



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Cuajimalpa

Arregui Mena Ana Leticia arregui.leticia@gmail.com, Cerón Morales Ximena
xceronm@gmail.com, Martínez Corona Helga heyhmc@gmail.com

Proyecto Terminal

Evaluación por Western blot de la efectividad de compuestos derivados del ácido valproico en líneas celulares de glioma

División de Ciencias Naturales e Ingeniería
Licenciatura en Biología Molecular

Ciudad de México a 6 de Abril, 2018

Introducción

Las modificaciones epigenéticas dentro de la cromatina juegan un rol importante en la regulación transcripcional en eucariotes, siendo probablemente la acetilación la marca epigenética de la cual se tenga un mayor entendimiento. La hiper acetilación promueve un incremento en la expresión de ciertos genes mediada por las enzimas histonas acetilasas (HATs); y la hipo acetilación, por medio del aumento de las interacciones iónicas entre el DNA (con carga negativa) y las histonas (con carga positiva) favorece la condensación de la cromatina reduciendo la accesibilidad de la maquinaria transcripcional y llevando a un efecto contrario de represión genética (Ropero et al., 2007; Ruijter et al., 2003; Tang, et al., 2013). La familia de enzimas encargadas de la remoción de los grupos funcionales acetilo en el grupo amino ϵ del residuo de aminoácido lisina de las histonas, además de otras proteínas son las histonas desacetilasas (HDACs). El nivel de acetilación en las histonas está dado por el balance de las actividades catalíticas entre HATs y HDACs, su desbalance está ligado a diversas patologías; el producto de las mutaciones en HDACs está ligada al desarrollo de tumores (Ropero et al., 2007).

En el ser humano se han identificado 18 HDACs diferentes las cuales se han clasificado en cuatro clases (**Tabla 1**).

| Clase I: proteínas tipo 3 Rpd | Clase II: proteínas tipo Hda1 | Clase III: Proteínas tipo Sir2 | Clase IV |
|----------------------------------|---|---|----------|
| HDAC1 HDAC2 HDAC3 HDAC8 | <i>Subclase IIa</i> HDAC4 HDAC5 HDAC9 <i>Subclase IIb</i> HDAC6 HDAC7 HDAC10 | SIRT1 SIRT2 SIRT3 SIRT4 SIRT5 SIRT6 SIRT7 | HDAC11 |

Tabla 1. Clasificación de las HDACs en *Homo sapiens*.

Las HDACs se clasifican de acuerdo a su homología con sus respectivos ortólogos en levadura. (Tang, et al., 2013) Las HDACs de clase I, II y IV dependientes de Zn^{2+} comparten residuos de aminoácidos en un sitio catalítico conservado entre estas clases. (Rao, et al., 2012). Las clase I exhiben una localización nuclear y una expresión homogénea en todos los tejidos, mientras que las HDACs clase II son tejido específicas y pueden ubicarse tanto en el núcleo como en el citoplasma; ambas clases son sensibles al inhibidor tricostatina A (Ropero et al., 2007). Las enzimas clase III son dependientes de NAD^+ (Seto, et al., 2014).

La importancia de las HDACs radica en la influencia que la remoción del grupo acetilo ejerce sobre otros procesos moleculares en las histonas. Además de la ya mencionada regulación transcripcional la acción de las HDACs puede favorecer o desfavorecer las modificaciones post traduccionales de las histonas por otras marcas epigenéticas, como lo son la ubiquitinación, la metilación y sumoilación; más aún por medio del “cross talk” la dinámica de las histonas puede ser influenciada por las HDACs (Seto, et al., 2014).

Se ha encontrado una correlación de anomalías epigenéticas con la patogénesis de varias enfermedades humanas como cánceres, desórdenes metabólicos entre otras enfermedades donde HDACs anormales participan en relaciones fundamentales, lo anterior ha hecho de ellas un blanco clave para el tratamiento de múltiples enfermedades humanas (Tang, et al., 2013) que junto con el desarrollo de inhibidores de HDACs ha impulsado el entendimiento del mecanismo de acción por el cual estas enzimas actúan, generando la disponibilidad de una amplia gama de inhibidores completamente caracterizados que producen efectos como detención del crecimiento celular, diferenciación con o sin apoptosis e incluso pueden llegar a frenar el crecimiento tumoral en animales (Seto, et al., 2014).

Los inhibidores de HDACs se unen al sitio catalítico y actúan como quelantes, capturando al ión zinc localizado en su base, debido a la conservación del sitio catalítico en las distintas HDACs la mayoría de los inhibidores de HDACs actúan de manera poco específica por medio de la inhibición si no de todas las HDACs de varios miembros de una familia (Witt, et al., 2009). Los inhibidores de las HDACs se han clasificado en cuatro clases de acuerdo a su estructura química, (**tabla 2**) (Seto, et al., 2014) .

| Clase I: ácido hidroxámico | Clase II: ácido graso de cadena corta | Clase III: benzamida | Clase IV: péptido cíclico |
|---|---|--|--|
| Tricostatina A (TSA) SAHA (Vorinostat / Zolinza) PDX 101 (Belinostat) SB939 (Pracinostat) LBH589 (Panobinostat) | Ácido valproico Ácido butírico AN-9 (Pivanex) | CI-994 MS-275 (SNDX-275/Entiostat) MGCD0103 | FK228 (Romidepsin/Istodax) Largozole CHAP31 |

Tabla 2. Clasificación de los inhibidores de las HDACs.

VPA

Dentro de la clase II de inhibidores de las HDACs, se encuentra el ácido valproico. El ácido valproico (VPA) es una droga altamente utilizada en terapias a largo plazo para trastornos de epilepsia y desordenes de bipolaridad (Göttlicher et al., 2001). Actualmente, se ha estudiado en gran manera su uso en terapias de cáncer debido a su capacidad para imitar al inhibidor de desacetilasa tricostatina A (TSA), causando como resultado una hiper acetilación de histonas (Phiel et al., 2001). En este proyecto se han utilizado compuestos derivados del ácido valproico como inhibidores de desacetilasa de histonas en una nueva propuesta para combatir el cáncer de las células gliales (Alpuche-García et al., 2017).

Las histonas de clase I y II, también llamadas histonas clásicas se encuentran involucradas con un rol principal en el desarrollo del cáncer (Tang, et al., 2013). El VPA es un inhibidor selectivo de HDACs de clase I por lo que, al igual que otros compuestos inhibidores de HDACs, induce la diferenciación de células de carcinoma, células hematopoyéticas progenitoras transformadas y blastos leucémicos de pacientes con leucemia mieloide aguda. Además de actuar como un regulador negativo selectivo para isoenzimas de HDAC2 en concentraciones terapéuticas por medio de la inhibición de tanto la actividad catalítica de HDAC como la inducción de degradación específica de HDAC2 (Krämer et al., 2003).

En específico a concentraciones milimolares el VPA es capaz de inhibir a las HDACs de clase I: 1, 2, 3 y la 8, pero es inefectivo con las HDACs de clase II. Aunque actualmente se está probando su actividad en varios ensayos de cáncer, siendo su mayor desventaja la de requerir concentraciones altas para lograr tener una actividad anti tumoral (Witt et al., 2009). Utilizamos *Western blot* con el fin de encontrar entre siete compuestos derivados del VPA, los cuales fueron sintetizados previamente, un fármaco potencial con mayor actividad que el VPA para el tratamiento del cáncer, para lo cual se extrajeron las proteínas de las líneas celulares U-373 y C6, y haciendo uso de la interacción específica anticuerpo-antígeno se utilizó el anticuerpo anti H3 Lys9/Lys14 acetilada y actina para comprobar la función de los compuestos como inhibidores de desacetilasa de histona (Alpuche-García et al., 2017). Los siete compuestos que se utilizaron son los siguientes:

1. VA₁: *N*-(2-Hidroxifenil)-2-propilpentanamida

2. VA₂: *N*-(2-Hidroxi-5-metilfenil)-2-propilpentanamida
3. VA₃: *N*-(2-Hidroxi-4-metilfenil)-2-propilpentanamida
4. VA₄: *N*-(2-Hidroxi-5-nitrofenil)-2-propilpentanamida
5. VA₅: *N*-(2-Hidroxi-4-nitrofenil)-2-propilpentanamida
6. VA₆: *N*-(2-Hidroxi-5-clorofenil)-2-propilpentanamida
7. VA₇: *N*-(2-Hidroxi-4-clorofenil)-2-propilpentanamida

Para estos compuestos, las concentraciones requeridas para alcanzar la concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀) variaron de 19.7 a 74.8 μ M para células C6 y de 1.5 a 212.8 μ M para las células U373. Las células C6 fueron tratadas por 24 horas con los compuestos en diferentes concentraciones mientras que las células U373 se trataron durante 48 horas (Alpuche-García et al., 2017).

Gliomas y líneas celulares

Los gliomas son tumores cerebrales primarios los cuales se desarrollan a partir de las células gliales que soportan las células nerviosas del cerebro y la médula espinal. La incidencia de gliomas aumenta con la edad y es más alta en personas de entre 70 y 74 años. Los síntomas dependen del tamaño, la ubicación y el grado de infiltración del tumor. Pero en general, los síntomas incluyen dolores de cabeza, náusea, vómito, convulsiones, trastornos visuales, problemas de habla y cambios en la capacidad cognitiva (Rogers et al., 2008). La importancia de su tratamiento radica en que este tipo de tumores tienden a crecer e infiltrarse en el tejido cerebral normal, lo que hace que un procedimiento quirúrgico sea difícil y en muchas ocasiones imposible. Es por eso, que existe una gran cantidad de estudios en nuevos compuestos para encontrar el fármaco adecuado que pudiera complementar los tratamientos ya establecidos contra este tumor en específico o incluso que sean reemplazados por una nueva terapia a base de este fármaco (“Brain Cancer and Gliomas”, s.f).

Para este tipo de cáncer y cualquier otro tipo de cáncer, siempre ha estado presente la necesidad de entender las etapas de progresión de un tumor maligno pero desde un principio esto requirió de ciertos enfoques complejos con respecto a la experimentación. Cuando se implantan células malignas dentro de un tejido cerebral animal se obtiene algo parecido a un crecimiento tumoral *in vivo*, sin embargo, la complejidad de este modelo dificulta la

identificación de procesos individuales involucrados en ciertas etapas del crecimiento tumoral como lo es la angiogénesis tumoral y la invasión. Con respecto a los cultivos celulares, es posible investigar con detalle el efecto de factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular, proteasas y la adhesión de algunas moléculas (Grobbs et al., 2002).

U-373 y C6 son las líneas celulares con las que se ha trabajado en este proyecto. Ambas son usadas ampliamente en el estudio de gliomas y tienen un modo de crecimiento adherente, por lo que se desarrolla una monocapa en un sustrato artificial (“Adherent Cell Culture vs. Suspension Cell Culture”, s.f). Las células de U-373 son epiteliales y esta línea celular es un glioblastoma humano astrocitoma que proviene de un tumor maligno en el cerebro (“U-373 MG (Uppsala) cell line”, s.f). Las C6 son fibroblastos, estas son células cerebrales gliales que, a diferencia de las anteriores, provienen de un glioma maligno en ratas (C6 Rattus norvegicus brain glioma, s.f).

Objetivos

- Evaluar la efectividad de cada uno de los compuestos derivados del AVP en líneas celulares como posible tratamiento en terapia de cáncer.
- Encontrar entre los siete compuestos derivados del AVP uno o varios fármacos potenciales con mayor actividad que el VPA por medio de la técnica *Western blot*.

Metodología

Sembrado de células

Se llevó a cabo el sembrado celular para cada línea celular de manera independiente. Tanto para C6 como para U-373, se realizó un conteo celular y en base al número de células realizaron los cálculos correspondientes para sembrar cada caja de 2.5 mL al 70%. Se colocó la cantidad necesaria de células de acuerdo a los resultados obtenidos y se añadió medio de cultivo para completar a 2.5 mL. Las cajas se guardaron en una incubadora por 24 horas y posteriormente se le añadió a cada una el compuestos correspondiente, a una dosis efectiva (D50), o en el caso del control negativo, nada. Para cada línea celular (C6 y U-373) se sembraron 9 cajas: 7 cajas, cada una conteniendo un compuesto diferente, 1 caja conteniendo AVP y 1 caja para el control negativo.

Extracción y cuantificación de proteínas

Se realizó la extracción de proteínas por medio de un buffer de lisis. Se colocaron las cajas y el buffer de lisis en hielo. A cada caja se le retiró el medio y se les adiciono el buffer de lisis. Se despegaron las células de cada caja con ayuda de una micropipeta. Las células recolectadas fueron sometidas a agitación, posteriormente se centrifugaron y finalmente se recolectó el sobrenadante.

La cuantificación se llevó a cabo, por medio del kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit, partiendo de una curva patrón y las muestras problema. Se utilizó una caja de 96 pozos en donde se colocaron las muestras de la curva patrón, las muestras problemas y ambas líneas celulares (C6 y U-373). La lectura se realizó por medio del lector de microplacas (equipo TECAN) y a partir de las absorbancias obtenidas se calcularon las concentraciones de las proteínas.

Mantenimiento de los cultivos celulares

Las líneas celulares C6 y U-373 fueron cultivadas de manera independiente para evitar contaminación cruzada entre las líneas. Ambas líneas se cultivaron en cajas de 9.5 cm² en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 con 10 % de suero fetal bovino a una temperatura de 37°C en una incubadora con CO₂ al 5% en atmósfera húmeda.

Western blot

7 muestras de proteínas de las líneas celulares C6 y U-373 tratadas con los 7 compuestos derivados de VPA más dos controles: uno de proteínas de células de C6 y U-373 sin tratar y otras tratadas con VPA fueron corridas en geles de manera independiente en geles de poliacrilamida al 15% a de 120 Volts y después transferidos a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semi seca a 13 V. Se usaron dos anticuerpos primarios en ambas líneas celulares: actina e histona (Acetyl-Histone H3 Lys9/Lys14 #9677S). Su aplicación fue la misma para ambas y se realizó de la siguiente manera: Después de la transferencia, se lavó la membrana haciendo tres lavados de 10 minutos y fue bloqueada con leche durante 1 h, se añadió anticuerpo primario de actina proveniente de ratón (1:400 leche descremada PBST) o de histona proveniente de conejo (2:400 leche descremada PBST) y se dejó incubando en refrigeración durante una noche. Se realizó un segunda ronda de lavados igual a la anterior y se añadió el anticuerpo secundario respectivo ya sea anti-ratón (1:10,000

leche descremada PBST) o anti-conejo (4:10,000 leche descremada PBST). Tras otros tres lavados de 10 minutos, la membrana se transfirió a una película de rayos X, donde las bandas se detectaron por una reacción de peroxidasa de rábano que emite luminiscencia.

Resultados

A partir de los ensayos de *Western blot* realizados sobre cada línea celular, se recopiló la información y se representó en tablas. La información plasmada indica la presencia o ausencia de bandas correspondientes para cada compuesto así como para los controles. Además, se indican también las observaciones de cada banda con respecto a su intensidad de expresión.

En la siguiente tabla (**tabla 3**) se observa la información de diferentes placas radiográficas para la línea celular C6. Para el compuesta AVP1 se observó que en la mayoría de los ensayos la expresión de actina es de intensidad fuerte mientras que para histona H3 solo un ensayo se observó una expresión tenue que posteriormente dejó de observarse. Para AV2 la expresión de actina es intensa para la mayoría de los ensayos mientras que la expresión de histona H3 fue tenue. En la banda correspondiente a AV3 se observó una expresión de actina tenue mientras que la expresión de histona H3 se observó tenue en un principio y posteriormente fue muy tenue. Para AVP4 se observó que la expresión de la actina es de intensidad fuerte mientras que la expresión de H3 fue tenue y en uno de los ensayos no se detectó. En la banda correspondiente a AV5 se observó un expresión intensa para actina mientras que para histona H3 la expresión fue tenue. Para AVP6 la expresión de actina es alta mientras que la expresión de histona H3 fue alta en un ensayo y baja en el otro. Para AV7 la expresión de la actina fue tenue en un ensayo y fuerte en el siguiente mientras que para histona H3 la expresión en un ensayo no se observó y en el otro su expresión fue tenue. En la banda correspondiente a AVP la expresión de la actina es baja en un ensayo y fuerte en el siguiente mientras que para histona H3 la expresión es baja en un ensayo y en otro no se observa ninguna banda. Para el control negativo la expresión de actina fue alta mientras que la expresión de H3 fue tenue.

| |
|----|
| C6 |
|----|

| | 05/12/17 | | | | 26-30/01/18 | | | |
|------------------|----------|--------|--------------|--------|-------------|------------|--------------|--------------|
| | Actina | | Histona (H3) | | Actina | | Histona (H3) | |
| AVP1 | * | tenue | * | tenue | * | fuerte | - | - |
| AVP2 | * | fuerte | * | tenue | * | tenue | * | tenue |
| AVP3 | * | tenue | * | tenue | * | fuerte | * | muy tenue |
| AVP4 | * | fuerte | - | - | * | fuerte | * | muy tenue |
| AVP5 | * | fuerte | * | tenue | * | fuerte | - | - |
| AVP6 | * | fuerte | * | fuerte | * | fuerte | * | muy tenue |
| AVP7 | * | tenue | - | - | * | fuerte | * | fuerte |
| AVP | * | tenue | * | tenue | * | fuerte | - | - |
| control negativo | * | fuerte | * | tenue | * | muy fuerte | * | tenue/fuerte |

Tabla 3. Información sobre las bandas obtenidas en las placas radiográficas que corresponden a los siete compuestos derivados del AVP así como también los controles (AVP y control negativo) en interacción con la línea celular C6.

La siguiente tabla (**tabla 4**) muestra la información de diferentes placas radiográficas para la línea celular U373. Para el compuesto AVP1 se observó que la expresión de actina fue de intensidad fuerte para los ensayos realizados mientras que para histona H3 la expresión se observó de intensidad fuerte. Para AVP2 la expresión de actina se observó con intensidad fuerte en los ensayos realizados mientras que la expresión de histona H3 se observó también con intensidad fuerte. En la banda correspondiente a AVP3 la expresión de actina se observó con intensidad fuerte en los ensayos realizados mientras que la expresión de histona H3 también se observó con intensidad muy fuerte. Para el compuesto AVP4 la expresión de actina se observó con intensidad fuerte para los ensayos realizados mientras que la expresión de histona H3 también se observó con intensidad fuerte. Para AVP5 la expresión de actina se observó con intensidad fuerte para los ensayos realizados mientras que la expresión de histona H3 también se observó con intensidad fuerte. En la banda correspondiente a AVP6 la expresión de actina se observó con intensidad fuerte para los ensayos realizados mientras que la expresión de histona H3 fue muy tenue. Para el compuesto AVP7 la expresión de actina de

actina se observó sólo como una pequeña marca debido a que la banda salió incompleta mientras que la expresión de histona H3 fue muy tenue. Para AVP, al igual que para el compuesto anterior, la expresión de la actina se observó sólo como una pequeña marca ya que la banda salió incompleta mientras que la expresión de histona H3 fue tenue. Para el control negativo no se observó la expresión de actina, sin embargo, se observó la expresión de H3 con intensidad muy fuerte.

| U373 | | | | |
|------------------|-------------|------------------|--------------|------------|
| | 21-22/02/18 | | | |
| | Actina | | Histona (H3) | |
| AVP1 | * | fuerte | * | fuerte |
| AVP2 | * | fuerte | * | muy fuerte |
| AVP3 | * | fuerte | * | fuerte |
| AVP4 | * | fuerte | * | fuerte |
| AVP5 | * | fuerte | * | fuerte |
| AVP6 | * | fuerte | * | muy tenue |
| AVP7 | * | marca incompleta | * | muy tenue |
| AVP | * | marca incompleta | * | tenue |
| control negativo | - | - | * | tenue |

Tabla 4. Información sobre las bandas obtenidas en las placas radiográficas que corresponden a los siete compuestos derivados del AVP así como también los controles (AVP y control negativo) en interacción con la línea celular U373.

La **tabla 4** presenta la información de placas radiográficas de los controles (AVP y control negativo) en ambas líneas celulares. Para AVP, la expresión tanto de actina como de histona H3 fue baja para la línea celular de C6. En la línea celular de U373, la expresión de actina se observó con intensidad fuerte mientras que la expresión de histona H3 fue tenue. Para el control negativo, la expresión tanto de actina como de histona H3 fue alta para la línea celular C6. En la línea celular de U373 la expresión de actina se observó con intensidad fuerte para una banda incompleta mientras que la expresión de histona H3 se observó tenue.

| Controles (AVP y negativo) | | | | | | | | |
|----------------------------|----------|------------|------|---------------------|--------------|------------|------|-------|
| | 13/02/18 | | | | | | | |
| | Actina | | | | Histona (H3) | | | |
| | C6 | | U373 | | C6 | | U373 | |
| AVP | * | tenue | * | fuerte | * | tenue | * | tenue |
| control negativo | * | muy fuerte | * | fuerte e incompleta | * | muy fuerte | * | tenue |

Tabla 4. Información sobre las bandas obtenidas en las placas radiográficas que corresponden a los controles (AVP y control negativo) en interacción con ambas líneas celulares (C6 y U373).

La **figura 1** representa las placas radiográficas de *Western blot*, obtenido de membranas expuestas a los anticuerpos primarios anti-histona acetilada y anti-actina así como sus respectivos anticuerpos secundarios. En la placa superior de actina se observan todas las bandas exceptuando la 7, posiblemente por error humano en el procedimiento del *Western blot*, ya que se cargaron en el gel las proteínas totales de la línea celular U373 y la actina es la proteína de mayor abundancia en las células eucariotas. Las bandas presentes corresponden al peso molecular de la actina: 42 kDa. Las bandas 1, 2, 3, 8 y 9 se observan densas y nítidas. Mientras que las bandas 3,4, 5 y 6 se observan irregulares pero nítidas. Las bandas asociadas al anticuerpo anti-histona corresponden al peso molecular de la histona acetilada en la lisina 9 o 14 que es de 17 kDa. Se observan todas las bandas de manera nítida excepto la banda número 6, no obstante sigue siendo visible (Domínguez, et al., 2011).



Figura 1. Placas radiográficas obtenidas de la líneas celular U373 tratadas con Actina (superior) e Histona H3 (inferior). Los carriles 1-7 corresponden a los siete compuestos derivados del AVP mientras que los carriles 8 y 9 corresponden al AVP y al control negativo, respectivamente.

La **figura 2** muestra las placas radiográficas de *Western blot*, obtenido de membranas expuestas a los anticuerpos primarios anti-histona acetilada y anti-actina así como sus respectivos anticuerpos secundarios. Se usó el porcentaje total de proteínas de la línea celular C6. Las bandas de la placa superior correspondientes a actina se aprecian en su totalidad y presentan un peso molecular de 42 kDa. Las bandas de la placa posterior, correspondientes a histona no aparecen todas y se muestran de manera irregular debido a un mal corrimiento del gel. Se aprecian las bandas de la 1 a la 7 con un peso molecular de 17 kDa.

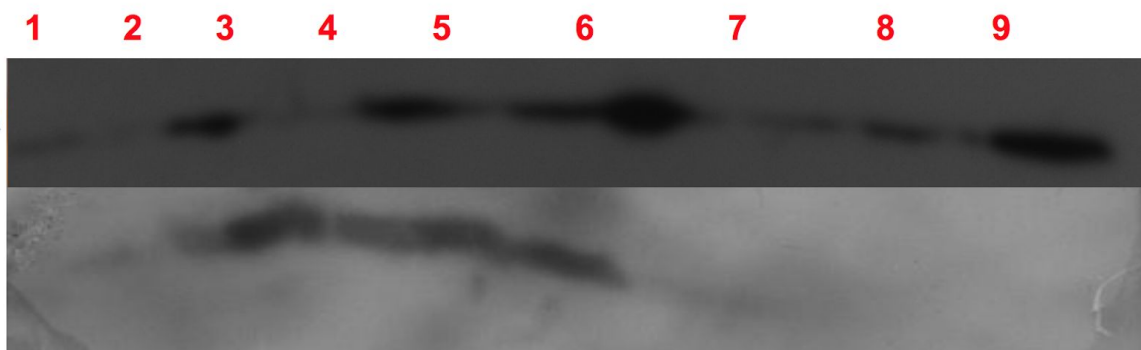


Figura 2. Placas radiográficas obtenidas de la líneas celular C6 tratadas con Actina (superior) e Histona H3 (inferior). Los carriles 1-7 corresponden a los siete compuestos derivados del AVP mientras que los carriles 8 y 9 corresponden al AVP y al control negativo, respectivamente.

La **figura 3** representa las placas radiográficas obtenidas por *Western blot*. Al igual que las anteriores, las membranas fueron expuestas a los anticuerpos primarios anti-histona acetilada y anti-actina así como a sus respectivos anticuerpos secundarios. La imagen superior corresponde a actina y se observan bandas con un peso molecular de 42 kDa. Las primeras dos bandas corresponden a la línea celular de C6 y se observa la banda del carril 1 (AVP) tenue en comparación con la banda del carril 2 (control negativo) la cual se observa intensa. La imagen inferior corresponde a histona H3 y se observan bandas con un peso molecular de 17 kDa. Las bandas 3 (AVP) y 4 (control negativo) corresponden a la línea celular U373 y se ambas se encuentran densas y nítidas, sin embargo, la banda correspondiente al carril 4 está incompleta ya que se encuentra cortada por la mitad lo cual posiblemente se debe a que al momento de cargar la muestra en el gel de electroforesis el volumen de la muestra era superior a la capacidad el carril.

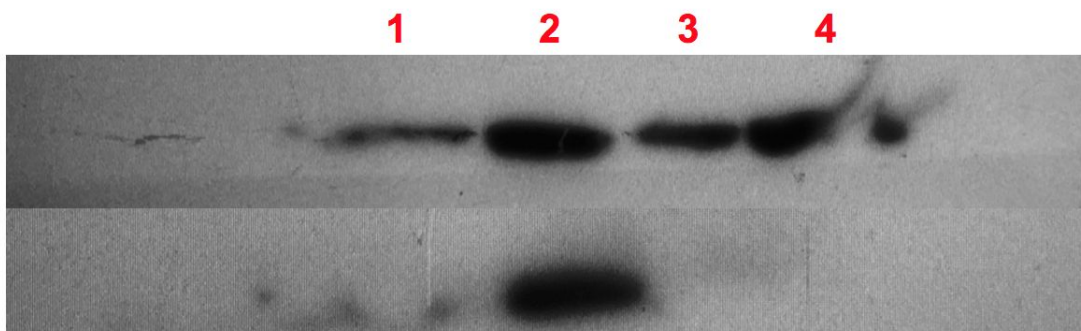


Figura 3. Placas radiográficas obtenidas de controles (AVP y control negativo) en ambas líneas celulares (C6 y U373) tratadas con Actina (superior) e Histona H3 (inferior). Los carriles 1 y 2 corresponden a la línea celular C6, AVP y control negativo, respectivamente. Los carriles 3 y 4 corresponden a la línea celular U373, AVP y control negativo, respectivamente.

Conclusiones

Los siete compuestos derivados del AVP resultaron tener una actividad efectiva como inhibidores de desacetilasa de histona, no obstante, es necesario mejorar la técnica para poder observar regularidad en las bandas y poder hacer una comparación más precisa entre las líneas celulares U373 y C6.

Referencias

- Adherent Cell Culture vs. Suspension Cell Culture. *Thermo Fisher Scientific*. Recuperado el 4 de marzo del 2018, de: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-lines/adherent-vs-suspension-culture.html>
- Alpuche-García, A., Dávila-González, X., Arregui, L., & Beltrán, H. (2017). Novel valproic aminophenol amides with enhanced glial cell viability effect. *RSC Advances*, 7(20), 12391-12399. <http://dx.doi.org/10.1039/c7ra00048k>
- C6 Rattus norvegicus brain glioma. *ATCC*. Recuperado el 4 de marzo del 2018, de: <https://www.atcc.org/Products/All/CCL-107.aspx>
- De Ruijter, A. J. M., Van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., & Van Kuilenburg, A. B. P. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal*, 370(Pt 3), 737-749. <http://doi.org/10.1042/BJ20021321>
- Dominguez, R., & Holmes, K. C. (2011). Actin Structure and Function. *Annual Review of Biophysics*, 40, 169-186. <http://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155359>
- Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Krämer, O., Schimpf, A., & Giavara, S. et al. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing

- differentiation of transformed cells. *The EMBO Journal*, 20(24), 6969-6978.
<http://dx.doi.org/10.1093/emboj/20.24.6969>
- Grobben, B., De Deyn, P., & Slegers, H. (2002). Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell And Tissue Research*, 310(3), 257-270. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-002-0651-7>
 - Krämer, O. H., Zhu, P., Ostendorff, H. P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M. A., ... Göttlicher, M. (2003). The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *The EMBO Journal*, 22(13), 3411–3420. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg315>
 - Phiel, C., Zhang, F., Huang, E., Guenther, M., Lazar, M., & Klein, P. (2001). Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *Journal Of Biological Chemistry*, 276(39), 36734-36741. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m101287200>
 - Rao, R., Fiskus, W., Ganguly, S., Kambhampati, S., & Bhalla, K. N. (2012). HDAC Inhibitors and Chaperone Function. *Advances in Cancer Research*, 116, 239-262. DOI: 10.1016/B978-0-12-394387-3.00007-0
 - Rogers, G., Garside, R., Mealing, S., Pitt, M., Anderson, R., & Dyer, M. et al. (2008). Carmustine Implants for the Treatment of Newly Diagnosed High-Grade Gliomas. *Pharmacoeconomics*, 26(1), 33-44. <http://dx.doi.org/10.2165/00019053-200826010-00004>
 - Ropero, S., & Esteller, M. (2007). The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular Oncology*, 1(1), 19–25. <http://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.01.001>
 - Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(4), a018713. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713>
 - Tang, J., Yan, H., & Zhuang, S. (2013). Histone deacetylases as targets for treatment of multiple diseases. *Clinical Science* (London, England : 1979), 124(11), 651–662. <http://doi.org/10.1042/CS20120504>
 - U-373 MG (Uppsala) cell line. *Sigma-Aldrich*. Recuperado el 4 de marzo del 2018, de: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/08061901?lang=es®ion=MX>
 - Brain Cancer and Gliomas. *WebMD*. Recuperado el 4 de abril del 2018, de: <http://www.webmd.com/cancer/brain-cancer/malignant-gliomas#1>
 - Witt, O., Deubzer, H., Milde, T. and Oehme, I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets?. *Cancer Letters*, 277(1), pp.8-21. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.08.016>.