

Martínez Corona Helga¹, Cerón Morales Ximena¹, Soto Valladares Ana Guadalupe², Rojo Domínguez Arturo³ y Arregui Mena Ana Leticia³.

¹ Licenciatura en Biología Molecular, ² Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería,

³ Departamento de Ciencias Naturales, Unidad Cuajimalpa, Universidad Autónoma Metropolitana.

heyhmc@gmail.com, anisotovall@gmail.com

Introducción

El cáncer es una enfermedad multifactorial, influenciada por alteraciones genéticas como deleciones, translocaciones y mutaciones, así como por factores epigenéticos; entre éstos la metilación del DNA, regulación por ncRNAs y modificación de histonas [1]. Una de las modificaciones de histonas es la acetilación, mediada por las acetiltransferasas de histonas (HATs) y las desacetilasas de histonas (HDACs). Las HATs promueven regiones hiperacetiladas que están asociadas con la expresión genética, mientras que las HDAC promueven la hipoacetilación asociada al silenciamiento de genes [2]; y por tanto alteran la transcripción de oncogenes y genes supresores de tumores.

Entre los tipos de cáncer, el glioblastoma es un tumor cerebral agresivo y altamente invasivo, con una desalentadora sobrevida a 5 años menor al 5%. Las alteraciones epigenéticas como las modificaciones de histonas son un factor crucial en la patogénesis del glioblastoma. Distintos trabajos de investigación muestran que la inhibición de las HDACs está asociada con un incremento en la efectividad de terapias ya existentes [3]. Debido a esto, se ha buscado el desarrollo de medicamentos que inhiban a las HDACs.

El ácido valproico (AVP) es un fármaco con actividad inhibitoria de HDACs, [4] y se ha reportado una sensibilidad distinta al mismo en las líneas celulares C6 (glioma de rata) y U373 (glioblastoma humano) [5]. Para comprender los efectos diferenciales del AVP en las líneas celulares C6 y U373, en el presente trabajo se evaluó la expresión a nivel de proteínas de las HDACs 2, 3, 4 y 6 tratadas y no tratadas con AVP.

Objetivo

Evaluar la expresión de las HDAC 2, 3, 4 y 6 en las líneas celulares C6 de glioma y U373 de glioblastoma, en presencia y ausencia de tratamiento con ácido valproico.

Métodos

1. Se utilizaron 25 µg de proteínas extraídas de las líneas celulares C6 y U373, respectivamente, para evaluarlas con tratamiento de AVP y sin tratamiento.



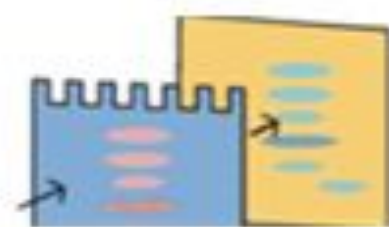
2. Se agregó buffer de carga con β-mercaptoetanol a cada alícuota de proteína.



3. Las alícuotas de proteína se cargaron en geles de poliacrilamida y se corrieron a 100V.



4. Una vez completada la separación, se transfirieron las proteínas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF).



5. Se colocaron los anticuerpos primarios para HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC6 (1:1000) y actina (1:200).



6. Las membranas se dejaron en incubación toda una noche.



7. Se colocaron los anticuerpos secundarios anti-rabbit (1:3000) y anti-mouse (1:10000) a las membranas para incubar durante una hora.



8. Se colocó el sustrato (Lumi-light^{PLUS} Western Blotting Substrate) a las membranas para después revelarlas y fotografiarlas.



Resultados

Las líneas celulares C6 y U373 fueron tratadas con AVP durante 48 h y posteriormente se evaluó su efecto sobre la expresión de las HDAC 2, 3, 4 y 6, se utilizó como control la actina, Figura 1.

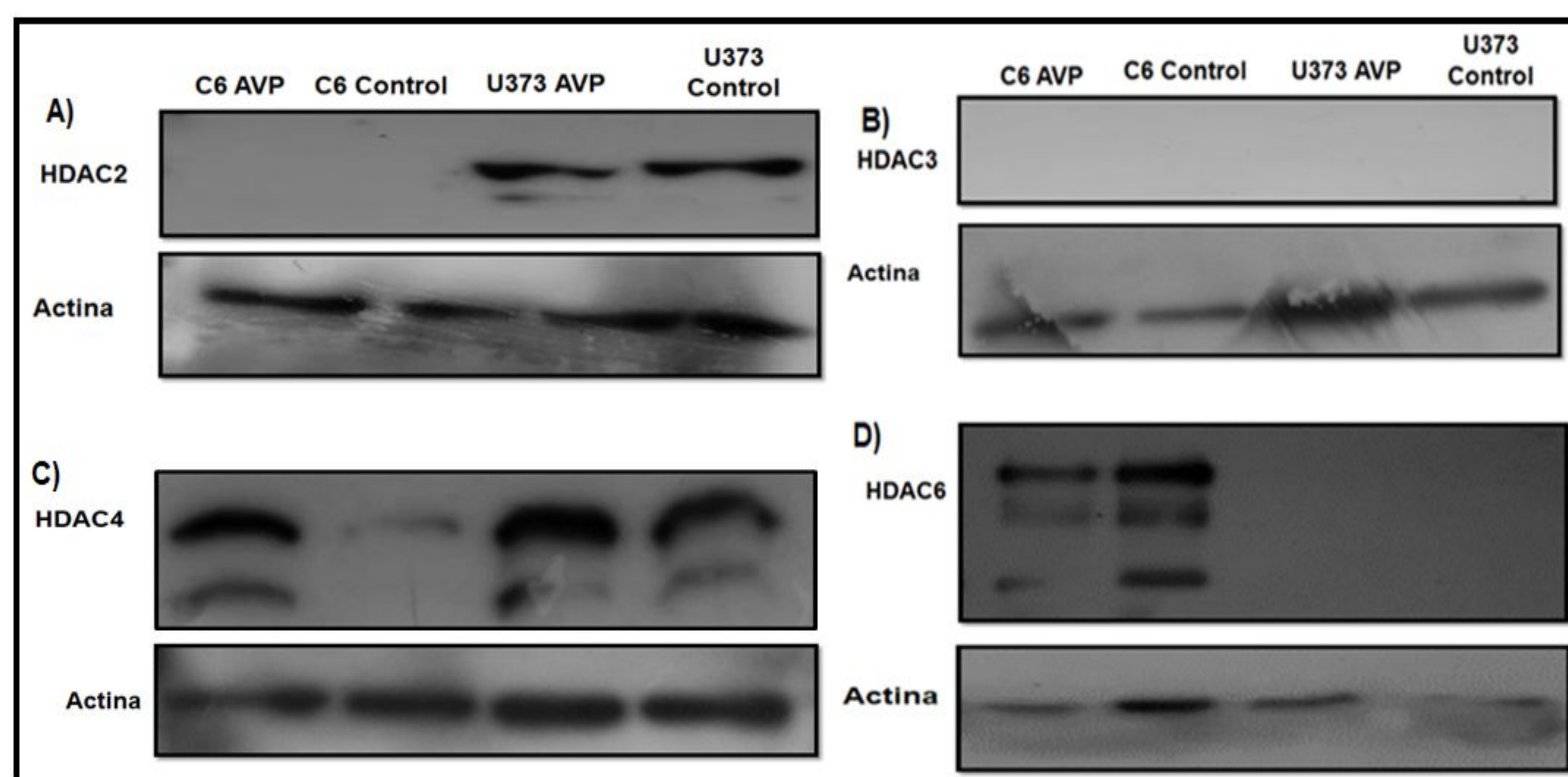


Figura 1. Expresión de HDAC detectada por *western blot* en las líneas celulares C6 y U373, en presencia y ausencia de tratamiento con AVP. **A** HDAC2 (60 kDa). **B** HDAC3 (49 kDa). **C** HDAC4 (140 kDa). **D** HDAC6 (160 kDa). En cada caso se presenta el control respectivo de actina (42 kDa).

Al evaluar la expresión de HDAC2 se observa que sólo se expresa en la línea celular U373 y no se observaron cambios en su expresión en presencia del tratamiento con AVP (Fig.1A); mientras que que HDAC3 no se expresa en ninguna de las líneas celulares (Fig. 1B). En cuanto a la expresión de la proteína HDAC4 se determinó que se expresa en ambas líneas celulares y su expresión disminuye con el tratamiento de AVP (Fig. 1C). Finalmente HDAC6 se expresó únicamente en la línea celular C6 y se observó un incremento de la expresión; para determinar si el incremento que se observa en su expresión con el tratamiento de AVP es real, se evaluará nuevamente (Fig.1D).

Las diferencias en la expresión de las proteínas HDAC2 y HDAC6 en las líneas celulares C6 y U373 pueden deberse a diferencias como la especie de la que provienen, así como el origen y características asociadas a su grado de malignidad. C6 es una línea celular derivada de un glioma de rata, mientras que la línea U373 proviene de un glioblastoma humano grado III. Cabe enfatizar que encontramos una disminución en la expresión de HDAC4 en ambas líneas celulares con AVP, lo cual es interesante investigar como parte de los efectos de este fármaco.

Conclusiones

Se determinó que HDAC2 sólo se expresa en la línea U373; HDAC3 no se expresa en ninguna de las líneas celulares analizadas; HDAC4 se expresa en ambas líneas celulares y disminuye su expresión con el tratamiento de AVP; mientras que HDAC6 sólo se expresó en C6.

Con lo anterior podemos decir que se encontró una expresión diferencial de las HDAC en las líneas celulares C6 y U373, lo cual contribuye a comprender las diferencias en su sensibilidad frente al ácido valproico.

Referencias

- Hassanpour S, Dehghani M. Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*. 2017;4(4):127-129.
- Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular Oncology*. 2007;1(1):19-25.
- Lucio-Eterovic A, *et al.* Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoexpressed in glioblastomas. *BMC Cancer*. 2008;8(1):243.
- West AC, Johnstone RW. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(1):30-39.
- Alpuche-García A, Dávila-González X, Arregui L, Beltrán HI. Novel valproic aminophenol amides with enhanced glial cell viability effect. *RSC Advances*. 2017;7(20):12391-12399.