



BCR-ABL1: Un blanco terapéutico modulado por extractos de plantas ¿Es beneficiosa su combinación con imatinib?

Ana María Arango Forero
Estudiante de X semestre
Programa de Bacteriología y Laboratorio clínico

Asesora Interna
Cindy Arévalo Olaya. Esp. Ph.D
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Asesora Externa
Susana Fiorentino Gómez. Msc. Ph.D
Pontificia Universidad Javeriana

Proyecto de grado
Modalidad Experimental
Formato: Resultados finales presentados en formato artículo

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá D.C., abril de 2025



BCR-ABL1: Un blanco terapéutico modulado por extractos de plantas ¿Es beneficiosa su combinación con imatinib?

APROBADA:

JURADOS:

Denerieth Ximena Espinel Mesa
Martha Margarita Gonzalez Beltran

Asesora Interna
Cindy Arévalo Olaya. Esp. Ph.D
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Asesora Externa
Susana Fiorentino Gómez. Msc. Ph.D
Pontificia Universidad Javeriana

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá D.C., abril de 2025

Agradecimientos

A Dios, por ser la luz que ha iluminado mi camino, por darme fuerza en los momentos de oscuridad y esperanza cuando más la he necesitado. Sin su guía, este sueño no habría sido posible.

A mis padres, por su amor incondicional y su apoyo constante. Gracias por enseñarme a nunca rendirme, por sus sacrificios silenciosos y por creer en mí incluso cuando yo dudaba. Ustedes son mi mayor inspiración.

A mi abuela, que desde el cielo sigue cuidando de mí. Gracias por tu amor, por tu ejemplo de fortaleza y por ser mi ángel guardián en cada paso de este camino. Aunque ya no estés físicamente, tu luz y tu recuerdo viven siempre en mi corazón.

A Tomás, mi fiel compañero de cuatro patas, por alegrar mis días con su lealtad y su alegría desbordante. Su presencia me ha recordado la importancia de disfrutar los pequeños momentos y de encontrar felicidad en lo simple.

A Oscar, por llegar a mi vida y llenarla de amor en tan poco tiempo. Gracias por ser mi alegría, mi apoyo y mi lugar seguro. Te quiero más de lo que las palabras pueden decir.

A mi familia, por ser mi apoyo, por celebrar mis logros y sostenerme en cada tropiezo. Gracias por su paciencia, comprensión y amor incondicional.

Al Grupo de Inmunobiología y Biología Celular de la Pontificia Universidad Javeriana, en especial a mis asesoras Cindy Arévalo y Susana Fiorentino, por abrirme las puertas del conocimiento y brindarme un espacio para crecer, aprender y soñar. También a mis compañeros de laboratorio David B, Laura R, Natalia S y Paola L. Gracias por su guía, su acompañamiento y su generosidad.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por ser el escenario donde pude construir mi futuro, por las oportunidades y las herramientas que me brindaron para alcanzar mis metas.

A todos ustedes, gracias por ser parte de este viaje. Este logro es tan mío como suyo, y siempre llevaré en mi corazón la huella de su amor y apoyo.

BCR-ABL1: Un blanco terapéutico modulado por extractos de plantas ¿Es beneficiosa su combinación con imatinib?

Ana María Arango Forero¹, Cindy Arévalo Olaya^{1,2}, Susana Fiorentino^{2*}

¹Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca Bogotá D.C., Colombia

²Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia

Autor de correspondencia:

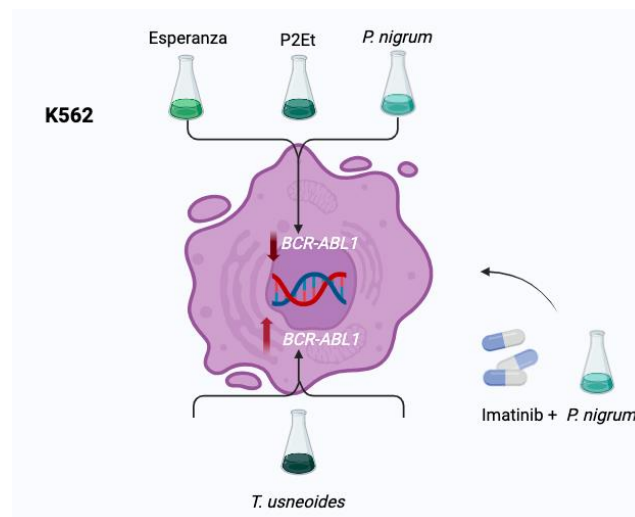
*susana.fiorentino@javeriana.edu.co (<https://orcid.org/0000-0002-4664-0682>)

Resumen

El cáncer se origina por alteraciones genéticas que favorecen la proliferación celular descontrolada y la resistencia a la apoptosis. En neoplasias hematológicas, el oncogén *BCR-ABL1* es clave, y su estudio ha llevado al desarrollo de inhibidores de tirosina quinasa como imatinib. No obstante, la resistencia a estos tratamientos sigue siendo un reto clínico. En este contexto, los extractos naturales representan una alternativa terapéutica prometedora. Este estudio evaluó el efecto de cuatro extractos vegetales (Esperanza de *Petiveria alliacea*, P2Et de *Caesalpinia spinosa*, *Tillandsia usneoides* y *Piper nigrum*) sobre la expresión de *BCR-ABL1* en células K562, su posible interacción con la proteína ABL1 y su influencia sobre la actividad citotóxica de imatinib. La qPCR mostró que Esperanza, P2Et y *P. nigrum* reducen significativamente la expresión del oncogén. Los análisis *in silico* no revelaron interacciones directas con ABL1, pero sí con proteínas clave como p53 y ATM. Los ensayos de sinergia indicaron un efecto antagónico al combinar Esperanza, P2Et y *Tillandsia usneoides* con imatinib, mientras que *Piper nigrum* mostró un efecto aditivo. Estos hallazgos sugieren que los extractos pueden modular vías moleculares relevantes en leucemia, y destacan a *P. nigrum* como un posible agente coadyuvante en terapias combinadas con imatinib.

Palabras clave: Oncogén, extractos naturales, imatinib.

Gráfico Resumen



1. Introducción

El cáncer es una enfermedad compleja caracterizada por la convergencia de múltiples vías moleculares y celulares que favorecen el desarrollo del fenotipo tumoral. Estas alteraciones son producto de la acumulación progresiva de mutaciones en protooncogenes y genes supresores de tumores (1). Los oncogenes son versiones mutadas o alteradas de los protooncogenes, cuya función fisiológica es regular procesos esenciales como el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular (2). Su activación puede deberse a mutaciones puntuales, traslocaciones cromosómicas o amplificaciones génicas, otorgando a las células ventajas proliferativas, resistencia a la apoptosis y evasión de los mecanismos de control del ciclo celular, favoreciendo así su inmortalización (3). Entre los oncogenes más estudiados se destacan *MYC*, *RAS* y *BCR-ABL1*, debido a su implicación en una amplia variedad de tipos de cáncer y a su papel clave en la regulación de procesos celulares fundamentales (4).

El oncogén *BCR-ABL1* se origina a partir de una translocación recíproca entre el gen *BCR*, ubicado en el cromosoma 22 y el gen *ABL*, ubicado en el cromosoma 9, generando el denominado cromosoma Filadelfia (Ph). Este gen de fusión es responsable del desarrollo de varios tipos de cáncer hematopoyéticos, incluyendo el 99% de los casos de leucemia mieloide crónica (LMC), el 15% de los casos de leucemia linfoblástica aguda (LLA) y el 1% de los casos de leucemia mieloide aguda (LMA) *de novo* (5–7). La fusión de *BCR* con *ABL* conlleva a una oncoproteína con actividad tirosina quinasa constitutiva a nivel citoplasmático, esto activa una variedad de vías de señalización como RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT y WNT/ β -catenina (8). Estas vías conducen a una proliferación celular descontrolada e inhibición de la apoptosis (9). Además de su papel en la activación de múltiples vías de señalización, la oncoproteína BCR-ABL1 también induce a una inestabilidad genómica al generar especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que contribuye a la acumulación de mutaciones secundarias y a la progresión de la enfermedad. Asimismo, se ha observado que BCR-ABL1 puede modular la expresión de genes implicados en la adhesión celular, promoviendo la evasión de las células leucémicas del microambiente de la médula ósea y facilitando su diseminación en la sangre periférica (10).

Desde una perspectiva terapéutica, la identificación del gen de fusión *BCR-ABL1* ha sido crucial para el desarrollo de inhibidores de tirosina quinasa (*TKI*), los cuales se clasifican en tres generaciones: los de primera generación, como el imatinib; los de segunda generación, como dasatinib y nilotinib; y los de tercera generación, como el ponatinib (11). Los *TKI* han revolucionado el tratamiento de neoplasias hematológicas con esta alteración genética, permitiendo obtener una respuesta clínica significativa, así como el aumento de la supervivencia global y la reducción de la progresión de la enfermedad (12). Entre los mecanismos de resistencia se encuentran las mutaciones adquiridas en el gen *BCR-ABL1*, como la T315I, la cual impide la acción de la mayoría de los inhibidores disponibles. Además, las células leucémicas pueden activar de manera constitutiva rutas de señalización como PI3K/AKT, RAS/MAPK y JAK/STAT, lo que les permite continuar proliferando y sobreviviendo incluso cuando la actividad de BCR-ABL1 ha sido bloqueada por el tratamiento. Otros mecanismos de resistencia incluyen la influencia de un microambiente tumoral protector, que favorece la supervivencia y el crecimiento del clon tumoral, la expulsión activa del fármaco mediante proteínas transportadoras y alteraciones epigenéticas que contribuyen a la persistencia del tumor a pesar de la terapia (13–15).

La resistencia a los *TKIs* no solo dificulta el tratamiento oncológico, sino que también implica un impacto económico significativo. En Colombia, por ejemplo, cambiar de un *TKI* de primera a segunda o tercera generación puede triplicar el costo inicial del tratamiento (16). A este desafío económico, se suman los efectos adversos graves asociados al uso prolongado *TKIs*, como hipertensión, deterioro de la función cardíaca y erupciones cutáneas (17). Esta situación destaca la necesidad de desarrollar alternativas terapéuticas accesibles que no solo actúen como terapias coadyuvantes para minimizar el desarrollo de resistencia a los *TKIs*, sino que también ayuden a reducir los efectos adversos asociados a estos tratamientos. Entre estas alternativas, los extractos derivados de plantas emergen como una opción prometedora, debido a sus propiedades potenciales para complementar la eficacia de los tratamientos convencionales y mejorar la calidad de vida de los pacientes (18,19).

Las plantas han demostrado propiedades antitumorales que han sido aprovechadas desde tiempos ancestrales, atribuidas a compuestos bioactivos primarios como alcaloides, taninos, flavonoides, fenoles, esteroides, terpenoides y saponinas (20). Diversos estudios han identificado múltiples mecanismos de acción de dichos compuestos

bioactivos, como la inducción de apoptosis, inhibición de la angiogénesis, modulación de la respuesta inmunitaria, capacidades antioxidantes, reducción de la invasión y metástasis, además de ser tratamientos potenciales como coadyuvantes de quimioterapéuticos actuales (21,22). Por ejemplo, algunos extractos o compuestos derivados de *Echinacea purpurea*, *Curcuma longa* y *Allium sativum* han demostrado una actividad antitumoral en el cáncer de seno (23). De manera similar, los extractos de *Cephalotaxus harringtonia*, *Catharanthus roseus* y *Maytenus serrata* han mostrado propiedades anti-leucémicas (24). Además, la combinación del quimioterapéutico citarabina con el compuesto natural resveratrol tiene un efecto antiproliferativo en células leucémicas (25), mientras que la asociación de un extracto metanólico de *Mucuna macrocarpa* con trióxido de arsénico potencia la inducción de apoptosis en dichas células (26). Cabe destacar que el resveratrol también ha demostrado actividad antitumoral en modelos de cáncer gástrico, actuando mediante la inhibición de oncogenes como β -catenina y c-Myc, lo que refuerza su potencial como agente terapéutico en diferentes tipos de cáncer (27).

En el grupo de Inmunobiología y Biología Celular (GIBC) de la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), hemos estudiado la actividad antitumoral de cuatro extractos derivados de plantas de crecimiento nativo en Colombia, como lo son: Esperanza, P2Et, *T. usneoides* y *P. nigrum*, en modelos de cáncer de seno, melanoma y leucemia. El extracto Esperanza, obtenido de las hojas y tallos de *Petiveria alliacea*, ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional de América Latina; esta planta fue objeto de un caso interesante en Nicaragua en la década de 1960. En ese entonces, se observó que vacas afectadas por leucemia mostraban signos de mejoría después de consumirla (28). Entre los principales compuestos bioactivos identificados en Esperanza se encuentran algunos aminoácidos (como serina, prolina, glicina y metionina), ácidos grasos, lípidos, nucleósidos, nucleótidos y compuestos fenólicos (29). Este extracto tiene varios mecanismos de acción que contribuyen a su actividad antitumoral. En el modelo de leucemia, evidenciamos que el extracto mostró una marcada inhibición de la proliferación celular al incrementar el tiempo de duplicación, sin inducir citotoxicidad significativa, lo que indica un efecto citostático predominante (30,31). Además de alterar la función mitocondrial en las células K562 (32) y reducir la carga tumoral en un modelo *in vivo* (33)

Por su parte, el extracto P2Et, proveniente de las vainas de *Caesalpinia spinosa*, comúnmente conocida como “*dividivi*” o “*tara*”, es nativa de América del Sur y utilizada en la medicina tradicional por sus capacidades antiinflamatorias y antitumorales (34). Hemos demostrado que este extracto induce a la apoptosis en células tumorales mediante de la vía del estrés del retículo endoplásmico, lo que conlleva a la disfunción mitocondrial y activación de caspasas, llevando a la muerte celular (35). Además, un aspecto crítico en el tratamiento del cáncer es la resistencia a los fármacos, que a menudo se debe a la sobreexpresión de bombas de eflujo, como la glicoproteína P (P-gp). Estas bombas expulsan los fármacos quimioterapéuticos de la célula tumoral lo que reduce su eficacia. Sin embargo, identificamos que el extracto P2Et puede inhibir estas bombas de eflujo, aumentando así la acumulación de fármacos en células de cáncer de seno (36). Además, este compuesto reduce los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en varias líneas celulares leucémicas, lo que demuestra su capacidad antioxidante (32). Finalmente, se ha establecido que este extracto no presenta genotoxicidad ni mutagenicidad, lo que refuerza su perfil de seguridad como un potencial fitomedicamento, aspecto crucial para su implementación en tratamientos clínicos (37).

Asimismo, el extracto etanólicos de *T. usneoides* derivado de las hojas de la planta *Tillandsia usneoides*, conocida como “*barba de viejo*”, ha sido utilizada en la medicina tradicional en diversas culturas, especialmente en América latina, debido a sus propiedades medicinales. Se ha demostrado que su extracto posee una rica composición química, incluyendo triterpenos y flavonoides. En particular, hemos identificado que este extracto induce apoptosis en las líneas celulares de mama (4T1 y MCF-7) y melanoma (B16-F10) (38). También puede inducir estrés oxidativo y disminuir la tasa de proliferación de células de leucemia DA-3/ER-GM (39). En último lugar, el extracto de *P. nigrum*, derivado de los frutos de la planta *Piper nigrum*, no solo induce a la apoptosis en células tumorales, sino que también altera el metabolismo de la glucosa y el estado redox, lo que sugiere que podría actuar tanto a nivel celular como a nivel metabólico (40). Además, *P. nigrum* tiene un efecto importante en la reducción del tamaño tumoral y la disminución de metástasis en modelos murinos de cáncer de mama y melanoma, que podría estar relacionado por su rol en la modulación del sistema inmune al incrementar la frecuencia de células dendríticas y células T CD8⁺ activadas, mientras reduce la presencia de células T reguladoras en el microambiente tumoral (41).

Teniendo en cuenta lo anterior, si bien hemos logrado identificar varios mecanismos de acción que podrían explicar, al menos en parte, la actividad antitumoral de nuestros extractos, aún no hemos evaluado su capacidad para regular la expresión de oncogenes ni su efecto sobre la actividad de *TKIs*. En este sentido, este trabajo tiene la siguiente pregunta de investigación: ¿Los extractos *Esperanza*, *P2Et*, *T. usneoides* y *P. nigrum* modulan la expresión del oncogén *BCR-ABL1*, interactúan con la proteína ABL1 y pueden potenciar la actividad citotóxica de *TKI* en células leucémicas?. Por lo tanto, el objetivo principal de esta investigación fue analizar los cambios en la expresión del oncogén *BCR-ABL1* tras el tratamiento con *Esperanza*, *P2Et*, *T. usneoides* y *P. nigrum*; además de evaluar su posible interacción con la proteína ABL1 mediante ensayos *in silico* y el impacto de estos extractos sobre la actividad citotóxica del *TKI* imatinib. Nuestra hipótesis plantea que estos extractos reducen la expresión del oncogén *BCR-ABL1* y potencian la actividad citotóxica del imatinib en células leucémicas. Además, que algunos compuestos principales de los extractos tienen una conexión directa con la proteína ABL1 afectando su función tirosina quinasa.

2. Metodología

El diseño metodológico, ampliado en la Figura 1, se estructuró en tres actividades principales con múltiples tareas orientadas a alcanzar el objetivo general del estudio. En primer lugar, se utilizó la línea celular K562, un modelo leucémico que expresa el oncogén *BCR-ABL1*, la cual fue tratada con los extractos *Esperanza*, *P2Et*, *T. usneoides* y *P. nigrum*. Posteriormente, se evaluó la posible interacción de algunos compuestos bioactivos presentes en estos extractos con la proteína ABL1 mediante análisis *in silico*. Y finalmente, se realizaron ensayos de combinación de los extractos con imatinib para determinar su efecto conjunto sobre la viabilidad de las células K562.

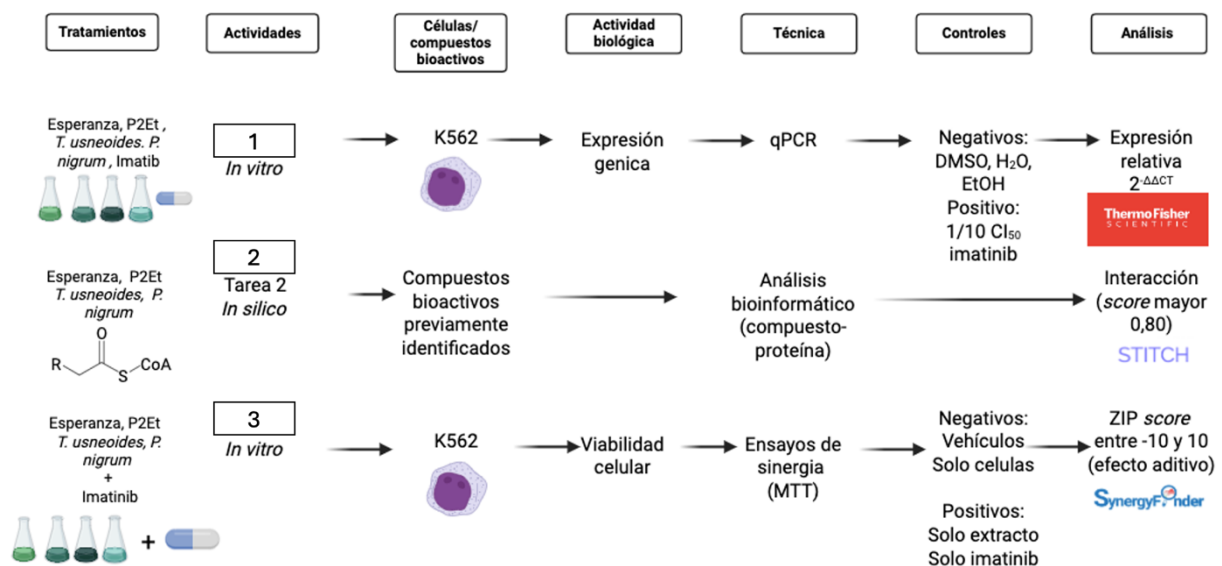


Figura 1: Resumen del diseño metodológico usado en esta investigación.

2.1 Cultivo celular

Para esta investigación se utilizó la línea celular leucémica K562, esta presenta la translocación cromosómica t(9;22), responsable de la fusión de los genes *BCR* y *ABL1* y en consecuencia, de la producción de la oncoproteína BCR-ABL1 con actividad tirosina quinasa aberrante. Esta línea celular, derivada de un paciente en fase blástica eritroide de una LMC (42), fue adquirida de la *American Type Culture Collection* (ATCC) y cultivada en medio RPMI-1640 (EUROBIO®) suplementado con L-glutamina (2 mM), HEPES (10 mM), piruvato de sodio (1 mM), suero fetal bovino (SFB) (10%) y una solución antibiótica de penicilina/estreptomicina (1%). Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. La línea celular se subcultivó cada 2 o 3 días para mantener el crecimiento exponencial y una viabilidad celular superior al 95%. Para el subcultivo, las células fueron recolectadas y centrifugadas a 1.800 rpm durante 5 minutos, seguida de la resuspensión en 5 mL de medio fresco. La evaluación de la viabilidad celular se realizó mediante el colorante azul de tripano (0,4%) y la densidad celular se ajustó a 500.000 células/mL en cajas de 25 cm² o 1.000.000 células/mL en cajas de 75 cm². Todos los experimentos se realizaron en el segundo o tercer pase.

2.2 Obtención y preparación de los tratamientos

2.2.1 Imatinib

El imatinib es un fármaco que inhibe de manera específica la actividad constitutiva de la tirosina quinasa tumoral BCR-ABL1 (43). Las tabletas de Glivec® (400 mg, NOVARTIS), cuyo principio activo es el imatinib, fueron proporcionadas como cortesía por el Hospital Universitario San Ignacio (HUSI). Para los ensayos experimentales, se utilizó un comprimido de imatinib, el cual fue macerado hasta obtener un material particulado fino. De este material, se pesaron 10 mg y se disolvieron en 1 mL de DMSO, alcanzando una concentración final de 20,269 $\mu\text{mol/L}$ (44).

2.2.2 Extractos de plantas

Las hojas y tallos de *P. allieacea* fueron recolectados en Lérída, Tolima, Colombia, identificados en el Herbario Nacional Colombiano (COL193) para obtener el extracto Esperanza. El material vegetal fue lavado y sometido a infusión con agua hirviendo durante 30 minutos. El extracto liofilizado, producido bajo las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en LABFARVE, fue validado químicamente según lineamientos de la FDA y certificado por la Farmacopea de Estados Unidos (33). Por otra parte, el extracto P2Et derivado de *Caesalpinia spinosa* proviene de vainas recolectadas en Villa de Leyva, Boyacá, Colombia, con identificación en el Herbario Nacional Colombiano (COL523714). El material fue deshidratado, molido y extraído por percolación con etanol (EtOH) absoluto (96 %) durante 10 días. El extracto crudo fue concentrado, fraccionado con solventes orgánicos y se obtuvo el precipitado. La producción se realiza bajo BPM en LABFARVE, con autorización del Ministerio de Medio Ambiente de Colombia y siguiendo directrices de la FDA (37).

Asimismo, el extracto de *T. usneoides* se obtuvo de hojas frescas de *Tillandsia usneoides* recolectadas en Villa de Leyva, Boyacá, Colombia, identificadas en el herbario de la Pontificia Universidad Javeriana (especimen 30547). El extracto fue caracterizado químicamente y reconstituido en EtOH absoluto (96%) (39). Finalmente, el extracto de *P. nigrum* fue obtenido de frutos frescos de la planta *Piper nigrum* recolectados en Putumayo, Colombia, identificados en el herbario de la PUJ (especimen 30548). Los frutos molidos se extrajeron por percolación con EtOH absoluto (96%) y el extracto concentrado por evaporación rotatoria. El extracto seco se almacenó en viales ámbar a temperatura ambiente (41). Para los ensayos, se reconstituyó en EtOH absoluto (96 %) o agua destilada a una concentración de 50 mg/mL, inmediatamente antes de su uso experimental

2.3 Concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) del imatinib.

Para determinar la CI₅₀ de imatinib sobre la línea celular K562, se implementó un subcultivo en pase 3 y se usó el método colorimétrico MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) (33). se prepararon diluciones seriadas del fármaco en concentraciones desde 200 hasta 1,56 μM en placas de 96 pozos con fondo redondo, sembrando 6×10^4 células por pozo. Tras 48 horas de incubación, las placas se centrifugaron, se eliminó el medio, y se añadieron 100 μL de RPMI sin rojo fenol y 50 μL de la solución de MTT (1 mg/mL, H₂O) por pozo. Posteriormente, las placas se incubaron durante 4 horas, y el revelado se realizó utilizando DMSO. Finalmente, la absorbancia se midió a 540 nm por espectrofotometría utilizando el fotómetro para microplacas Multiskan™ FC. Se implementó como control DMSO y los vehículos en los cuales se diluyeron los extractos (H₂O para Esperanza y EtOH para P2Et, *T. usneoides* y *P. nigrum*). Los análisis de viabilidad se realizaron calculando el porcentaje para cada concentración, en Microsoft Excel, teniendo en cuenta los promedios del control y tratamientos (absorbancia del tratamiento \times 100/ promedio absorbancia de los controles). Posteriormente, el valor de CI₅₀ (50% de inhibición del crecimiento celular) se determinó utilizando el software estadístico GraphPad Prism versión 8.1.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). El experimento se repitió de forma independiente en dos ocasiones.

2.4 qPCR

Las células K562 fueron sembradas en cajas de cultivo de 25 cm² a una densidad de 1×10^6 células/mL. Posteriormente, se trataron con 77,1 $\mu\text{g/mL}$ o 31,5 $\mu\text{g/mL}$ del extracto Esperanza y con $\frac{1}{2}$ CI₅₀ o $\frac{1}{5}$ CI₅₀ de P2Et, *T. usneoides* y *P. nigrum*, así como con $\frac{1}{10}$ CI₅₀ de imatinib (ver Tabla 1). Las CI₅₀ fueron calculadas y/o publicadas

previamente por el GIBC de la PUJ (39)(29). Después de 48 horas, se realizó la extracción de ARN utilizando el reactivo TRIzol LS (Life Technologies, Waltham, MA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La calidad y cantidad del ARN extraído se evaluó mediante espectrofotometría con un NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, Estados Unidos). Para determinar la pureza del ARN y descartar posibles contaminaciones por proteínas o compuestos químicos, se analizaron las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 (45).

Tabla 1. Resumen de las concentraciones de los tratamientos usados sobre la línea celular leucémica K562

Tratamiento	1/2 CI ₅₀	1/5 CI ₅₀
P2Et [µg/mL]	127	50,8
<i>T. usneoides</i> [µg/mL]	8,645	3,458
<i>P. nigrum</i> [µg/mL]	14,81	5,924
Esperanza [µg/mL]*	77,5	31
Imatinib [µM]		

*Esperanza no presenta actividad citotóxica, pero sí antiproliferativa (28). Por esta razón, se seleccionó un valor de 155 µg/mL como concentración de referencia en el estudio.

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir del ARN total con la transcriptasa inversa SuperScripts III, siguiendo las instrucciones del fabricante (Life Technologies Corporation, Invitrogen, NY, EE. UU.). Para la reacción de PCR en tiempo real, se agregaron 100 ng de ADNc, KiCqStart® SYBR® Green qPCR ReadyMix™ y 200 nM de cebadores directos e inversos en un volumen total de 20 µL. Las secuencias de los cebadores usados se muestran en la Tabla 2. El protocolo se llevó a cabo en 40 ciclos por 1 hora y 13 minutos (Anexo 1). Las reacciones se realizaron por duplicado utilizando sistemas de PCR en tiempo real QuantStudio 3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). La expresión relativa del gen asociado se normalizó con respecto al gen de control endógeno B2M (beta-2-microglobulina). La expresión relativa se calculó utilizando el método comparativo 2-ΔΔCT (45).

Tabla 2. Cebadores utilizados en los análisis de qPCR SYBR® green

Nombre Primer	Secuencia (5' - 3')	Temperatura anillamiento
BCRABL1_F	ACTCCAGACTGTCCACAGCA	57
BCRABL1_R	TTGGGGTCATTTTCACTGG	57
B2M_F	GCTGTCTCCATGTTTGATGTATC	60
B2M_R	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT	60

2.5 Predicción de la interacción entre compuestos químicos identificados en Esperanza, P2Et, *T. usneoides* o *P. nigrum* con la proteína ABL1.

Para los análisis bioinformáticos de interacción, se seleccionaron compuestos biomarcadores o aquellos con mayor abundancia de los extractos de interés, previamente identificados en el GIBC mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) (30,39,46). El análisis se llevó a cabo utilizando la base de datos STITCH 4 (<http://stitch.embl.de/>), que facilita la identificación de interacciones entre diversos compuestos químicos y proteínas. En el campo de palabras clave, se ingresaron los "nombres de los compuestos" en inglés y el nombre de la proteína "ABL", seleccionando la especie *Homo sapiens*. Se definió una puntuación cuantitativa, un score mayor a 0,7 como umbral, ya indica una alta probabilidad de que la interacción entre el compuesto bioactivo y la ABL1 sea significativa y confiable, según lo descrito en (47)

2.6 Ensayos de sinergia

Estos experimentos fueron realizados utilizando 7 concentraciones de cada tratamiento y todas las combinaciones posibles entre ellos, creando matrices 7x7, y en el caso de P2Et 7x6. Las concentraciones de cada tratamiento se seleccionaron en función de la CI_{50} calculada para P2Et, *T. usneoides* y *P. nigrum*, o de la concentración de referencia para Esperanza, según se describió anteriormente. Se escogieron dos concentraciones superiores y cuatro inferiores a dicho punto de referencia. La siembra de las células, las diluciones de los tratamientos y las mediciones de viabilidad celular se realizaron en placas de 96 pozos de fondo redondo, utilizando el ensayo MTT para evaluar la viabilidad celular en respuesta a los diferentes tratamientos. La aplicación web SynergyFinder+ (<https://synergyfinder.org/>) fue usada para analizar los datos de respuesta a las dosis de combinaciones de los tratamientos. Se consideró que una combinación era sinérgica cuando el puntaje promedio del modelo ZIP (Zero Interaction Potency) de dos réplicas biológicas era igual o superior a 10. Se calificó como antagónica cuando el puntaje era inferior a -10, y como aditiva cuando el valor estaba entre -10 y 10 (48). Los rangos de concentraciones evaluadas de cada tratamiento se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Resumen de los rangos de concentración usadas en la matriz de combinación entre P2Et, *T. usneoides*, *P. nigrum*, Esperanza e imatinib sobre la línea celular leucémica K562

Tratamiento	Rango
P2Et [$\mu\text{g/mL}$]	84,6 - 1,016
<i>T. usneoides</i> [$\mu\text{g/mL}$]	69,16 - 5,76
<i>P. nigrum</i> [$\mu\text{g/mL}$]	9,87 - 118,48
Esperanza [$\mu\text{g/mL}$]	51,6 - 465
Imatinib [μM]	12,23 - 146,76

3. Resultados

3.1 El imatinib es altamente citotóxico sobre la línea celular K562

Dado que en nuestro laboratorio no se contaba con información previa sobre la sensibilidad de la línea celular K562 al imatinib, se realizaron ensayos de citotoxicidad para determinar su CI_{50} . Se observó que, a concentraciones cercanas a 1 μM , el efecto citotóxico del fármaco disminuía significativamente. Como se muestra en la Figura 2, a una concentración de 200 μM (equivalente a un valor de $\log(2,3)$ en escala logarítmica), la viabilidad celular se redujo notablemente, alcanzando aproximadamente el 20 %. La CI_{50} calculada para el imatinib fue de $34,3 \pm 3,3 \mu\text{M}$, lo que indica que las células K562 son altamente susceptibles a este fármaco.

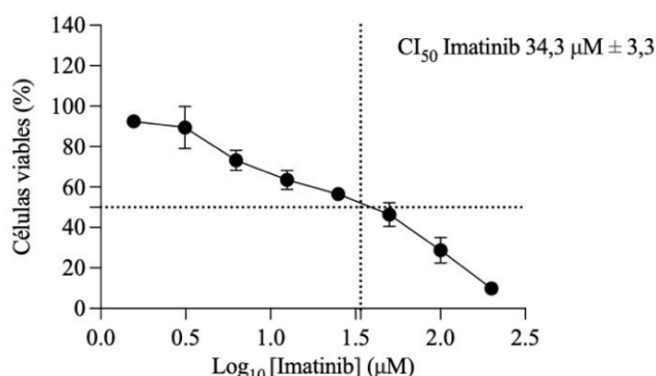


Figura 2. Actividad citotóxica del imatinib sobre las células K562. Los datos se representan como media \pm DE para dos experimentos independientes, una réplica para cada uno.

3.2 Esperanza, P2Et y *P. nigrum* disminuyen la expresión del oncogén *BCR-ABL1* en la línea celular K562

Estudios previos han demostrado que los extractos Esperanza, P2Et, *T. usneoides* y *P. nigrum* poseen un efecto antiproliferativo, citotóxico o citostático, además de modular el estado oxidativo intracelular y actuar como como mitocanes en el modelo leucémico (40). En este contexto, decidimos evaluar si estos tratamientos podían inducir cambios en la expresión del oncogén *BCR-ABL1*, lo que podría constituir un mecanismo de acción subyacente a la actividad antileucémica previamente observada.

En la Figura 3, se muestra la variación de la expresión relativa del gen en función de las diferentes concentraciones de los tratamientos evaluados. Como era de esperarse, el tratamiento con 1/10 de la concentración de imatinib conlleva a una disminución en la expresión del oncogén *BCR-ABL1*. De manera similar, el tratamiento con 1/2 o 1/5 de la CI_{50} del extracto Esperanza también resultó en la reducción significativa en la expresión génica. Este hallazgo, en conjunto con su efecto antiproliferativo previamente observado, sugiere una posible asociación entre ambos mecanismos. En cuanto al P2Et, se evidenció una disminución en la expresión de *BCR-ABL1* con la concentración equivalente a 1/5 de la CI_{50} , mientras que con 1/2 de la CI_{50} este efecto no fue evidente. Esto sugiere que, a concentraciones subletales, P2Et podría inducir una regulación negativa de la expresión génica, lo cual podría contribuir a su actividad antiproliferativa.

Por otro lado, el tratamiento con 1/2 de *T. usneoides* conduce a un aumento significativo en la expresión génica, mientras que a 1/5 de la CI_{50} este efecto desaparece. Este incremento podría deberse a que *T. usneoides* ejerce su efecto citotóxico mediante el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS). Ante este estrés oxidativo, la célula podría activar mecanismos de defensa y sobreregular genes asociados a la respuesta celular para evitar la apoptosis (38). En cuanto a *P. nigrum*, con 1/2 de la CI_{50} , al igual que Esperanza, genera una reducción de la expresión del oncogén. Esta disminución podría estar relacionada con su actividad antiproliferativa y citotóxica, posiblemente a través de la modulación de vías de señalización involucradas en el crecimiento celular y la apoptosis (33).

Estos resultados sugieren que la actividad antileucémica previamente evidenciada para los extractos podría estar relacionada con la modulación de la expresión del oncogén *BCR-ABL1*, ya sea reduciéndola o aumentándola. La disminución en la expresión de *BCR-ABL1* podría explicar el efecto antiproliferativo observado con Esperanza, P2Et y *Piper nigrum*. Por el contrario, el aumento en su expresión podría representar una respuesta adaptativa al estrés celular previa al daño irreversible, lo cual podría estar vinculado con la citotoxicidad inducida por *T. usneoides*. En este sentido, la alteración de los niveles basales de expresión del oncogén podría generar un desequilibrio en la homeostasis de las células tumorales, afectando su viabilidad y capacidad de proliferación.

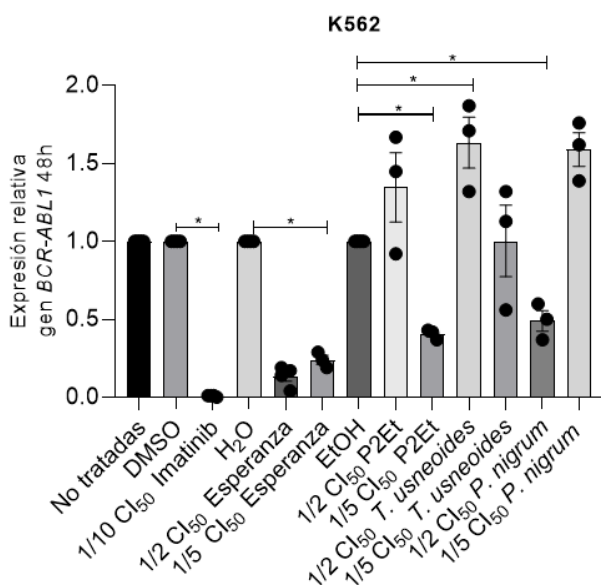


Figura 3. Expresión relativa del oncogén *BCR-ABL1*. Valores superiores a 1 indican una sobreexpresión del gen, mientras que valores inferiores a 1 reflejan una disminución en su expresión. Los datos representados hacen referencia a dos experimentos independientes +/- SEM. * $p < 0,05$.

3.3 Los compuestos bioactivos de interés de los extractos, no tienen conexión directa con la proteína ABL1

Al observar una regulación en la expresión génica inducida por los extractos, se procedió a investigar, mediante ensayos bioinformáticos, la interacción directa entre algunos de los compuestos previamente identificados en dichos extractos (detallados en la Tabla 4) y la proteína ABL1. Se seleccionó únicamente la proteína ABL1, ya que, en el contexto leucémico, cuando esta proteína se fusiona con BCR, conserva su dominio quinasa, el cual es el principal mediador del efecto oncogénico (49). Al construir las redes de interacción utilizando la plataforma STITCH, se observó que los compuestos analizados no presentan una interacción directa con la proteína ABL1.

Tal como se indica en la Tabla 4, los valores de interacción (Score) obtenidos fueron de 0,000, lo que sugiere la ausencia de una asociación funcional o física predecible entre dichos compuestos y ABL1. Sin embargo, se observó que el ácido cítrico y el ácido palmítico, presentes en Esperanza, interactúan de manera positiva con la proteína p53, clave en la regulación de apoptosis y respuesta al daño del ADN. Esta interacción sugiere un posible impacto en la inhibición del crecimiento celular descontrolado (50), con un score de 0,845 y 0,823, respectivamente (Figuras 4A y 4B). La interacción observada entre estos compuestos y p53 podría contribuir al efecto antiproliferativo de Esperanza, independientemente de la condición genética de *TP53*. En el contexto de *TP53* mutado, esta interacción podría estar relacionada con la generación de estrés oxidativo, daño en el ADN o alteraciones metabólicas que conducen a la inhibición de proliferación celular. En cambio, si *TP53* no estuviera mutado, su activación favorecería la detención del ciclo celular, la apoptosis y la reprogramación metabólica, limitando así la proliferación celular (50,51).

Tabla 4. Compuestos químicos presentes en los extractos, previamente identificados en el grupo de investigación.

Extracto	Compuestos	Familia	Score	Referencia
Esperanza	Ácido cítrico*	Ácido tricarboxílico	0,0	(33)
	Ácido glutámico	Aminoácido ácido	0,0	
	Ácido cinámico	Aminoácido ácido	0,0	
	Ácido aspártico	Aminoácido	0,0	
	Manitol	Polialcohol	0,0	
	Ácido palmítico *	Ácido graso saturado	0,0	
	Ácido glucárico	Monosacárido	0,0	
P2Et	Metil galato	Compuesto fenólico	0,0	(37)
	Etil Galato	Ester	0,0	
	Ácido gálico *	Ácido fenólico	0,0	
<i>T. usneoides</i>	Tetrametoxiflavona	Flavona	0,0	(38)
	Ácido shikímico	Ácido ciclohexano-carboxílico	0,0	
	Ácido quínico	Ácido ciclohexano-carboxílico	0,0	
<i>P. nigrum</i>	Piperina	Alcaloide	0,0	(41)
	Piperolein A	Benzodioxol	0,0	
	Piperolein B	Benzodioxol	0,0	

Un score de 0,000 sugiere la ausencia de una conexión directa con la proteína de interés, ABL1.

*Si bien no existe interacción directa con ABL, estas proteínas se relacionan con otras que sí interactúan con ABL1 de forma indirecta.

Asimismo, el ácido gálico, presente en P2Et, interactúa con la proteína ataxia-telangiectasia mutada (ATM), una proteína serina/treonina quinasa fundamental para la reparación de roturas de doble cadena en el ADN (52) (Figura 4C). La regulación positiva de ATM en células tumorales activa una potente respuesta de estrés y daño en el ADN. Si el daño es severo y la célula no puede repararlo, ATM inclina la balanza hacia la muerte celular (apoptosis) o una detención permanente del ciclo celular, lo que podría explicar el efecto citotóxico y citostático del P2Et sobre las

células K562 (53). De manera interesante y particular, al realizar la red de interacción del ácido aspártico, presente en Esperanza, mostró una conexión directa con imatinib, pero de carácter negativo (Figura 4D), lo que podría implicar una interferencia en su mecanismo de acción.

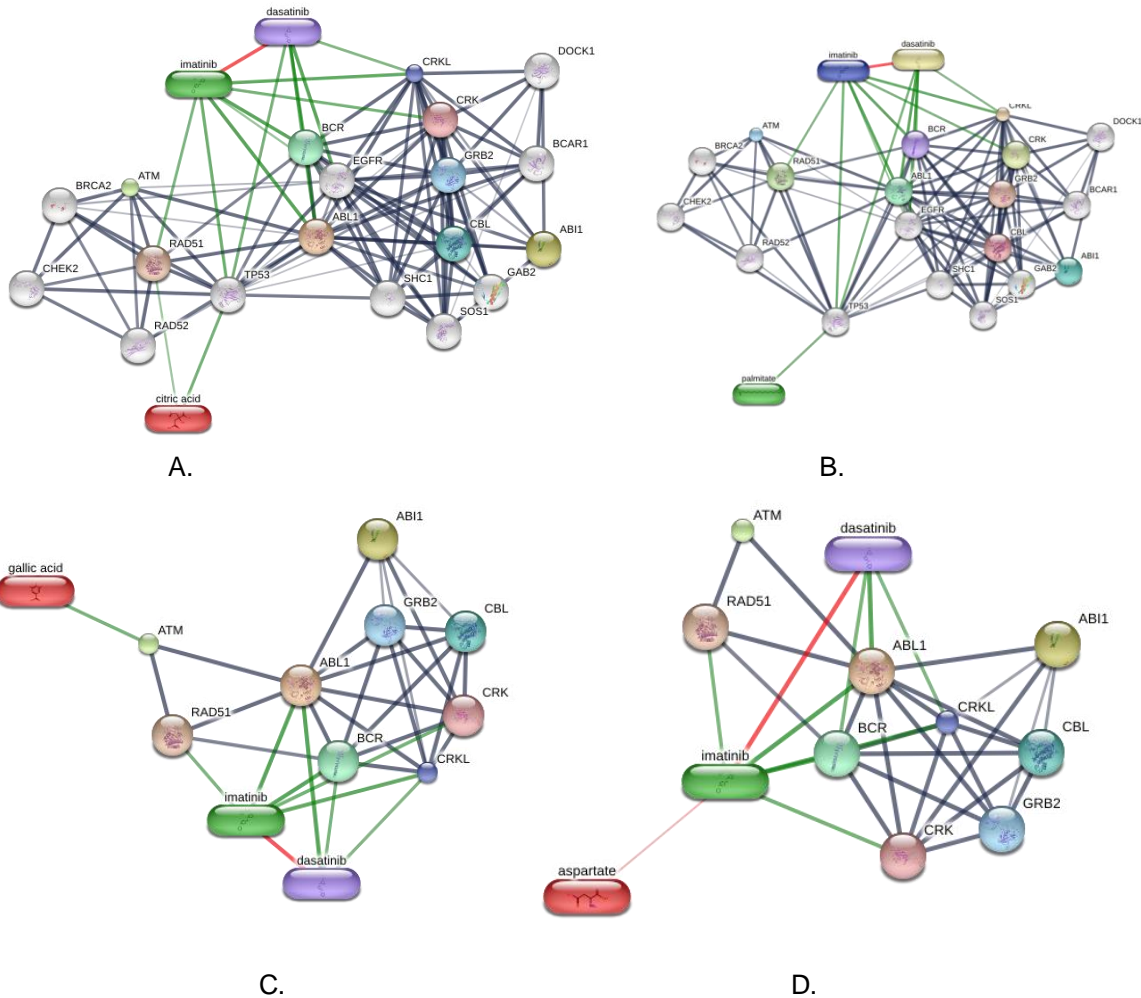


Figura 4. Redes de interacción compuesto químico-proteína. A. Ácido cítrico presente en Esperanza. B. Ácido palmítico presente en Esperanza. C. Ácido gálico presente en P2Et. D. Ácido Aspártico presente en Esperanza. En la visualización de las interacciones, una línea verde entre el compuesto y la proteína indica una interacción directa, sugiriendo una potenciación de la actividad de ambos al actuar en conjunto. Por el contrario, una línea de color rojo representa una interacción inhibitoria o una disminución de la actividad, así mismo, las líneas grises representan interacciones basadas en evidencia experimental y asociaciones de bases de datos. Las formas rectangulares repres entan a los compuestos químicos y las formas circulares corresponden a las proteínas.

En resumen, a pesar de que los compuestos que se analizaron no tienen una interacción directa con la proteína ABL1, si presentan conexiones con proteínas como p53 y ATM que pueden tener un impacto en el ciclo celular y en la apoptosis. Entonces, teniendo en cuenta los antecedentes, Esperanza podría modular la proliferación mediante la proteína p53 mientras que P2Et activa ATM, favoreciendo la muerte celular ante daño irreparable en el ADN. Por otro lado, la interacción negativa entre el ácido aspártico (presente en Esperanza) e imatinib, indica que ciertos compuestos podrían llegar a afectar su eficacia.

3.4 *P. nigrum* no afecta la citotoxicidad del imatinib en la línea K62

Finalmente, tras confirmar la alta actividad citotóxica del imatinib sobre las células K562, y considerando que algunos de los extractos evaluados reducen la expresión del oncogén *BCR-ABL1*, así como la posible interacción directa del aspartato presente en Esperanza con este fármaco, nos propusimos evaluar la capacidad de todos los extractos para potenciar o modificar el efecto citotóxico del imatinib mediante ensayos de sinergia. Como resultados, se evidenció que al tratar las células exclusivamente con imatinib la viabilidad celular promedio fue de 45,13%. Al evaluar los extractos individuales, se obtuvieron los siguientes resultados: con Esperanza la viabilidad fue del 86,73%, con P2Et del 33,12 %, con *T. usneoides* del 87,52% y con *P. nigrum* del 57,09%. Los ensayos de interacción analizados en la

plataforma Synergy Finder, mostraron lo siguiente, al combinar imatinib con Esperanza, la viabilidad celular fue del 84,04 %, con un ZIP score de -22,82 (Figura 5A); al combinarlo con P2Et, la viabilidad fue del 31,69 %, con un ZIP score de -15,80 (Figura 5B); y con *T. usneoides*, la viabilidad fue del 61,10 %, con un ZIP score de -25,67 (Figura 5C). Todos los ZIP score obtenidos para estas combinaciones fueron <10, lo que indica un efecto antagonista entre los tres extractos y el fármaco. Por lo tanto, estas combinaciones no solo no potencian el efecto de imatinib, sino que podrían disminuir su eficacia. En contraste, al combinar *P. nigrum* e imatinib, la viabilidad celular resultante fue del 46,45 %, y el análisis con el modelo ZIP arrojó un ZIP score de $-7,1 \pm 2,27$ (Figura 5D). Este valor sugiere un comportamiento aditivo entre ambos tratamientos, indicando que *P. nigrum* no reduce, sino que mantiene el efecto citotóxico de imatinib. Estos resultados indican que el uso de los extractos con imatinib requiere una evaluación más profunda para comprender los mecanismos de interacción y posibles implicaciones terapéuticas.

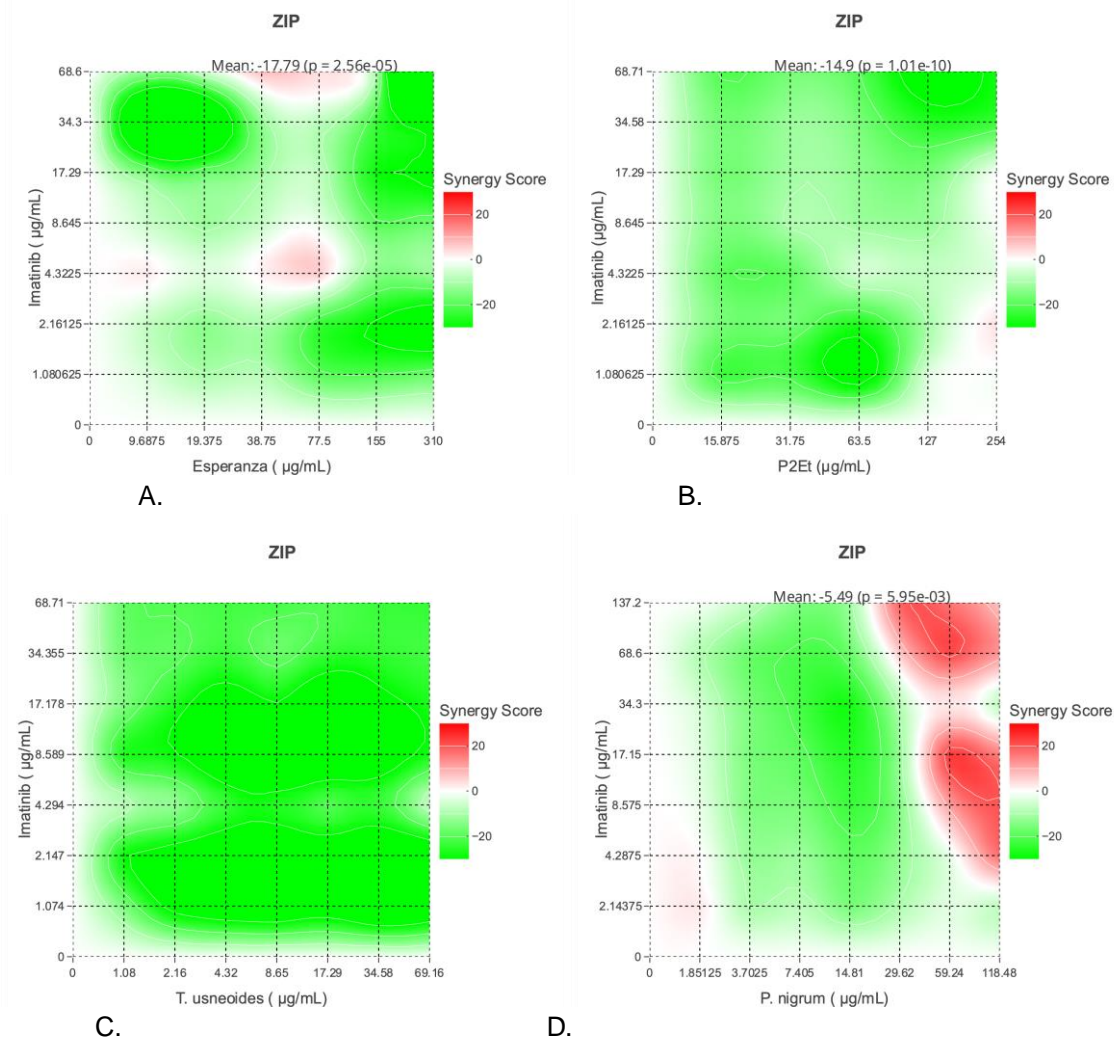


Figura 5. Gráfico 2D de interacción sinérgica. A. Esperanza. B. P2Et. C. *T. usneoides*. D. *P. nigrum*. El color verde representa menor mortalidad y el color rojo representa mayor mortalidad.

4. Discusión

La activación de oncogenes potencia la señalización intracelular, favoreciendo así, el desarrollo de un fenotipo tumorigénico caracterizado por proliferación descontrolada, evasión de la apoptosis y resistencia al estrés celular, lo que los convierte en blancos terapéuticos ampliamente estudiados (3). En este trabajo, evaluamos el efecto de extractos naturales con actividad antitumoral previamente evidenciada en nuestro grupo (33,37,39,41) en la modulación de la expresión del oncogén *BCR-ABL1*. Los resultados demuestran que Esperanza, rica en aminoácidos; P2Et, enriquecido en compuestos fenólicos; y *Piper nigrum*, cuyo extracto contiene principalmente piperinas, reducen la expresión del oncogén *BCR-ABL1* en la línea celular K562. Esta disminución de la expresión génica podría traducirse en una menor producción de la proteína oncogénica, reduciendo su actividad fosforilativa en vías de

señalización implicadas en la proliferación celular, favoreciendo así la inhibición del crecimiento tumoral. Por otra parte, *T. usneoides*, que está compuesto principalmente por triterpenos, aumenta la expresión del oncogén *BCR-ABL1*. El tratamiento con *T. usneoides* incrementa la producción de ROS (38). Este aumento de ROS puede activar mecanismos celulares de respuesta al estrés, incluyendo la regulación génica adaptativa, lo que explicaría el aumento en la expresión del oncogén *BCR-ABL1*. Sin embargo, esta sobreexpresión, lejos de ser protectora, podría representar un intento fallido de la célula por mantener su viabilidad, lo que finalmente la conduce hacia un punto de

Estudios recientes demuestran que diversos extractos y compuestos aislados derivados de plantas tienen la capacidad de modular de *BCR-ABL1*. Hoang Thanh Chi *et al.* (2022), reportaron que un extracto metanólico de *Artemisia vulgaris*, rico en flavonoides (un tipo de compuesto fenólico), reduce la expresión de *BCR-ABL1* en K562 (54). De manera similar, Yong Guo, *et al.* (2015), evidenciaron que la curcumina, compuesto bioactivo de *Curcuma longa* y caracterizado por su elevada concentración de compuesto fenólicos y terpenos, suprime la expresión de *BCR-ABL1* en la línea celular SUP-B15, un modelo de LLA. Esta disminución se asocia con la inhibición de vías de señalización como PI3K/AKT/mTOR e inducción a apoptosis (55). Al igual que *BCR-ABL1*, otros oncogenes implicados en la leucemogénesis también pueden ser regulados por extractos naturales. Un ejemplo relevante es *FLT3*, receptor tirosina quinasa fundamental para la diferenciación hematopoyética (56). Ly Kim Thi Bui *et al.* (2013) demostraron que fenoles del té verde, como la epigalocatequina-3-galato (EGCG), la epigalocatequina (EGC) y la epicatequina-3-galato (ECG), son capaces de reducir la expresión de *FLT3*. Esta inhibición se asocia con una disminución en la activación de moléculas clave en cascadas de señalización celular como MAPK, AKT y STAT5, lo que sugiere que la modulación de *FLT3* podría contribuir a la inhibición de estas vías promotoras de la supervivencia y proliferación celular (56).

Por otra parte, además de modular la expresión del oncogén, los extractos naturales también pueden afectar directamente la actividad y función de oncoproteínas (57). Aunque en nuestro análisis *in silico* no se identificaron compuestos con interacción directa con ABL1, otros estudios han reportado efectos inhibitorios sobre esta y otras proteínas clave en la señalización oncogénica inducida por BCR-ABL1. Por ejemplo, Ahmadu A. *et al.* (2021) estudiaron la corteza de *Acacia auriculiformis*, de la cual aislaron un triterpeno denominado betulina, ampliamente investigado por sus propiedades anticancerígenas, antivirales, antimicrobianas y antiinflamatorias (58) En su estudio, la betulina logró reducir en un 79% la actividad de la quinasa ABL1, lo que a su vez disminuyó la fosforilación de proteínas relacionadas con la vía de señalización MAPK/ERK. Esta inhibición se tradujo en una reducción significativa de la proliferación celular, evidenciando el potencial de este compuesto como modulador de rutas clave en la LMC (58). También, el extracto de *Trifolium rapens* (trébol blanco), rico en flavonoides, muestra un fuerte efecto antileucémico. Su acción se centra en la inhibición de BCR-ABL1, bloqueando la fosforilación en Tyr177 y Tyr247, que son residuos de tirosina en la oncoproteína, lo que reduce la actividad de STAT5 y AKT, que son esenciales para la proliferación celular. Además, activa la vía de p38, favoreciendo la apoptosis (59).

Nuestros resultados demuestran que el ácido cítrico y el ácido palmítico, componentes del extracto Esperanza, interactúan con la proteína p53, mientras que el ácido gálico, presente en P2Et, mostró afinidad por la proteína ATM. Ambas proteínas son reguladores centrales de la respuesta al daño en el ADN y de la inducción de apoptosis. Estos hallazgos sugieren que dichos compuestos podrían contribuir a la actividad antitumoral observada mediante la modulación de rutas moleculares que actúan en niveles posteriores a la activación del oncogén BCR-ABL1. En este contexto, la activación de p53 y ATM podría contrarrestar los efectos oncogénicos de BCR-ABL1, promoviendo mecanismos de detención del ciclo celular, reparación del ADN o muerte celular programada, lo que refuerza el potencial antitumoral de estos extractos como coadyuvantes en el tratamiento de leucemias (60,61).

Por otro lado, Kantorn Charoensedtasin, *et al.* (2024), realizaron un análisis bioinformático en la plataforma STITCH 4 donde identificaron 18 proteínas como posibles blancos de piperina, un compuesto bioactivo de pimienta negra, en células leucémicas. Entre estas proteínas como NF- κ B1 e IL-6, las cuales están involucradas en procesos clave como la inflamación, proliferación celular y supervivencia tumoral. Estas vías de señalización frecuentemente están desreguladas en leucemias positivas para BCR-ABL1, sugiriendo que la piperina podría complementar terapias dirigidas contra este oncogén. Asimismo, se identificaron interacciones con proteínas clave como mTOR, ULK1, que regulan la autofagia; así como p21 y CDK2, que participan en el control del ciclo celular y la senescencia, mostrando su potencial en la regulación del crecimiento y supervivencia celular en el contexto de la enfermedad ocasionada por BCR-ABL1 (62).

El uso de terapias coadyuvantes con imatinib podría ayudar a minimizar el desarrollo de resistencia, por lo que nosotros indagamos los efectos citotóxicos del fármaco en combinación con los cuatro extractos (40,63). Observamos que Esperanza, P2Et y *T. usneoides* presentan un comportamiento antagonista al combinarse con imatinib, reduciendo su efecto citotóxico sobre las células K562. El análisis *in silico* mostró que el ácido aspártico, presente en Esperanza, podría disminuir la actividad del fármaco, lo cual explicaría en parte la reducción de su eficacia citotóxica. En el caso del extracto P2Et, caracterizado por su reconocida capacidad antioxidante (64), este efecto podría contrarrestar el mecanismo de acción del imatinib, que incluye la inducción de estrés oxidativo como estrategia para promover la muerte celular (65) esta capacidad del P2Et para modular negativamente los niveles ROS podría ser responsable de la interacción antagonista observada. En el caso de *T. usneoides*, tiene efecto activador sobre STAT5, un factor de transcripción involucrado en la proliferación celular y en la expresión de genes como los de *BCL-XL* y *MYC*, que promueven la supervivencia celular. *BCL-XL* es una proteína antiapoptótica que inhibe la muerte celular, mientras que *MYC* es un oncogén que impulsa la proliferación y puede contribuir a la resistencia de la apoptosis. Dado que imatinib induce apoptosis para ejercer su efecto terapéutico, la activación de STAT5 por *T. usneoides* podría contrarrestar la acción de imatinib, explicando así su comportamiento antagonista en los ensayos de sinergia. Por otro lado, *P. nigrum* presenta un efecto aditivo con imatinib y se ha demostrado que puede inducir apoptosis en modelos tumorales de melanoma B16-F10 y carcinoma mamario 4T1 mediante la activación de la vía de la caspasa-3 (41). Mientras imatinib inhibe la proteína tirosina quinasa BCR-ABL1, el extracto actúa inhibiendo vías de señalización como PI3K/Akt/mTOR, que están hiperactivas en la LMC. Esta doble inhibición podría generar un efecto aditivo, contribuyendo a mantener eficacia del tratamiento con imatinib.

Aunque este trabajo presenta algunas limitaciones, como la evaluación de un único oncogén, BCR-ABL1, en un modelo celular específico (K562) y en un único punto temporal, así como el uso de una sola plataforma bioinformática para los análisis *in silico* de interacciones entre compuestos y proteínas, dichas restricciones también abren múltiples oportunidades para ampliar el alcance de la investigación en futuras etapas. Como perspectivas, sería relevante incluir otros modelos de leucemia, como la LLA con BCR-ABL1, así como explorar la modulación de otros oncogenes clave involucrados en el desarrollo y progresión de neoplasias hematológicas y tumores sólidos. Igualmente, realizar estudios de cinética de expresión génica permitiría una comprensión más completa de la dinámica celular inducida por los extractos y su impacto en distintos momentos del tratamiento. De forma complementaria, debido al efecto aditivo observado entre el imatinib y *P. nigrum*, resultaría interesante evaluar esta combinación también regula negativamente la expresión de *BCR-ABL1*, lo cual podría explicar dicha sinergia desde un punto de vista mecanístico. Finalmente, un aspecto especialmente prometedor consiste en la evaluación del efecto de estos extractos sobre

líneas celulares resistentes a *TKIs*, dado que la resistencia a estos fármacos constituye una de las principales barreras terapéuticas en LMC. Explorar si los extractos naturales pueden restaurar la sensibilidad a los *TKIs* o actuar de forma independiente sobre vías oncogénicas alternativas abriría nuevas posibilidades para el desarrollo de terapias combinadas o alternativas frente a la resistencia adquirida.

5. Conclusiones

Los resultados de este estudio indican que los extractos de *Esperanza*, *P2Et* y *P. nigrum* reducen la expresión del oncogén *BCR-ABL1* en la línea celular K562, mientras que *T. usneoides* la incrementa. Dado que *BCR-ABL1* es un evento molecular clave que desencadena la malignidad, resulta interesante observar que cualquier alteración en su expresión, ya sea su disminución o aumento, puede generar un efecto negativo en la célula. Esto sugiere que el desequilibrio en la regulación de este oncogén podría estar relacionado con la actividad antileucémica de estos extractos. Los análisis *in silico* no indicaron interacciones directas entre los compuestos bioactivos de los extractos y la proteína *ABL1*. Sin embargo, se identificaron interacciones indirectas con proteínas clave como *p53* y *ATM*, las cuales desempeñan un papel fundamental en la apoptosis y la reparación del ADN. Estos hallazgos sugieren que, aunque los extractos no actúan directamente sobre la oncoproteína, pueden modular proteínas *upstream* o *downstream* que regulan su actividad, lo que podría explicar, al menos en parte, su efecto antiproliferativo o citotóxico. Además, nuestro extracto de *P. nigrum* no interfirió con la actividad citotóxica de imatinib, lo que lo convierte en un candidato prometedor para su evaluación en terapias coadyuvantes. Todos estos hallazgos destacan el potencial antileucémico de los extractos estudiados, el cual podría estar mediado, en parte, por la modulación de la expresión del oncogén *BCR-ABL1* o de proteínas asociadas a su regulación. Además, este estudio abre nuevas líneas de investigación para explorar en mayor profundidad los mecanismos antitumorales de *Esperanza*, *P2Et* y *P. nigrum*, los cuales podrían ser validados en otros modelos tumorales, incluyendo líneas celulares resistentes a *TKIs* o modelos *in vivo*, con el fin de evaluar su aplicabilidad en estrategias terapéuticas combinadas.

6. Referencias bibliográficas

1. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Vol. 12, Cancer Discovery. 2022.
2. Brown G. Oncogenes, Proto-Oncogenes, and Lineage Restriction of Cancer Stem Cells. Int J Mol Sci [Internet]. 2021;22(18). Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/18/9667>
3. Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Mastoraki A, Garmpis N, et al. Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: A review. Vol. 40, Anticancer Research. 2020.
4. Grzes M, Oron M, Staszczak Z, Jaiswar A, Nowak-Niezgoda M, Walerych D. A driver never works alone—interplay networks of mutant *p53*, *MYC*, *RAS*, and other universal oncogenic drivers in human cancer. Vol. 12, Cancers. 2020.
5. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. Vol. 36, Leukemia. 2022.
6. Komorowski L, Fidyk K, Patkowska E, Firczuk M. Philadelphia chromosome-positive leukemia in the lymphoid lineage—similarities and differences with the myeloid lineage and specific vulnerabilities. Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. 2020.
7. El-Tanani M, Nsairat H, Matalka II, Lee YF, Rizzo M, Aljabali AA, et al. The impact of the *BCR-ABL* oncogene in the pathology and treatment of chronic myeloid leukemia. Vol. 254, Pathology Research and Practice. 2024.
8. Amarante-Mendes GP, Rana A, Datoguia TS, Hamerschlag N, Brumatti G. *BCR-ABL1* Tyrosine Kinase Complex Signaling Transduction: Challenges to Overcome Resistance in Chronic Myeloid Leukemia. Pharmaceuticals. 2022;14(1).
9. Nisar S, Hashem S, Macha MA, Yadav SK, Muralitharan S, Therachiyil L, et al. Exploring Dysregulated Signaling Pathways in Cancer. Curr Pharm Des. 2020;26(4).
10. Grassi S, Palumbo S, Mariotti V, Liberati D, Guerrini F, Ciabatti E, et al. The *WNT* pathway is relevant for the *BCR-ABL1*-independent resistance in chronic myeloid leukemia. Front Oncol. 2019;9.
11. Pottier C, Fresnais M, Gilon M, Jérusalem G, Longuespée R, Sounni NE. Tyrosine kinase inhibitors in cancer: Breakthrough and challenges of targeted therapy. Vol. 12, Cancers. 2020.

12. Upadhyay V, Raval A, Shah K, Shah FD, Rawal R. A Prognostic and Predictive Study of BCR-ABL Expression Based on Characterization of Fusion Transcripts. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2020;35(1).
13. Yang Y, Li S, Wang Y, Zhao Y, Li Q. Protein tyrosine kinase inhibitor resistance in malignant tumors: molecular mechanisms and future perspective. Vol. 7, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022.
14. Loscocco F, Visani G, Galimberti S, Curti A, Isidori A. BCR-ABL independent mechanisms of resistance in chronic myeloid leukemia. Vol. 9, *Frontiers in Oncology*. 2019.
15. Braun TP, Eide CA, Druker BJ. Response and Resistance to BCR-ABL1-Targeted Therapies. Vol. 37, *Cancer Cell*. 2020.
16. Ministerio de Salud y Protección social, Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud - IETS. Posicionamiento terapéutico para el tratamiento farmacológico de la leucemia mieloide crónica con inhibidores de la tirosina quinasa [Internet]. 2021. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VP/RBC/ipt-leucemia-mieloide-cronica-extenso-2021.pdf>
17. Shyam Sunder S, Sharma UC, Pokharel S. Adverse effects of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy: pathophysiology, mechanisms and clinical management. Vol. 8, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023.
18. Pezzani R, Salehi B, Vitalini S, Iriti M, Zuñiga FA, Sharifi-Rad J, et al. Synergistic effects of plant derivatives and conventional chemotherapeutic agents: An update on the cancer perspective. Vol. 55, *Medicina (Lithuania)*. 2019.
19. Chandra S, Gahlot M, Choudhary AN, Palai S, de Almeida RS, de Vasconcelos JEL, et al. Scientific evidences of anticancer potential of medicinal plants. Vol. 2, *Food Chemistry Advances*. 2023.
20. Singh A, Prakash A, Choudhary R. Bioactive Components Having Antimicrobial and Anticancerous Properties: A Review. In: *Bioactive Components: A Sustainable System for Good Health and Well-Being*. 2022.
21. Siddiqui AJ, Jahan S, Singh R, Saxena J, Ashraf SA, Khan A, et al. Plants in Anticancer Drug Discovery: From Molecular Mechanism to Chemoprevention. Vol. 2022, *BioMed Research International*. 2022.
22. Situmorang PC, Ilyas S, Nugraha SE, Syahputra RA, Nik Abd Rahman NMA. Prospects of compounds of herbal plants as anticancer agents: a comprehensive review from molecular pathways. Vol. 15, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media SA; 2024.
23. Shrihastini V, Muthuramalingam P, Adarshan S, Sujitha M, Chen JT, Shin H, et al. Plant derived bioactive compounds, their anti-cancer effects and in silico approaches as an alternative target treatment strategy for breast cancer: An updated overview. Vol. 13, *Cancers*. 2021.
24. Maher T, Raus RA, Daddiouaissa D, Ahmad F, Adzhar NS, Latif ES, et al. Medicinal plants with anti-leukemic effects: A review. Vol. 26, *Molecules*. 2021.
25. Horvath Z, Saiko P, Illmer C, Madlener S, Hoechtl T, Bauer W, et al. Synergistic action of resveratrol, an ingredient of wine, with Ara-C and tiazofurin in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Exp Hematol*. 2005;33(3).
26. Chang YS, Lu KH, Lee HJ, Huang ML, Lai SC, Ho YL, et al. Synergistic apoptosis-inducing antileukemic effects of arsenic trioxide and mucuna macrocarpa stem extract in human leukemic cells via a reactive oxygen species-dependent mechanism. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;2012.
27. Dai H, Deng HB, Wang YH, Guo JJ. Resveratrol inhibits the growth of gastric cancer via the wnt/ β -catenin pathway. *Oncol Lett*. 2018;16(2).
28. Silva JPB, Do Nascimento SCM, Okabe DH, Pinto ACG, De Oliveira FR, Da Paixão TP, et al. Antimicrobial and anticancer potential of *Petiveria alliacea* L. (Herb to “Tame the Master”): A review. Vol. 12, *Pharmacognosy Reviews*. 2018.
29. Rojas L, Pardo-Rodriguez D, Urueña C, Lasso P, Arévalo C, Cala MP, et al. Effect of *Petiveria alliacea* Extracts on Metabolism of K562 Myeloid Leukemia Cells. *Int J Mol Sci*. 2023 Dec 1;24(24).

30. Hernández JF, Urueña CP, Cifuentes MC, Sandoval TA, Pombo LM, Castañeda D, et al. A *Petiveria alliacea* standardized fraction induces breast adenocarcinoma cell death by modulating glycolytic metabolism. *J Ethnopharmacol.* 2014;153(3).
31. Hernández JF, Urueña CP, Sandoval TA, Cifuentes MC, Formentini L, Cuezva JM, et al. A cytotoxic *Petiveria alliacea* dry extract induces ATP depletion and decreases β -F1-ATPase expression in breast cancer cells and promotes survival in tumor-bearing mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2017;27(3).
32. Arévalo C, Carlosama C, Rojas L, Cala MP, Hamon MP, Friguet B, et al. Modulation of Tumor Metabolism in Acute Leukemia by Plant-Derived Polymolecular Drugs and Their Effects on Mitochondrial Function. *Molecules* [Internet]. 2025 Apr 16;30(8):1783. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/30/8/1783>
33. Murillo N, Lasso P, Urueña C, Pardo-Rodríguez D, Ballesteros-Ramírez R, Betancourt G, et al. *Petiveria alliacea* Reduces Tumor Burden and Metastasis and Regulates the Peripheral Immune Response in a Murine Myeloid Leukemia Model. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 [cited 2025 Jan 16];2023:12972. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms241612972>
34. Urueña C, Mancipe J, Hernandez J, Castañeda D, Pombo L, Gomez A, et al. Gallotannin-rich *Caesalpinia spinosa* fraction decreases the primary tumor and factors associated with poor prognosis in a murine breast cancer model. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13.
35. Prieto K, Cao Y, Mohamed E, Trillo-Tinoco J, Sierra RA, Urueña C, et al. Polyphenol-rich extract induces apoptosis with immunogenic markers in melanoma cells through the ER stress-associated kinase PERK. *Cell Death Discov.* 2019;5(1).
36. Arévalo Olaya CM. Evaluación del efecto de los fitomedicamentos derivados de *Caesalpinia spinosa* y *Petiveria alliacea* en el metabolismo energético en diferentes modelos celulares [Internet]. 2024. Available from: <http://hdl.handle.net/10554/68693>
37. Ballesteros-Ramírez R, Durán MI, Fiorentino S. Genotoxicity and mutagenicity assessment of a standardized extract (P2Et) obtained from *Caesalpinia spinosa*. *Toxicol Rep.* 2021;8.
38. Lasso P, Rojas L, Arévalo C, Urueña C, Murillo N, Barreto A, et al. *Tillandsia usneoides* Extract Decreases the Primary Tumor in a Murine Breast Cancer Model but Not in Melanoma. *Cancers (Basel).* 2022;14(21).
39. Rojas L, Lasso P, Murillo N, Costa GM, Fiorentino S. Chemical composition and biological activity of ethanolic leaf extract from *Tillandsia usneoides* in a murine model of acute myeloid leukemia. *Advances in Traditional Medicine.* 2025;
40. Arévalo CM, Cruz-Rodríguez N, Quijano S, Fiorentino S. Plant-derived extracts and metabolic modulation in leukemia: a promising approach to overcome treatment resistance. Vol. 10, *Frontiers in Molecular Biosciences.* 2023.
41. Lasso P, Rojas L, Arévalo C, Urueña C, Murillo N, Nossa P, et al. *Piper nigrum* extract suppresses tumor growth and enhances the antitumor immune response in murine models of breast cancer and melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy.* 2023;72(10).
42. K-562 - CCL-243 | ATCC [Internet]. [cited 2025 Jan 16]. Available from: <https://www.atcc.org/products/ccl-243>
43. PROYECTO DE PROSPECTO Novartis GLIVEC® IMATINIB Comprimidados recubiertos.
44. Savage DG, Antman KH. Imatinib Mesylate — A New Oral Targeted Therapy. *New England Journal of Medicine.* 2002;346(9).
45. Prieto K, Arévalo C, Lasso P, Carlosama C, Urueña C, Fiorentino S, et al. Plant extracts modulate cellular stress to inhibit replication of mouse Coronavirus MHV-A59. *Heliyon.* 2024;10(1).
46. Sandoval Medina TA. Evaluación de la actividad antitumoral de la fracción p2et obtenida de *caesalpinia spinosa* y los compuestos aislados de la misma, en el control de las células madre tumorales en un modelo de cáncer de seno metastásico [Internet]. Pontificia Universidad Javeriana; 2016. Available from: <http://hdl.handle.net/10554/19652>
47. von Mering C, Jensen LJ, Snel B, Hooper SD, Krupp M, Foglierini M, et al. STRING: Known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 1;33(DATABASE ISS.).

-
48. Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T. SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(W1).
 49. Bhanumathy KK, Balagopal A, Vizeacoumar FS, Vizeacoumar FJ, Freywald A, Giambra V. Review protein tyrosine kinases: Their roles and their targeting in leukemia. *Cancers (Basel).* 2021;13(2).
 50. Qian S, Wei Z, Yang W, Huang J, Yang Y, Wang J. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. Vol. 12, *Frontiers in Oncology.* 2022.
 51. Kruiswijk F, Labuschagne CF, Vousden KH. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat Rev Mol Cell Biol [Internet].* 2015;16(7):393–405. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrm4007>
 52. Roberts NJ, Klein AP. Genome-wide sequencing to identify the cause of hereditary cancer syndromes: With examples from familial pancreatic cancer. *Cancer Lett [Internet].* 2013;340(2):227–33. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383512006556>
 53. Castañeda DM, Pombo LM, Urueña CP, Hernandez JF, Fiorentino S. A gallotannin-rich fraction from *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze displays cytotoxic activity and raises sensitivity to doxorubicin in a leukemia cell line. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12.
 54. Chi HT, Ly BTK. *Artemisia vulgaris* inhibits BCR/ABL and promotes apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *Biomed Rep.* 2022;17(6).
 55. Guo Y, Li Y, Shan Q, He G, Lin J, Gong Y. Curcumin potentiates the anti-leukemia effects of imatinib by downregulation of the AKT/mTOR pathway and BCR/ABL gene expression in Ph⁺ acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2015;65.
 56. Ly BTK, Chi HT, Yamagishi M, Kano Y, Hara Y, Nakano K, et al. Inhibition of FLT3 Expression by Green Tea Catechins in FLT3 Mutated-AML Cells. *PLoS One.* 2013;8(6).
 57. Tisi R, Gaponenko V, Vanoni M, Sacco E. Natural products attenuating biosynthesis, processing, and activity of ras oncoproteins: State of the art and future perspectives. Vol. 10, *Biomolecules.* 2020.
 58. Ahmadu AA, Delehouzé C, Haruna A, Mustapha L, Lawal BA, Udobre A, et al. Betulin, a newly characterized compound in acacia auriculiformis bark, is a multi-target protein kinase inhibitor. *Molecules.* 2021;26(15).
 59. Sarno F, Pepe G, Termolino P, Carafa V, Massaro C, Merciai F, et al. *Trifolium Repens* blocks proliferation in chronic myelogenous leukemia via the BCR-ABL/STAT5 pathway. *Cells.* 2020;9(2).
 60. Aki T, Uemura K. Cell death and survival pathways involving ATM protein kinase. Vol. 12, *Genes.* 2021.
 61. Sullivan KD, Palaniappan V V, Espinosa JM. ATM regulates cell fate choice upon p53 activation by modulating mitochondrial turnover and ROS levels. *Cell Cycle.* 2015;14(1).
 62. Charoensedtasin K, Kheansaard W, Roytrakul S, Tanyong D. Piperine, a black pepper compound, induces autophagy and cellular senescence mediated by NF- κ B and IL-6 in acute leukemia. *BMC Complement Med Ther.* 2024 Dec 1;24(1):343.
 63. Yin Z, Huang G, Gu C, Liu Y, Yang J, Fei J. Discovery of Berberine that Targetedly Induces Autophagic Degradation of both BCR-ABL and BCR-ABL T315I through Recruiting LRSAM1 for Overcoming Imatinib Resistance. *Clinical Cancer Research.* 2020;26(15).
 64. Arévalo-Ferrin JJ, García-Ortiz JA, Arévalo-Olaya CM, Quijano-Gómez SM, Fiorentino-Gómez S, Rodríguez-Pardo VM. Plant-derived extracts P2Et and Anamu-SC affect NO and ROS levels in leukemic cells. *Univ Sci (Bogota).* 2023;28(2).
 65. Prieto K, Lozano MP, Urueña C, Alméciga-Díaz CJ, Fiorentino S, Barreto A. The delay in cell death caused by the induction of autophagy by P2Et extract is essential for the generation of immunogenic signals in melanoma cells. *Apoptosis.* 2020;25(11–12).

7. Anexo 1. Protocolo qPCR del oncogén BCR-ABL1 en la línea K562

