for Blood and Marrow Transplantation, European Group for Blood and Marrow Transplantation, ... Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Ossea. (2012). Recommended screening and preventive practices for long-term survivors after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, *47*(3), 337–341. <https://doi.org/10.1038/bmt.2012.5>
- Megías-Vericat, J. E., Martínez-Cuadrón, D., Solana-Altabella, A., Poveda, J. L., & Montesinos, P. (2022). Systematic Review of Pharmacogenetics of ABC and SLC Transporter Genes in Acute Myeloid Leukemia. *Pharmaceutics*, *14*(4), 878. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040878>
- Metge, B. J., Alsheikh, H. A. M., Kammerud, S. C., Chen, D., Das, D., Nebane, N. M., Bostwick, J. R., Shevde, L. A., & Samant, R. S. (2024). Targeting EMT using low-dose Teniposide by downregulating ZEB2-driven activation of RNA polymerase I in breast cancer. *Cell Death & Disease*, *15*(5), 322. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06694-7>
- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Bullinger, L., Gaidzik, V. I., Paschka, P., Roberts, N. D., Potter, N. E., Heuser, M., Thol, F., Bolli, N., Gundem, G., Van Loo, P., Martincorena, I., Ganly, P., Mudie, L., McLaren, S., O'Meara, S., Raine, K., Jones, D. R., ... Campbell, P. J. (2016). Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *374*(23), 2209–2221. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516192>
- Park, J., Lim, K., Kim, J.-S., & Bae, S. (2017). Cas-analyzer: An online tool for assessing genome editing results using NGS data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *33*(2), 286–288. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw561>
- Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: An alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer*, *7*(6), 415–428. <https://doi.org/10.1038/nrc2131>
- Qi, S., Song, Y., Peng, Y., Wang, H., Long, H., Yu, X., Li, Z., Fang, L., Wu, A., Luo, W., Zhen, Y., Zhou, Y., Chen, Y., Mai, C., Liu, Z., & Fang, W. (2012). ZEB2 Mediates Multiple Pathways Regulating Cell Proliferation, Migration, Invasion, and Apoptosis in Glioma. *PLoS ONE*, *7*(6), e38842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038842>
- Salas-Vega, S., Iliopoulos, O., & Mossialos, E. (2017). Assessment of Overall Survival, Quality of Life, and Safety Benefits Associated With New Cancer Medicines. *JAMA Oncology*, *3*(3), 382–390. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.4166>
- Sánchez-Tilló, E., Liu, Y., de Barrios, O., Siles, L., Fanlo, L., Cuatrecasas, M., Darling, D. S., Dean, D. C., Castells, A., & Postigo, A. (2012). EMT-activating transcription factors in cancer: Beyond EMT and tumor invasiveness. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *69*(20), 3429–3456. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1122-2>

- Sanz, M. A., Fenaux, P., Tallman, M. S., Estey, E. H., Löwenberg, B., Naoe, T., Lengfelder, E., Döhner, H., Burnett, A. K., Chen, S.-J., Mathews, V., Iland, H., Rego, E., Kantarjian, H., Adès, L., Avvisati, G., Montesinos, P., Platzbecker, U., Ravandi, F., ... Lo-Coco, F. (2019). Management of acute promyelocytic leukemia: Updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. *Blood*, *133*(15), 1630–1643. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-01-894980>
- Scott, C. L., Soen, B., Martens, L., Skrypek, N., Saelens, W., Taminau, J., Blancke, G., Van Isterdael, G., Huylebroeck, D., Haigh, J., Saey, Y., Williams, M., Lambrecht, B. N., & Berx, G. (2016). The transcription factor Zeb2 regulates development of conventional and plasmacytoid DCs by repressing Id2. *Journal of Experimental Medicine*, *213*(6), 897–911. <https://doi.org/10.1084/jem.20151715>
- Segura, M. M., Garnier, A., Durocher, Y., Ansoerge, S., & Kamen, A. (2010). New protocol for lentiviral vector mass production. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *614*, 39–52. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-533-0_2
- Shaw, B. E., Logan, B. R., Spellman, S. R., Marsh, S. G. E., Robinson, J., Pidala, J., Hurley, C., Barker, J., Maiers, M., Dehn, J., Wang, H., Haagenson, M., Porter, D., Petersdorf, E. W., Woolfrey, A., Horowitz, M. M., Verneris, M., Hsu, K. C., Fleischhauer, K., & Lee, S. J. (2018). Development of an Unrelated Donor Selection Score Predictive of Survival after HCT: Donor Age Matters Most. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, *24*(5), 1049–1056. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.02.006>
- Shimony, S., Stahl, M., & Stone, R. M. (2023). Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*, *98*(3), 502–526. <https://doi.org/10.1002/ajh.26822>
- Sun, L. (2015). Id2 Is Required for the Self-Renewal and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells. *Blood*, *126*(23), 1173. <https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.1173.1173>
- Thomas, P., & Smart, T. G. (2005). HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *51*(3), 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>
- Vandewalle, C., Comijn, J., Craene, B. D., Vermassen, P., Bruyneel, E., Andersen, H., Tulchinsky, E., Roy, F. V., & Berx, G. (2005). SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell–cell junctions. *Nucleic Acids Research*, *33*(20), 6566. <https://doi.org/10.1093/nar/gki965>
- Walter, R. B., Othus, M., Burnett, A. K., Löwenberg, B., Kantarjian, H. M., Ossenkoppele, G. J., Hills, R. K., Ravandi, F., Pabst, T., Evans, A., Pierce, S. R., Vekemans, M.-C., Appelbaum, F. R., & Estey, E. H. (2015). Resistance prediction in AML: Analysis of 4601 patients from MRC/NCRI, HOVON/SAKK, SWOG and MD Anderson Cancer Center. *Leukemia*, *29*(2), 312–320. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.242>
- Wang, S., Denton, K. E., Hobbs, K. F., Weaver, T., McFarlane, J. M. B., Connelly, K. E., Gignac, M. C., Milosevich, N., Hof, F., Paci, I., Musselman, C. A., Dykhuizen, E. C., & Krusemark, C. J. (2020). Optimization of Ligands Using Focused DNA-Encoded Libraries To Develop a Selective, Cell-Permeable CBX8 Chromodomain Inhibitor. *ACS Chemical Biology*, *15*(1), 112–131. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00654>
- Weisberg, E., Catley, L., Wright, R. D., Moreno, D., Banerji, L., Ray, A., Manley, P. W., Mestan, J., Fabbro, D., Jiang, J., Hall-Meyers, E., Callahan, L., DellaGatta, J. L., Kung, A. L., & Griffin, J. D. (2007). Beneficial effects of combining nilotinib and imatinib in preclinical models of BCR-ABL+ leukemias. *Blood*, *109*(5), 2112–2120. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-026377>
- Wu, L. M. N., Wang, J., Conidi, A., Zhao, C., Wang, H., Ford, Z., Zhang, L., Zweier, C., Ayee, B. G., Maurel, P., Zwijssen, A., Chan, J. R., Jankowski, M. P., Huylebroeck, D., & Lu, Q. R. (2016). Zeb2 recruits HDAC-NuRD to inhibit Notch and controls Schwann cell differentiation and remyelination. *Nature Neuroscience*, *19*(8), 1060–1072. <https://doi.org/10.1038/nn.4322>

Anexos



Panel de figuras para presentación a concurso FONDECYT de iniciación 2026