



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN

**“Síntesis y evaluación in silico e in vitro de derivados del
ácido valproico como antineoplásicos”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN FARMACOLOGÍA
PRESENTA:**

JORGE ANTONIO BERMÚDEZ LUGO

DIRECTORES DE TESIS

DR JOSÉ CORREA BASURTO
DR OSCAR ALBERTO PÉREZ GONZÁLEZ

México, D.F.

Junio del 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 12:00 horas del día 05 del mes de mayo del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina para examinar la tesis titulada:

"Síntesis y evaluación in silico e in vitro de derivados del ácido valproico como antineoplásicos"

Presentada por la alumna:

Bermúdez

Apellido paterno

Lugo

Apellido materno

Jorge Antonio

Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	7	8	7
---	---	---	---	---	---	---


aspirante de:

Maestría en Ciencias en Farmacología

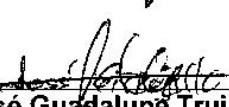
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dr. José Correa Basurto


Dr. Oscar Alberto Pérez González


Dr. José Guadalupe Trujillo Ferrara


Dr. Santiago Villafañá Rauda


Dra. Martha Cecilia Rosales
Hernández


Dr. Pedro López Sánchez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Eleazar Lara Padilla


ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F., el día 12 del mes mayo del año 2011, el que suscribe **Jorge Antonio Bermúdez Lugo** alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Farmacología con número de registro B091787, adscrito a **la Escuela Superior de Medicina**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. José Correa Basurto** y de el **Dr. Oscar Alberto Pérez Gónzales** y cede los derechos del trabajo intitulado **“Síntesis y evaluación in silico e in vitro de derivados del ácido valproico como antineoplásicos”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección dredochoa@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

JORGE ANTONIO BERMÚDEZ LUGO

Nombre y firma

Ka, khf & ka tet

AGRADECIMIENTOS:

A mi familia.

A mis tutores.

A mis sinodales.

A todos los profesores del curso de posgrado.

Al laboratorio de bioquímica 2 de la ESM IPN y su personal.

Al laboratorio de de oncología experimental del INP y todo su personal.

Al laboratorio de inmunología experimental, de citogenética y el servicio de patología del INP por la facilitación de material y equipo.

Al proyecto 62488 de ciencia básica de CONACyT, a la fundación Miguel Alemán, a la beca CONACyT para alumnos de posgrado, a la SIP (PIFI) y COFAA del INP.

A todos los que aportaron algo en la realización de este trabajo, desde el experimento más complicado, hasta una letra en esta tesis.

Gracias totales.

CONTENIDO GENERAL

CONTENIDO GENERAL	III
ÍNDICE	IV
ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS	VII
GLOSARIO DE TÉRMINOS	X
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII

ÍNDICE

		Pág
1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	3
2.1	Epidemiología de cáncer	3
2.2	Génesis del cáncer	3
2.3	DNA, histonas y epigenética	4
2.4	HDAC y su inhibición	6
2.5	Ácido valproico	9
2.6	Procedimientos <i>in silico</i>	11
2.7	Procedimientos <i>in vitro</i>	13
2.8	Microarreglos de expresión	13
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	15
4	HIPÓTESIS	17
5	OBJETIVOS	17
5.1	Objetivo general	17
5.2	Objetivos particulares	17
5.2.1	Métodos teóricos	17

5.2.2	Métodos <i>in vitro</i>	18
6	MATERIAL Y MÉTODO	19
6.1	Instalaciones y equipo	19
6.2	Metodología teórica	19
6.2.1	Minimización de ligandos	19
6.2.2	Alineamiento de secuencia	20
6.2.3	Estructura tridimensional	20
6.2.4	Minimización de la energía de la proteína	20
6.2.5	Docking	21
6.2.6	Dinámica molecular	22
6.2.7	Metodología de síntesis	22
6.2.8	Purificación	23
6.2.9	Identificación	24
6.3	Metodología <i>in vitro</i>	24
6.3.1	Cultivo celular	24
6.3.2	Proliferación	24
6.3.3	Apoptosis	25
6.3.4	Extracción de RNA	26
6.3.5	Microarreglos	26
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7.1	Alineamiento múltiple y estructura tridimensional	28
7.2	Docking con HDAC8	31
7.3	Docking con CYP2C9	36
7.4	Dinámica molecular	37
7.5	Síntesis y caracterización	40
7.6	Proliferación y viabilidad	43
7.6.1	Cáncer cérvico-uterino (HeLa)	43
7.6.2	Rabdomiosarcoma (A204)	48

7.7	Extracción de RNA	49
7.8	Microarreglos	50
8	RESUMEN DE RESULTADOS	64
9	PERSPECTIVAS	66
10	CONCLUSIÓN GENERAL	66
11	REFERENCIAS	67
12	ANEXO	74

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág	
Figura 1	Cambios estructurales mediados por acetilación y desacetilación	5
Figura 2	Reclutamiento de HDAC/HAT	6
Figura 3	Sitio catalítico y mecanismo de desacetilación de HDAC	8
Figura 4	Farmacoteca usada en este estudio	16
Figura 5	Esquema de síntesis de los derivados de VPA	23
Figura 6	Alineamiento múltiple de las HDAC's clase 1 y 2	29
Figura 7	Gráficos de Ramachandran de cada una de las isoformas de HDAC	30
Tabla 1	Resultados del docking de VPA con diferentes isoformas de HDAC	32
Tabla 2	Energías libres y constantes de disociación obtenidas para cada compuesto	33
Gráfica 1	Relación de pk_d de cada compuesto con las dos enzimas	34
Figura 8	Interacción del compuesto IPN/INP2010-1A	35
Figura 9	Interacción del VPA en el sitio catalítico	36
Tabla 3	Energías libres y constantes de disociación de la farmacoteca contra CYP2C9	37
Figura 10	Interacción del VPA y 1A en CYP2C9	37

Gráfica 2	RMSD de la dinámica molecular de HDAC8	38
Tabla 4	Energías libres y constantes de disociación de VPA en la dinámica molecular	38
Figura 11	Cambios de la puerta de salida del SLA en HDAC8	39
Figura 12	Espectro infrarrojo de IPN/INP2010-1A	41
Figura 13	Espectro de RMN de ¹³ C de IPN/INP2010-1A	42
Figura 14	Espectro de RMN de protón de IPN/INP2010-1A	42
Gráfica 3	Curva concentración respuesta de VPA y 1A en HeLa	44
Figura 15	Seguimiento fotográfico tras la administración de la GI ₅₀ de 1A y VPA	45
Figura 16	Seguimiento fotográfico tras la administración de la GI ₉₉ de 1A y VPA	46
Figura 17	Prueba de túnel para células de HeLa tratadas con 1A y VPA	47
Gráfica 4	Curva concentración respuesta de VPA y 1A en A204	48
Gráfica 5	GI ₅₀ de los fármacos de este estudio por línea celular	49
Figura 18	Control de hibridación de microarreglos	50
Figura 19	Control 3' de microarreglos	51
Figura 20	Control de labeling de microarreglos	51
Figura 21	Histograma de intensidades de fluorescencia de todos los experimentos de microarreglos	52
Figura 22	PCA de los arreglos en 3 grupos	53
Figura 23	PCA de los arreglos en 5 grupos	54
Figura 24	Cluster jerárquico obtenido con la lista de genes de 1A vs control	56
Figura 25	Cluster jerárquico obtenido con la lista de genes de VPA vs control	57
Figura 26	Vía del p53	58
Figura 27	Vía del Wnt	59

Figura 28	Vía del RAR	59
Figura 29	Vía del ERBB	60
Figura 30	Vía de las MAPK	61
Figura 31	Vía de las MAPK	62
Figura 32	Vía del Wnr	62
Figura 33	Vías descritas en cáncer	63
Figura 34	Vía de Jak-Stat	63
Figura 35	Ciclo celular	64

GLOSARIO DE TERMINOS

VPA	Ácido valproico
HDAC	Histona desacetilasa
RMN	Resonancia magnética nuclear
RHNM	Registro histopatológico de neoplasias malignas
SINAIS	Sistema nacional de información en salud
DNA	Ácido desoxiribonucleico
HAT	Histona acetiltransferasa
CDKN1A	Ciclin-dependent kinase inhibitor 1
TSA	Tricostatina A
HDACI's	Inhibidores de la histona desacetilasa
VS	Virtual screening
CYP2C9	Citocromo P450 isoforma 2C9
A204	Linea celular de rabdomiosarcoma
HeLa	Linea celular de cáncer cervico-uterino
MM	Mecánica molecular
RMSD	Root mean square deviation
DMEM	Medio Eagle modificado de Dubelcco
PDB	Protein data bank
SLA	Sitio lanzadera de acetilo
1A	IPN/INP2010-1A
TdT	Transferasa de desoxinucleótidos terminal
RIN	RNA integrity number
RAR	Receptor del ácido retinoico

RESUMEN

Las histonas desacetilasas son un grupo de enzimas que se caracterizan por catalizar la separación de un grupo acetilo de las lisinas acetiladas en las histonas, esto tiene como efecto la compactación del material genético involucrado en esa región y la supresión de su expresión; la función de estas enzimas es aberrante en células neoplásicas; por otro lado, se descubrió que el ácido valproico inhibe a este grupo de enzimas, promoviendo la expresión de genes suprimidos en las células tumorales, provocando detención del ciclo celular y/o apoptosis.

Nuestro equipo de trabajo propuso la evaluación in silico de una serie de derivados del ácido valproico, y a partir de los resultados de esta evaluación sintetizar a aquellos derivados con mejores valores de interacción predichos.

Un derivado fue sintetizado y caracterizado tras el virtual screening, para posteriormente ser evaluado en cultivos celulares de cáncer cérvico-uterino y rhabdomiosarcoma, buscando alteraciones en la proliferación, viabilidad celular y apoptosis.

Por último se trataron células de cáncer cérvico-uterino con el derivado y con VPA, se extrajo el RNA y se realizaron microarreglos de expresión para caracterizar los cambios en el perfil de expresión de las células tumorales, provocados por el tratamiento.

ABSTRACT

Histone deacetylases are a group of enzymes that are characterized for catalyzing the separation of the acetyl group of the acetylated lysines on histones. This has an effect of compaction of genetic material involved in the region deacetylated; and therefore the suppression of gene expression. The role of these enzymes is aberrant in tumor cells. On the other hand, it was found that valproic acid inhibits this enzyme group, promoting the expression of genes suppressed in tumor cells, causing cell cycle arrest and / or apoptosis.

Our team proposed an in silico evaluation of a series of valproic acid derivatives, and from the results the synthesis and evaluation of those derivatives with best interaction predicted values.

A derivative was synthesized and characterized following the virtual screening and then it was evaluated in cell cultures of cervical cancer and rhabdomyosarcoma, looking for changes in proliferation, cell viability and apoptosis.

Finally, cells from cervical cancer were treated with the derivative and VPA, we extracted the RNA and expression microarrays were performed to characterize the change in the expression profile of tumor cells, caused by the treatment.

1 INTRODUCCIÓN

El cáncer es considerado como un grupo de patologías que se pueden comportar de modo distinto, tener diferente pronóstico, y evolucionar cada una de manera muy particular, sin embargo en todas ellas existe un común denominador: la pérdida de la capacidad de la célula para controlar su proliferación, lo cual puede ser secundario a la alteración de su material genético o a la desorganización de sus procesos epigenéticos^[1].

El cáncer es una de las principales causas de muerte por enfermedad en México, solo después de las provocadas por las complicaciones secundarias a diabetes mellitus y a hipertensión arterial, por lo que se considera un problema de salud pública que necesita atención^[2].

Durante décadas, se han hecho grandes esfuerzos por encontrar tratamientos eficaces contra el cáncer, pero hasta el momento los que han sido exitosos son tóxicos; por otro lado, el ácido valproico (VPA) se ha usado por mucho tiempo como terapia contra epilepsia, bipolaridad, entre otras patologías psiquiátricas^[3], y se ha descrito recientemente su actividad antiproliferativa en células neoplásicas^[4], lo que ha llevado a este fármaco a ser empleado en pacientes con cáncer, principalmente aquellos de estirpe hematológica, aunque su utilidad en tumores sólidos esta siendo ampliamente evaluada^[3]; su acción antineoplásica es debida a la inhibición de la enzima histona desacetilasa (HDAC)^[4].

Considerando que los estudios de acoplamiento molecular son una herramienta computacional que permite predecir el modo de unión y la afinidad teórica de moléculas con posible acción farmacológica sobre un blanco en particular, en este trabajo se propuso evaluar *in silico* una familia de compuestos derivados del ácido valproico. Tales compuestos fueron diseñados con el fin de incrementar la afinidad

con respecto al compuesto padre y de manera indirecta su capacidad inhibitoria sobre las HDAC; una vez evaluados teóricamente los compuestos, se procedió a sintetizar a aquellos con los mejores resultados de unión y energía libre de Gibbs, para después caracterizarlos por resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas. Posteriormente uno de los compuestos fue evaluado en cultivo celular de células neoplásicas buscando un efecto antiproliferativo. Después se hicieron microarreglos de expresión para identificar los cambios en los perfiles de expresión genética de células neoplásicas tratadas con ácido valproico y con los compuestos de este trabajo, con lo que se integraron las vías metabólicas que sufrieron modificación ante la exposición al fármaco.

Es por lo anterior, que el tema central de este estudio fue evaluar *in silico*, sintetizar, caracterizar y evaluar *in vitro* una familia de derivados del ácido valproico, con posible uso antineoplásico.

2 ANTECEDENTES

2.1 Epidemiología del Cáncer

El Instituto Nacional de Cáncer de EUA reportó en el 2006 una incidencia global de casos de cáncer de ambos sexos de 456.20 por cada 100,000 habitantes, así como una prevalencia de 2.7076%, lo que representa alrededor de 11,384,892 pacientes^[5].

El reporte anual sobre el estado del cáncer en el 2008 indicó que hubo una disminución del 0.8% en la prevalencia^[6], aún así, la cantidad de pacientes que existen, mantienen a esta patología como un problema de salud pública.

En México, el Registro Histopatológico de Neoplasia Malignas (RHNM) estableció que el cáncer provocaba el 13.1% de todas los fallecimiento por todas las causas, teniendo una tasa de 55.2 por cada 100,000 habitantes^[7]; mientras que el Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS) reportó en el 2005 que las defunciones provocadas por cáncer ascendían a 26,243, tomando en cuenta solo los tipos de tumores más frecuentes (pulmón, estómago, hígado, próstata, cérvico-uterino), lo que lo colocó en la 5º causa de muerte en la República Mexicana^[2].

2.2 Génesis del Cáncer

A pesar de que existen múltiples factores asociados a la génesis del cáncer, algunos de ellos no identificados plenamente, hay información suficiente que sugiere que las causas para que una neoplasia se desarrolle son las mutaciones (deleciones, translocaciones, etc.) en genes específicos, que al interactuar, condicionan la fisiopatología de un cáncer específico y finalmente su evolución hacia la diseminación a otros órganos a distancia llamada metástasis^[8]. Entre los genes que son susceptibles de provocar cambios preneoplásicos y aumentar el riesgo de presentar la enfermedad se encuentran los oncogenes (por ejemplo: KIT, MET, PDGFRA, RET), que son genes que se expresan de manera selectiva durante la embriogénesis, tiempo en el que condicionan proliferación y diferenciación de

grupos celulares, y cuando llega el momento, los estímulos que los mantienen transcripcionalmente activos cesan y entonces se mantienen “apagados”^[9]. Por otro lado, los genes supresores de tumores (por ejemplo: APC, CYLD, CDK4, p53), son genes que se activan posteriormente y sus consecuencias se observan en el mantenimiento del ciclo celular fuera de la fase de mitosis, lo que permite la diferenciación y funcionalidad de la célula y la evaluación y/o reparación de los daños al material genético, lo que previene alteraciones heredables a las células hijas en el caso de que los estímulos externos induzcan a la célula a replicarse^[10].

Existe otro grupo de genes, a los que se les ha llamado genes estabilizadores del DNA (por ejemplo: ATM, BLM, FANCA, XPA), aunque sus funciones no están bien identificadas, se cree que mantienen la estructura del material genético y participan en la reparación del mismo^[11].

Hoy se sabe que son solo algunas mutaciones en los genes antes expuestos los que inician el proceso neoplásico, sin embargo, el escape inmunológico, la perpetuación de la clona y la evasión de la apoptosis son procesos que se originan gracias a alteraciones epigenéticas^[12].

2.3 DNA, histonas y epigenética

Los genes están ubicados a lo largo de la cadena del ácido desoxirribonucleico (DNA) que contiene cada célula en su núcleo. El DNA es un polímero de bases nitrogenadas que está compactado gracias a la participación de un grupo de proteínas básicas llamadas histonas.

Las histonas son octámeros conformados por dímeros de las subunidades 2A, 2B, 3 y 4. En estas proteínas se enrolla el material genético y por tanto las interacciones interhistonas facilitan o limitan la accesibilidad de los promotores nucleares a las cadenas de DNA, lo que induce o inhibe la transcripción del gen en cuestión^[13]. Los mecanismos que provocan cambios conformacionales y por tanto de interacción entre las histonas son la acetilación, metilación, fosforilación y la ubiquitinación. La acetilación/desacetilación es el principal moderador de la interacciones

interhistonas, estos cambios se logran mediante la participación de enzimas llamadas histona acetiltransferasa (HAT) e histona desacetilasa (HDAC), respectivamente (figura 1)^[14].

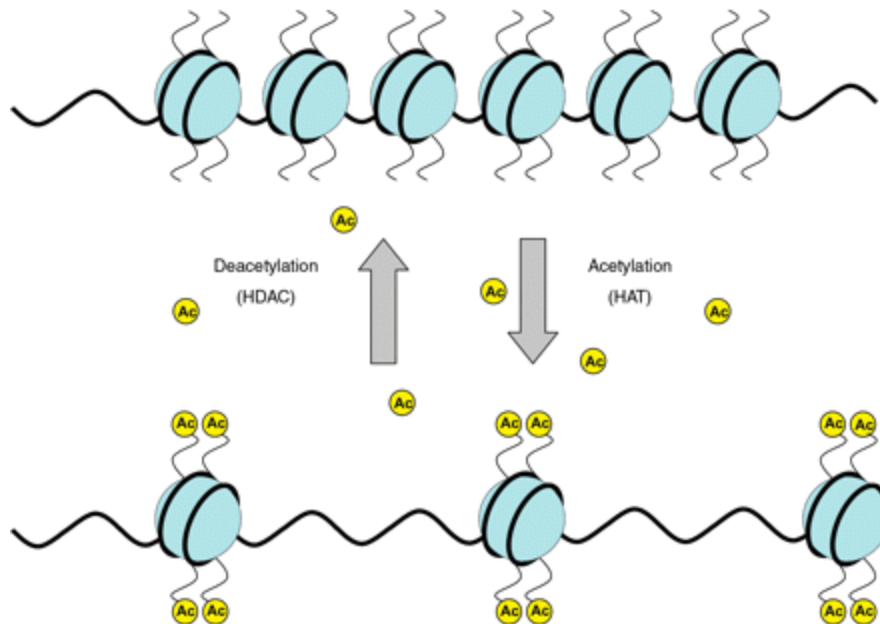


Figura 1. Cambios estructurales mediados por acetilación/desacetilación. Pons, D (2009); *Eu Heart J*, 30:266-77.

El mecanismo es el siguiente: si los grupos acetilo localizados en las cadenas laterales de los residuos de lisina ubicados en las colas de las histonas se hidrolizan, los efectos hidrofílicos y estéricos disminuyen, por lo tanto, las histonas se acercan entre sí (o se compactan) y como consecuencia inhiben la transcripción del DNA ya que la maquinaria transcripcional no puede acceder a los promotores de los genes en cuestión; por otro lado, si estas colas se acetilan, se crea repulsión entre histonas y estas se separan, exponiendo los genes que contienen, permitiendo así su transcripción^[14]. Un ejemplo de este control epigenético es el aumento (cuando la producción estaba reprimida) de la expresión del gen de la proteína P21 cuando hay acetilación no selectiva de las histonas nucleosomales^[15]; la proteína derivada de este gen es CDKN1A (Ciclin-Dependent Kinase Inhibitor 1), esta macromolécula es un efector antiproliferativo cuya producción es estimulada como consecuencia de daño

genético, este proceso es mediado por p53, y se sabe que generalmente dicha vía está reprimida en procesos neoplásicos^[16].

El control de la activación o silenciamiento de genes es un proceso dinámico en donde las HDAC's juegan un papel importante; algunas de ellas son reclutadas por proteínas de unión DNA-metilado, actuando como un "segundo candado" (figura 2) sobre genes cuyo promotor se encuentra silenciado por metilación^[17]; también pueden ser reclutadas por complejos represores como polycomb^[18].

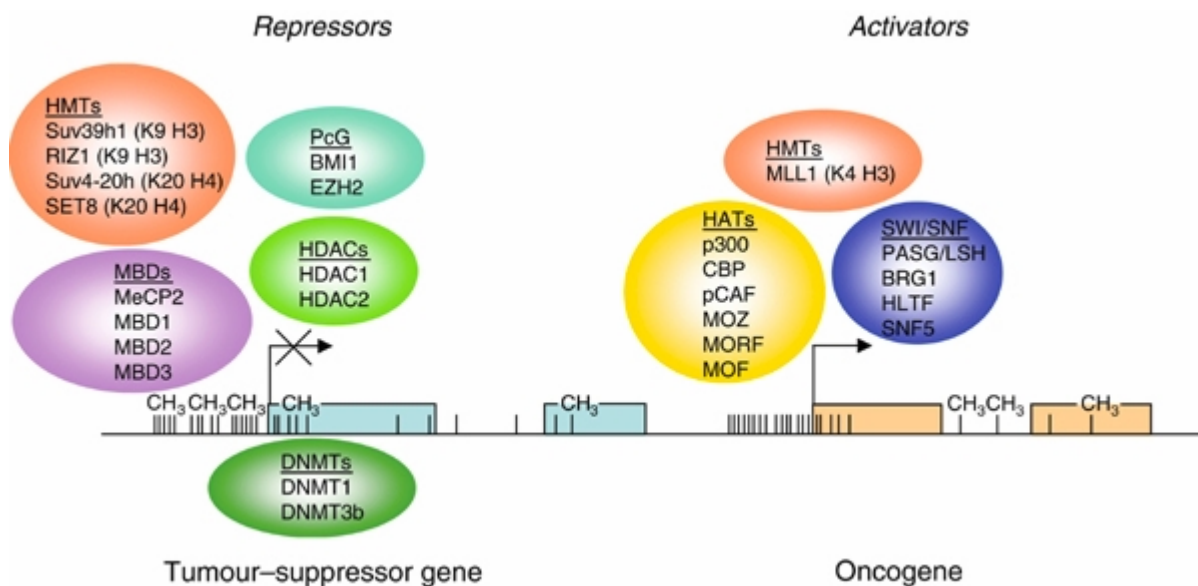


Figura 2. Reclutamiento de HDAC/HAT. Esteller, M (2006); Br J Cancer, 94:179-83.

2.4 HDAC y su inhibición

Las histonas desacetilasas son una familia de enzimas dependientes de zinc que se encuentran involucradas en los procesos antes mencionados, y se dividen en cuatro grupos principales, el grupo 1 conformado por las isoformas 1, 2, 3 y 8 las cuales se encuentran principalmente en el núcleo, el segundo grupo contiene dos sitios catalíticos en su estructura y tiene distribución entre el citoplasma y núcleo; en el tercer grupo (o sirtuin) se agrupa a todas aquellas que utilicen NAD como cofactor en lugar de zinc; por último en el grupo 4 se encuentra la isoforma 11, que comparte

homología con el grupo 2 pero carece de uno de los sitios catalíticos. El sitio catalítico del grupo 1 se encuentra altamente conservado, conteniendo aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr y Trp), y ácidos (Asp) principalmente, así como un ion zinc; el mismo comportamiento se encuentra en el grupo 2, que incluye a las isoformas 4, 5, 6, 7, 9 y 10, conservando el sitio catalítico pero teniendo ligeras diferencias.

Las HDAC's remueven los radicales acetilos del grupo ϵ -amino de las lisinas de las histonas nucleosomales^[19], esto ocurre en el sitio catalítico, el cual es un bolsillo pequeño en el fondo del cual se encuentra un ión zinc tricoordinado con los aminoácidos D258, D168 e H170 (*Figura 3*), se ha propuesto que el mecanismo de acción inicia con la interacción del acetilo con el zinc, el cual induce un cambio en la densidad electrónica del carbonilo, el cual se convierte en un sitio vulnerable de sufrir un ataque nucleofílico por una molécula de agua que mantiene en la cercanía el residuo H131, posteriormente el grupo amino interactúa con H132, el cual provoca un cambio electrónico, permitiendo la ruptura del enlace carbono nitrógeno y liberando así al acetato^[20]. La diferencia entre el patrón de cambio epigenético de cada isoforma no depende de su actividad, ya que el sitio catalítico se encuentra altamente conservado y su actividad enzimática es idéntica en cada caso, sino de los diversos complejos nucleares que reclutan a cierta isoforma de manera selectiva^[21].

La importancia de las HDAC's como blanco farmacológico, radica en que se ha establecido el hecho de que la mayoría de los procesos que aventajan a la célula neoplásica, confiriéndole los mecanismos necesarios para sobrevivir (desarrollar resistencia a quimioterápicos, etc.), son consecuencia de la represión epigenética de ciertos grupos de genes relacionados funcionalmente a través del reclutamiento aberrante de HDAC's^[21].

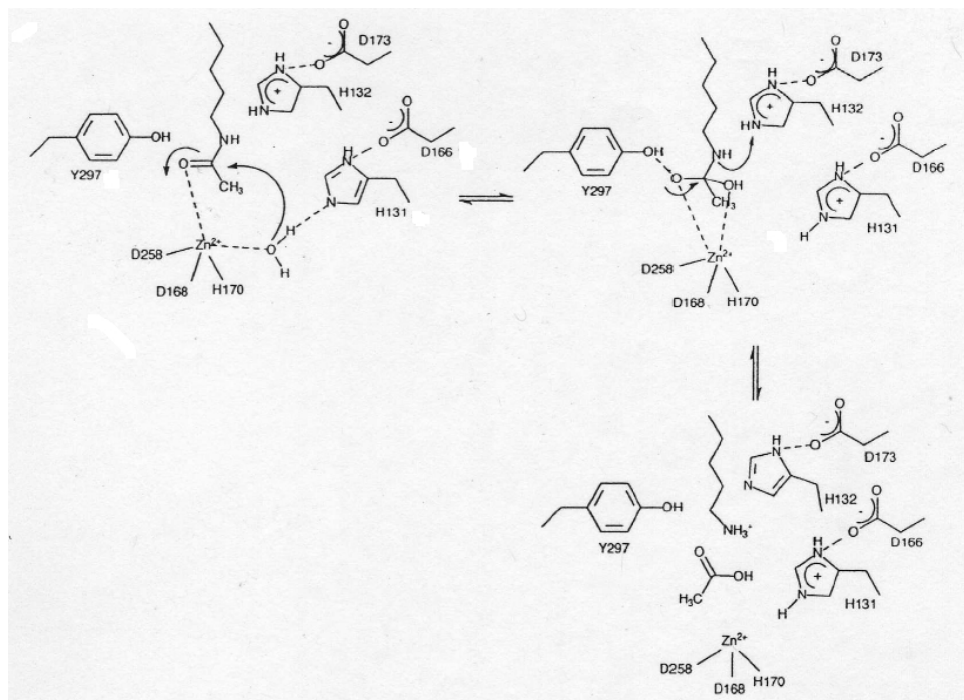


Figura 3. Sitio catalítico y mecanismo de desacetilación de HDAC. Mai, A (2005); *Med Res Rev.* 25:261-309

Actualmente se han desarrollado fármacos que inhiben la actividad de la HDAC (HDACI's)^[22] y se están evaluando como posibles antineoplásicos, en fase preclínica y fases 1 y 2, para el tratamiento de leucemias y tumores sólidos^[23].

Los HDACI's suprimen la actividad de múltiples HDAC's, lo que lleva a un incremento en la acetilación de histonas, esto a su vez, incrementa la expresión de genes específicos con funciones variadas, desde el control de la morfología, metabolismo celular, arresto del crecimiento, diferenciación y apoptosis^[24], y como efecto se observa diferenciación, arresto del ciclo celular y apoptosis^[25]. Estos inhibidores se pueden agrupar en dos clases: los *naturales* como la tricostatina A (TSA), la apicidina, el butirato de sodio, la depudecina, el taxol, entre otros; y los *sintéticos* como la piroxamida, los análogos de TSA, la oxamflatina, la sulfonamida del ácido hidroxámico, escriptaid, los derivados del fenilbutirato y el ácido valproico^[26]. Es importante señalar que una característica de la mayoría de estos compuestos, es que tienen un anillo aromático y un grupo funcional (como el ácido hidroxámico) que

produce quelación del ion ubicado en el sitio catalítico; se ha especulado que es debido a lo anterior que la mayoría de los HDACI's actuales son inespecíficos.

2.5 Ácido valproico

El ácido valproico (VPA) es un fármaco que desde décadas atrás se ha usado como antiepiléptico con muy buenos resultados, también se ha utilizado en el tratamiento del desorden bipolar y como profilaxis de la migraña^[26]. En la actualidad, y como resultado de varios estudios que han demostrado su capacidad como inhibidor de la HDAC^[27], se está evaluando su efectividad como antineoplásico; como antecedente de estos hechos, desde 1985 se descubrió su capacidad para inhibir la proliferación celular en el neuroblastoma murino y en células de glioma, también se ha encontrado que la exposición continua a VPA induce la diferenciación de varias líneas celulares e induce la apoptosis en carcinoma de mama y en leucemia mieloide. Existe al momento discrepancia entre si este fármaco inhibe solo a las HDAC's de clase 1^[4], o actúa indiferentemente sobre clases 1 y 2a^[28].

Eyal S. y cols en 2005 determinaron la inhibición de las HDAC's de forma no selectiva usando isómeros estructurales de VPA, encontrando que los más potentes fueron el 4-ene-valproico y el 2-ene-valproico, con una IC₅₀ de 1.5 mM y 2.8 mM respectivamente, mientras que para el VPA fue de 1.5 mM^[29]. Del mismo modo, se encontró una relación entre la inhibición de HDAC y la citotoxicidad en las células tumorales^[30]. Lo anterior ha dado pauta a más investigadores para dar un seguimiento de cerca a este hallazgo, por ejemplo, se demostró la eficacia del VPA en producir inhibición del crecimiento celular, aumento de apoptosis en células de cáncer endometrial, del mismo modo que en ratones con el mismo tumor sin aparición de efectos adversos^[31].

Recientemente se ha estado explotando este blanco farmacológico desde el punto de vista experimental usando VPA, ya que aunque existen HDACI's mas potentes,

tienen limitantes como toxicidad, vida media corta y baja biodisponibilidad, en cambio el VPA, muestra potencia moderada a concentraciones terapéuticas^[32]; sin embargo, es importante hacer mención que el VPA tiene ciertas desventajas farmacológicas debido a que para ciertos pacientes (1% de la población pediátrica^[33]) puede provocar daño hepático irreversible^[3] ya que se ha descrito que provoca aumento en las transaminasas en 11% de los pacientes en algún momento del tratamiento^[34].

Se realizó un estudio para establecer una probable función como profilaxis antineoplásica en pacientes en tratamiento crónico de enfermedades neurológicas con VPA, basados en el efecto antitumoral de este compuesto, y se encontró que la incidencia de cáncer en todos los grupos fue la misma, por lo que este compuesto no modifica el riesgo de presentar alguna neoplasia^[35].

Debido a los efectos prometedores y las décadas de conocimiento sobre el uso de VPA, se han realizado varios estudios probando su efectividad solo o en combinación con otros quimioterápicos; respecto a esto, Catalano et al, encontraron que la administración de este fármaco aumentaba la sensibilidad a doxorubicina en células de cáncer tiroideo anaplásico, uno de los tipos de neoplasia con peor pronóstico dada su resistencia a quimioterápicos^[36]. Este HDACI se ha usado también en la terapia de cáncer de próstata (tanto en línea celular como in vivo), en lo que Xie et al en 2006 encontraron que la administración aguda producía una acetilación neta de histonas H3 y esto reguló a la alza a p21, el receptor de andrógeno y el antígeno específico prostático, por otro lado encontraron que la administración crónica llevo a un descenso en la tasa global de proliferación debido a un aumento en la expresión de las caspasas 2 y 3^[37]. Del mismo modo, Kaiser et al, describieron los efectos de el tratamiento de VPA en líneas de mieloma múltiple, en el cual caracterizaron una detención del crecimiento y apoptosis mediada por incremento en la expresión de p21 y p27, así como debido a un descenso en la producción de VEGF^[38].

2.6 Procedimientos in silico

Debido a lo rápido y económico que resulta diseñar y generar fármacos, por métodos teóricos-computacionales, se ha implementado una nueva disciplina llamada tamizaje a gran escala o "virtual screening" (VS)^[39], donde se utilizan algoritmos basados en propiedades fisicoquímicas de moléculas de pequeño y de gran tamaño para predecir, simular y estudiar sus interacciones con otras moléculas, lo cual es resultado de infinidad de estudios experimentales tales como difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear, microscopia electrónica de barrido^[40]. Una vez que se efectúa el VS usando docking (acoplamiento molecular), se procede a sintetizar los mejores compuestos y a evaluarlos *in vitro* e *in vivo*^[41].

El método de docking consiste en la predicción de la orientación y posición termodinámicamente mas probable de una molécula con respecto a una segunda, cuando se les hace interaccionar hasta formar un complejo estable^[41]. Con esta información, y teniendo en cuenta las teorías termodinámicas es posible conocer el equilibrio de esa interacción^[41].

Computacionalmente, la simulación de docking puede ser definida como un problema de optimización, que resolverá el problema encontrando la mejor posición y orientación de la interacción, que es la traducción computacional del proceso de reconocimiento ligando-receptor (o enzima-sustrato)^[41].

Durante el cómputo, el algoritmo toma en cuenta descriptores de acoplamiento geométrico y complementariedad de superficies, donde la superficie de la macromolécula se caracteriza en términos de área de superficie accesible al solvente^[41]. El ligando se mueve a través de los espacios accesibles de la proteína, una vez escogido un lugar de forma aleatoria, se realiza una serie de movimientos adicionales dentro del ligando, como son movimientos conformacionales, rotaciones en ángulos de torsión y traslacionales; cada movimiento hecho en el espacio del ligando induce un cambio de energía en el sistema, por lo tanto después de cada movimiento en cada paso la energía total del sistema es calculada.

Durante la evolución del proceso, los resultados pasan por un puntaje, que le da un ranking a cada solución, este puntaje es calculado tomando en cuenta interacciones débiles (debido a que estas interacciones son las que mas frecuentemente se encargan de estabilizar al complejo en modelos de interacción reversible), por tanto, las mejores soluciones son aquellas que tienen una energía total menor^[41].

La termodinámica auxilia este proceso, al calcular el cambio de energía total en el sistema (ΔG) entre cada interacción en condiciones estándar. Es posible conocer el equilibrio y por tanto indirectamente la afinidad del ligando (K_d), al llevar los resultados a la segunda ley de la termodinámica:

$$\Delta G = R \ln K_d \quad (\text{Eq. 1})$$

El programa usa un algoritmo genético lamarkiano para generar resultados de probables conformaciones en el espacio de búsqueda, y al término del proceso, se enlistan de forma descendente, a partir de su energía de unión (la cual se calcula como la sumatoria de todas las energías del sistema, como se describe en la Eq. 2) y la de mejor puntaje se considera el óptimo global.

$$\Delta G_T = \sum \Delta G_P (\Delta G_H + \Delta G_{vdw} + \Delta G_D \dots) \quad (\text{Eq. 2})$$

Donde ΔG_T es cambio en la energía total del sistema, $\sum \Delta G_P$ es la sumatoria de las energías parciales de interacción; ΔG_H es la energía de interacción atribuida a puentes de hidrógeno; ΔG_{vdw} es la energía de interacción atribuible a interacciones de van der waals, y así sucesivamente con todos los tipo de interacción débiles (iónicas, aromáticas, electrostáticas).

La dinámica molecular es un método teórico en el que se considera que los átomos son esferas solidas unidas por resortes, conformando en forma global un sistema físico que tiene la capacidad de moverse siguiendo las leyes de la física newtoniana,

este método es en particular útil para calcular los movimientos de una proteína, con el fin de conocer los dominios que presentan cambios conformacionales, o con la intención de llevar una estructura previamente cristalizada a un estado más acercado al encontrado de forma fisiológica, ya que durante la cristalización de una proteína es necesario en ciertas ocasiones modificar las condiciones de solvente y temperatura.

2.7 Procedimientos *in vitro*

Los modelos *in vitro* que incluyen cultivos de células de tumor permiten medir la concentración inhibitoria media (GI₅₀) de un compuesto para generar apoptosis, diferenciación o impedir la proliferación. Una prueba frecuentemente usada para medir viabilidad celular es la aplicación de una sal de tetrazolio (MTT, XTT, WST-1) a un cultivo, y la viabilidad se interpreta de forma indirecta al medir el cambio de absorbancia que generan las células al transformar a nivel mitocondrial la sal en formazan.

2.8 Microarreglos de expresión

Actualmente, se están estudiando los efectos a nivel genético de compuestos mediante la técnica de microarreglos, ya que estos permiten identificar el comportamiento de cambios en la expresión génica^[42].

La técnica de microarreglos parte de una muestra de RNA extraído ya sea de cultivos celulares o de tejido, este material representa el perfil de expresión de la muestra en ese momento y bajo condiciones establecidas. El RNA es convertido en cDNA a través de una reacción de retrotranscripción, después el material es amplificado y marcado con fluoresceína para después ser hibridado en un chip de microarreglo, basado en el principio de complementariedad de cadenas de DNA. Estos chips contienen nanoceldas en las que se albergan sondas de 25 nucleótidos de longitud, cada celda contiene 25 sondas para un mismo gen; existen chips que van desde 500 hasta 30,000 genes. Una vez que la muestra hibridó, es leída con un

escáner y los resultados de intensidad de fluorescencia se analizan mediante software específico.

El software de análisis usa algoritmos complejos para contrastar los valores de fluorescencia de una muestra contra una situación control, y de esta forma, es posible encontrar genes que se encuentran diferencialmente expresados (tanto a la alza como a la baja) con alto significado estadístico^[43].

Esta técnica ha sido particularmente útil en encontrar genes que se expresan en situaciones patológicas (como en cáncer) y convertirlos en marcadores de diagnóstico, de pronóstico, de respuesta al tratamiento, etc.

Gurvich N et al en 2005 realizaron un estudio con microarreglos para definir los cambios en la expresión génica al administrar TSA y VPA, ambos HDACI's no selectivos, y encontraron un patrón de expresión muy parecido como resultado a la exposición, por lo que concluyeron que ésta es una forma de medir fármacos que modifiquen los procesos epigenéticos directamente^[44].

Dueñas González y colaboradores describieron en 2006, a través de microarreglos, los perfiles de expresión de células neoplásicas tratadas con VPA, y en combinación con hidralasina (un inhibidor de la DNA metiltransferasa). El objetivo de este grupo fue contrastar globalmente el cambio en el perfil de expresión (no la descripción de los detalles del cambio) entre las condiciones antes descritas con respecto a la célula neoplásica sin tratamiento, e identificaron que la suma de un inhibidor de histona desacetilasa combinado con un inhibidor de la DNA metiltransferasa aumentan el cambio en el perfil de expresión, lo que se podría interpretar como sinergismo. Por otro lado mencionaron que el efecto antineoplásico del VPA puede ser debido a cambios en la expresión de moléculas involucradas en la fase G1 del ciclo celular y apoptosis^[45].

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una pandemia que ha ido incrementando exponencialmente debido a los cambios ambientales a los que los seres humanos nos hemos expuesto. Como ejemplo de esto tenemos la mayor exposición a agentes carcinógenos como los metales pesados, radicales libres, radiaciones entre otras^[46].

Las células cancerígenas se caracterizan por expresar complejas maquinarias proteicas que les permiten contrarrestar los efectos farmacológicos de las drogas usadas, llamadas "multidrug resistant proteins" (glicoproteína P)^[47], lo cual ha inducido a la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos susceptibles de ser alterados evitando así la replicación exagerada característica del cáncer. Uno de estos blancos es la familia de proteínas HDAC, en donde existe evidencia de que al ser inhibida, la replicación disminuye y aumenta la diferenciación. Considerando el antecedente sobre la capacidad del VPA para disminuir el crecimiento celular al inhibir a la enzima HDAC, lo que explica su efecto antineoplásico, es comprensible que el VPA se encuentre en estudios clínicos, sin embargo este fármaco es hepatotóxico, lo que ha motivado el interés por desarrollar nuevos derivados, por ejemplo con modificaciones en las cadenas alifáticas; un hecho importante es que no se han realizado derivados con modificaciones al grupo carboxilo.

Es por eso que nuestro grupo de trabajo propone la evaluación de una serie de derivados del ácido valproico (*Figura 4*), a través de una sustitución aromática en el grupo carboxilo, lo que posiblemente permitirá superar la capacidad inhibitoria del VPA sobre la HDAC, y por consiguiente se observe un efecto más potente como antineoplásico. Es también posible que al cambiar la estructura del compuesto padre, las enzimas que lo metabolizan (CYP2C9) y que son encargadas de la producción del metabolito tóxico, no lo reconozcan, o lo hagan con otra orientación

en el espacio (este punto no será probado por este estudio). Tentativamente, la potencia inhibitoria se incrementará debido a que los derivados poseen grupos funcionales que aumentan la complementariedad y por tanto aumenta la estabilidad del complejo proteína-fármaco.

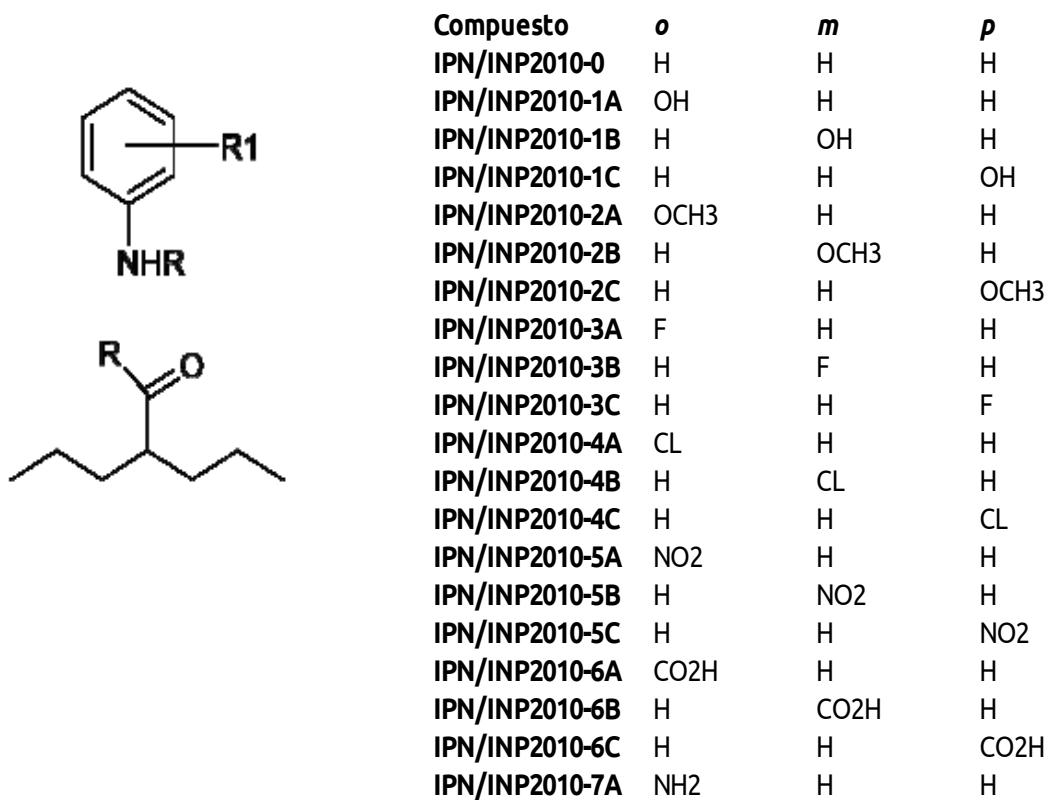


Figura 4. Farmacoteca usada en este estudio. R1 es el sustituyente arílico monosustituido en orto, meta y para con sustituyentes electroattractores y electrodonadores.

4 HIPÓTESIS

Los derivados propuestos del VPA poseerán efecto antineoplásico posiblemente a través de la inhibición de las histonas deacetilasas, debido a que el farmacoforo del VPA se conserva, y se adicionan grupos que aumentan la estabilidad del compuesto al favorecer la interacción con el sitio catalítico de la enzima.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Se diseñó, sintetizó y evaluó el efecto antineoplásico de una familia de derivados del VPA como posibles inhibidores de HDAC, usando métodos teóricos (dinámica molecular/docking) y experimentales (in vitro).

5.2 Objetivos particulares

5.2.1 Métodos teóricos

- Se optimizó la geometría de la farmacoteca (base de datos de los compuestos).
- Se realizó un alineamiento múltiple de secuencia entre las HDAC de clase 1 y 2
- Se obtuvo la estructura tridimensional experimental de las isoformas reportadas, mientras que las no reportadas se obtuvieron por modelado por homología.
- Se realizó el docking de VPA sobre las isoformas de clase 1 y 2 de la HDAC, posteriormente se realizó el docking de la farmacoteca con la isoforma más afín a este fármaco.

- Se realizó una simulación de dinámica molecular con la isoforma usada en el punto anterior, para realizar un docking de VPA con cada confórmero obtenido.
- Se realizó un estudio docking de los compuestos sobre Citocromo (CYP2C9).
- Se sintetizó y caracterizó uno de los compuestos que mostraron mayor afinidad por la HDAC.

5.2.2 Métodos in vitro

- Se efectuaron ensayos de proliferación celular y apoptosis en cultivos celulares con las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (HeLa), rabdomiosarcoma (A-204) después de ser tratados con el derivado sintetizado y el VPA.
- Se obtuvo la GI_{50} y la GI_{99} (inhibición de la proliferación en 50 y 90% respectivamente) para los compuestos (sintetizado y VPA).
- Se trató a células de HeLa con la GI_{50} por 24 y 48 h, para después extraer su RNA y efectuar microarreglos de expresión y posteriormente verificar los genes que modifican su expresión e integrarlos para encontrar las vías metabólicas que sufrieron cambios.

6 MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Instalaciones y equipo

Los experimentos computacionales se llevaron a cabo en el laboratorio de modelado molecular y bioinformática de la sección de estudios de posgrado e investigación (SEPI) de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutela del Dr. José Correa Basurto.

Para los cálculos de docking y dinámica molecular se usó un cluster constituido por 20 nodos de 64 bits, cada una con un procesador de 4 núcleos, otro de 6 nodos y 2 computadoras, todas en plataforma Linux, distribuciones Red Hat, Mandrake y Fedora 8.

La síntesis y parte de la caracterización de los compuestos se realizó en el laboratorio de investigación en bioquímica II de la ESM-IPN. La identificación por resonancia magnética nuclear se llevó a cabo en el laboratorio de química orgánica de UPIBI-IPN.

Los microarreglos, cultivos celulares y ensayos farmacológicos fueron realizados en el laboratorio de oncología experimental del Instituto Nacional de Pediatría bajo la tutela del Dr. Oscar Pérez con una plataforma de Affymetrix y con los kits necesarios para el caso.

6.2 Metodología teórica

6.2.1 Minimización de ligandos

El conjunto de ligandos se crearon en 2-D con el programa IsisDraw^[48], a los archivos obtenidos se les efectuó una primera optimización geométrica con mecánica molecular (MM) con el software HyperChem62^[49], después se llevó a cabo la optimización con un método semiempírico AM1 y después a un nivel B3LYP con una

base de datos 6-31G*, usando el programa Gaussian^[50].

Contando ya con las estructuras tridimensionales, se usó el software Molekel^[51] para obtener los archivos .pdb, que son los necesarios para la configuración de los scripts del programa AutoDock 4.0^[52].

6.2.2 Alineamiento de secuencia

Se obtuvo la secuencia de la estructura primaria en formato FASTA de las isoformas de clase 1 y 2 de la HDAC desde servidor Swiss-Prot (<http://www.expasy.ch/sprot/>), para posteriormente ingresarlos al servidor del European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) y procesarlos con el programa de alineamiento múltiple ClustalW2^[53]. El análisis del alineamiento se realizó con el visualizador JalView (<http://www.jalview.org/>).

6.2.3 Estructura tridimensional

Se hizo una búsqueda en la base de datos Protein Data Bank^[54] (PDB www.rcsb.org), swiss-prot (www.expasy.ch/sprot) y en EBI (www.ebi.ac.uk) de las estructuras en 3-D de las HDAC's obtenidas experimentalmente a través de cristalización y difracción de rayos X o RMN. Cuando alguna isoforma no existía o no se encontraba reportada, se obtuvo la estructura tridimensional usando modelado por homología con el servidor Swiss-Model^[55] y mediante metodología Ab initio con el servidor I-Tasser^[56], para posteriormente analizar la calidad de las estructuras con mapas de Ramachandran y escoger la que mejor resultado obtuvo.

6.2.4 Minimización de la energía de la proteína

Con el fin de que los resultados de estos estudios teóricos fueran más precisos, se realizó una minimización de la energía de las estructuras tridimensionales con la siguiente metodología: Los átomos de hidrógeno fueron añadidos usando el programa psfgen incluido en el paquete VMD^[57] y la estructura resultante fue minimizada usando un algoritmo de pasos descendentes, por 2000 pasos,

empleando el campos de fuerza CHARMM 22^[58] encontrado en NAMD 2.6^[59].

6.2.5 Docking

Los estudios se realizaron con el programa AutoDock 4.0.1 en plataforma Linux^[52]. El procedimiento general consistió en preparar archivos de entrada para AutoDock a partir de las estructuras optimizadas de los compuestos, la estructura de la macromolécula, los archivos de parámetros y algunos archivos adicionales creados y utilizados por el programa. Las enzimas HDAC usadas para las simulaciones de docking se obtuvieron del banco de datos de proteínas. A estos archivos se les eliminó las moléculas de agua y ligandos ajenos con el editor de texto wordpad. Después se les adicionó los átomos de hidrógeno polares, es decir, aquellos unidos a átomos electronegativos que pueden participar en interacciones por puente de hidrógeno; se agregaron cargas parciales y parámetros de solvatación, utilizando el programa AutoDockTools. Con la finalidad de evaluar la contribución electrostática en el reconocimiento, se calcularon las cargas parciales de Kollman. Todos los átomos de hidrógeno no polares se trataron de manera implícita, es decir, se eliminaron de la estructura y su efecto es sumado a los átomos a los que estaban unidos. Hechas estas modificaciones se editaron los archivos *.pdbqt para cada enzima con el mismo programa previamente mencionado. Los mapas de afinidad atómica se generaron para cada archivo *.pdbqt de las enzimas y por cada tipo de átomo encontrado en los ligandos, utilizando el programa AutoGrid 4.0. En primer lugar se especificó cada uno de los tipos de átomos presentes en los derivados de VPA. Después, a la enzima se le delimito el volumen a analizar (espacio de búsqueda computacional), el cual se fracciona en secciones o puntos, sobre cada uno de éstos se hace el cálculo de afinidad por cada átomo. Esta información se almaceno en un archivo *.gpf, que es utilizado por el programa AutoGrid para generar los mapas de afinidad. Estos mapas se utilizaron por el programa AutoDock para determinar la afinidad de los inhibidores por la enzima.

Los complejos tridimensionales enzima-inhibidor se visualizaron y analizaron utilizando el programa AutoDock Tools y VMD^[57].

6.2.6 Dinámica molecular

La estructura que con la que se realizó el estudio de docking contra la farmacoteca, fue sometida a una simulación de dinámica molecular de 9.5 ns, obteniendo un conformero cada 0.5 ns, con el objetivo de contar con una pequeña muestra de la diversidad y estabilidad conformacional de la proteína en el tiempo.

Se usó la estructura obtenida de la forma antes mencionada, a partir de esta se generaron los archivos de configuración .conf y .pgn, y con estos se obtuvo el archivo de parámetros .psf mediante la herramienta PSFGEN del software VMD^[57], después de correr una minimización en vacío de 2000 pasos, se solató la proteína, se colocó en una caja a la que se le dieron las dimensiones suficientes para cubrir la proteína, y se neutralizaron las cargas colocando la cantidad necesaria de iones contrarios a la carga de la proteína.

La simulación de la dinámica molecular se llevó a cabo usando el programa NAMD2^[59], en un ambiente de condiciones estándar (temperatura de 300.5 K, y 1 ATM de presión), con un tiempo establecido para cada paso de 2 fs. La simulación corrió por 1000 pasos, en los que se evaluaron los cambios al calentar el sistema, equilibrando al final el sistema a 310 K.

El análisis de RMSD y la obtención de los conformeros a cada tiempo se obtuvieron con el software Carma^[60].

6.2.7 Metodología de Síntesis

Las amidas de VPA se sintetizaron, formando el cloruro de ácido valproico, usando cloruro de tionilo. De acuerdo a la siguiente reacción mostrada en la *figura 5*.

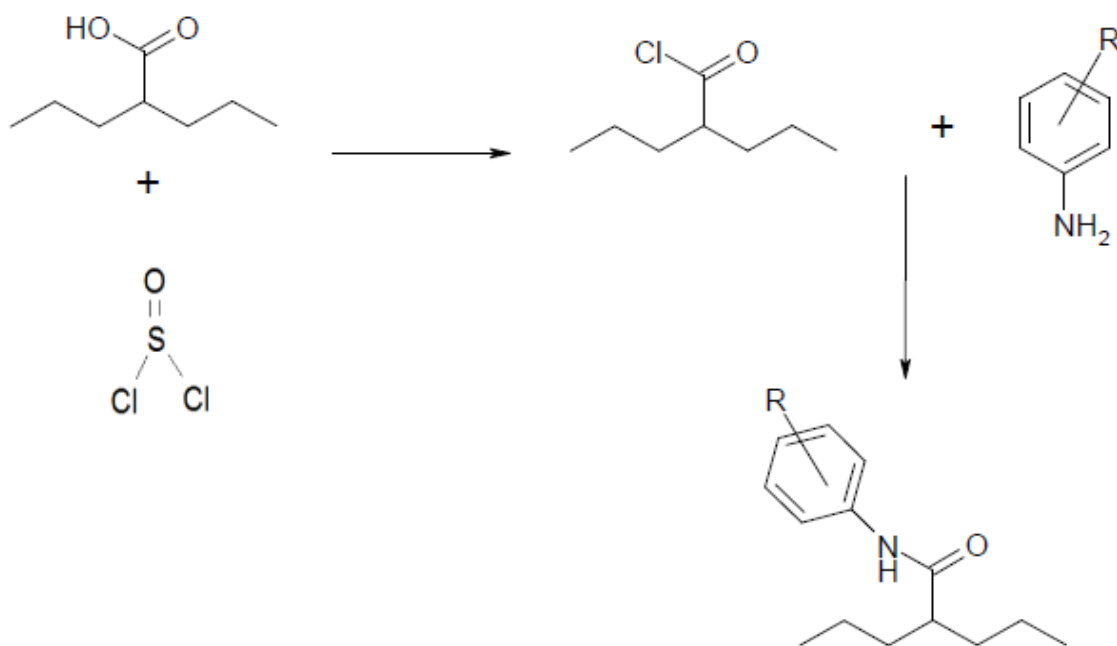


Figura 5. Esquema de síntesis de los derivados del VPA. (R = ver figura 4)

Las condiciones para esta reacción fueron anhidras, ya que el cloruro de tionilo fácilmente reacciona con el agua formando HCl y SO₂. El primer paso de la reacción se llevó a cabo a una temperatura de 0 °C y por 8 h y el segundo, al adicionar la segunda materia prima (anilina monosustituida) se debe mantener a una temperatura menor a los - 10 °C y por 12 h ambas en un matraz de fondo redondo y en agitación constante^[61].

6.2.8 Purificación

Como subproductos en la reacción de esterificación se tiene el dióxido de azufre, el cual fue removido haciendo circular nitrógeno gaseoso. El HCl se eliminó neutralizando con una disolución saturada de bicarbonato de sodio y finalmente el compuesto se obtuvo tras la separación mediante fases hexano-agua.

6.2.9 Identificación

La síntesis de los compuestos se siguió por cromatografía en capa fina, la cual se reveló usando un espectrómetro de UV-Vis marca Midac Corporation M series a una longitud de onda de 450 nm. También se determinaron los puntos de fusión usando un fusiómetro marca Electrothermal 9300. Los compuestos fueron caracterizados por métodos espectroscópicos de infrarrojo con un equipo marca Beckman Coulter DU 650 y de resonancia magnética nuclear de ^{13}C y ^1H .

6.3 Metodología In vitro

6.3.1 Cultivo celular

Con el propósito de corroborar los efectos biológicos, se hicieron cultivos celulares usando las líneas He-La (cáncer cérvico-uterino) y A204 (rabdomyosarcoma). Ambas se crecieron en frascos de cultivo estériles, usando como medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal. El pase de caja se hizo cada 3 días o cada vez que se encontró confluencia del 80% aproximadamente. Las dosis de VPA y metodología empleadas fueron semejantes a las reportadas para el VPA^[29]. Se hicieron pruebas preliminares para identificar las concentraciones de los compuestos derivados a usar.

6.3.2 Proliferación (medida con la sal de tetrazolio WST-1)

Se sembraron 10^4 células en placas de 96 pozos, dejando incubar por 24 h (37°C, 5%CO₂, en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%) con el fin de que se adhieran a la placa, posteriormente se prepararon las soluciones para los fármacos al momento (a partir de una solución madre) en medio de cultivo con 5% de DMSO, para tratar a las células por 24 h; al cumplirse el tiempo se aspiró el contenido de cada poso, se agregó 100 μL de medio y 10 μL de WST-1, se incubó por 4 h y se realizó la lectura en un equipo Microplate Reader de la marca Modulus para placas de elisa, a 520nm de absorbancia, la viabilidad se calculó con la siguiente fórmula:

$$Viabilidad(\%) = \frac{A520nmTratadas}{A520nmControl} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

La GI_{50} (concentración de fármaco necesaria para disminuir la viabilidad al 50% con respecto al control) fue calculada mediante la construcción de una curva concentración respuesta y los valores obtenidos fueron procesados en el servidor de la universidad de Tokyo (<http://bsmdb.tmd.ac.jp:3000/>) a través de un análisis logarítmico de 4 variables.

6.3.3 Apoptosis (determinado mediante el kit de apoptosis de Takara Inc.)

Las células de las líneas celulares HeLa y A204 fueron sembradas a razón de 10^6 células en un frasco de cultivo de 25 mL y se incubaron (37°C , $5\%\text{CO}_2$, en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%) por 24 h para adhesión, posteriormente se trataron con la GI_{50} (24 y 48 h) y la GI_{99} (por 4 h), posteriormente se desprendieron del frasco con una espátula para cultivo y se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 mL de solución conservadora para citología, se preparó 100 μL de esta suspensión con 30 μL de sol encapsuladora y se dió un ligero vortex para crear una monocapa celular, se colocaron 20 μL de la muestra en una laminilla tratada con poli-L-lisina y se colocó en la estufa a 60°C por 10 min, se fijó en acetona por 10 min, se rehidrató y se trató con 2 gotas de proteinasa K por 10 min, se lavó con PBS por 4 min, posteriormente se agregaron 75 μL de buffer de permeabilización y se incubó en frío por 5 min, se lavó con PBS y se agregó la enzima TdT en mix con la solución de marcado (5 μL de enzima por cada 45 μL de buffer) y se incubó por 2 h en una cámara humidificada a 37°C , se lavó con PBS y se tiñó con azul de evans para observar en microscopio de fluorescencia.

6.3.4 Extracción de RNA (usando el kit Rneasy)

Se trataron las células HeLa del mismo modo que en el apartado anterior, después del centrifugado, el botón se homogeneizó con 2-mercaptoetanol al 1% en bufer RLT, se lisaron las células con un sonicador, se agregó etanol al 70% y se transfirió a una minicolumna de sílica, se centrifuga a 10^4 RPM por 1 min y se sigue el protocolo del kit (Rneasy kit Qiagen); el RNA extraído se somete a análisis de cantidad y pureza en un equipo Nanodrop 2000 de la compañía Thermo Scientific, y después a un análisis de integridad mediante un chip de RNA (Agilent) en el equipo Bioanalyzer 2100 de Agilent.

6.3.5 Microarreglos

Se pretendió buscar por microarreglos, los genes que se activan y/o apagan tras el tratamiento con VPA y el compuesto derivado. Se usó la estrategia descrita por Jergil y cols en 2009^[62] y de acuerdo al manual de procedimientos del proveedor (Affymetrix); en este caso, se usó el chip de Human Genome de Affimetryx (HG-U133) mismo que contiene marcadores para 14,500 genes, 18,500 cuando se incluyen variantes de transcritos, todos estos distribuidos en 22,000 probe sets.

La metodología que se usó fue la siguiente: una vez que se contó con la muestra de RNA que fue sometida al estudio de calidad mediante el chip de bioanalizador (RNA nano chip de Aligent), donde se obtuvieron los parámetros la integridad (RIN) y la concentración, siendo considerados como valores para entrar a protocolo de microarreglos un RIN mayor de 8 y más de 100 ng/ μ L.

Se eligió el protocolo de Gene Chip 3' IVT Express kit (Affymetrix), el cual consiste en: a cada muestra de RNA se le agregó como primer paso control Poly-A en Dil buffer, para posteriormente añadir la enzima y sintetizar la primera cadena de cDNA, esto se dejó incubando por 2 h a 42 °C en un termociclador, posteriormente se prepararon las muestras para la síntesis de la segunda cadena (amplificación) y posteriormente el marcado con biotina (reacción IVT) que se dejó a 40 °C en el

termociclador por 16 h. Ya amplificado y marcado, se purificó del aRNA mediante el uso de perlas magnéticas y se corroboró la concentración y pureza con una medición en Nanodrop (Thermo Scientific), posteriormente se realizó una fragmentación del material genético y esta se corroboró con un chip de RNA (Agilent) medido en el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent). Después se procedió a hibridar las muestras en cada chip (HG U133) añadiendo también los controles de hibridación y dejando en agitación por 16 h. Pasado este tiempo se realizó el lavado en una estación de fluidos (Affymetrix) y se leyeron los valores de intensidad de fluorescencia con un GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix).

El análisis de calidad de los resultados de fluorescencia se realizó con el software de Expression Console (Affymetrix). El análisis detallado de los genes que se expresaron diferencialmente se realizó con el software Partek Genomic Suite (Partek). Las vías metabólicas se integraron con el software en línea DAVID [<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>]

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Alineamiento múltiple y estructura tridimensional

Esto se realizó analizando las secuencias de las 10 isoenzimas de HDAC de humano en formato FASTA, mediante el programa ClustalW2, el resultado se concentra en la *figura 6*. El alineamiento mostró la separación en las dos clases, y se observó que el sitio catalítico está altamente conservado, lo que concuerda con la literatura ya que todas las isoformas realizan la misma reacción y su actividad depende de los factores nucleares que las recluten^[63]. Los residuos cercanos al sitio catalítico que son diferentes entre las isoformas, se interpretan como no necesarios para la estructura y/o la función, y son estos sitios los que pueden ser utilizados para crear compuestos selectivos, situación que al momento se ha reportado como difícil, ya que la mayoría de los HDAC's contiene un sustituyente químico que quela al ion zinc del sitio catalítico, razón por la que son no selectivos.

Al realizar la búsqueda en de isoformas de HDAC en Protein Data Bank, solo se encontró cristalizada aquella perteneciente a la isoforma 8, y se eligieron dos estructuras obtenidas en condiciones diferentes: una en complejo con ácido hidroxámico (N-HYDROXY-4-(METHYL{[5-(2-PYRIDINYL)-2THIENYL]SULFONYL} AMINO) BENZAMIDE) con resolución de 2.5 Å y código PDB: 1W22^[64]; la otra estructura se cristalizó con un polipéptido inhibidor, con resolución de 2.0 Å, una mutación en el sitio catalítico (W306F) y código PDB: 2V5W^[65].

Síntesis y evaluación in silico e in vitro de derivados del ácido valproico como antineoplásicos

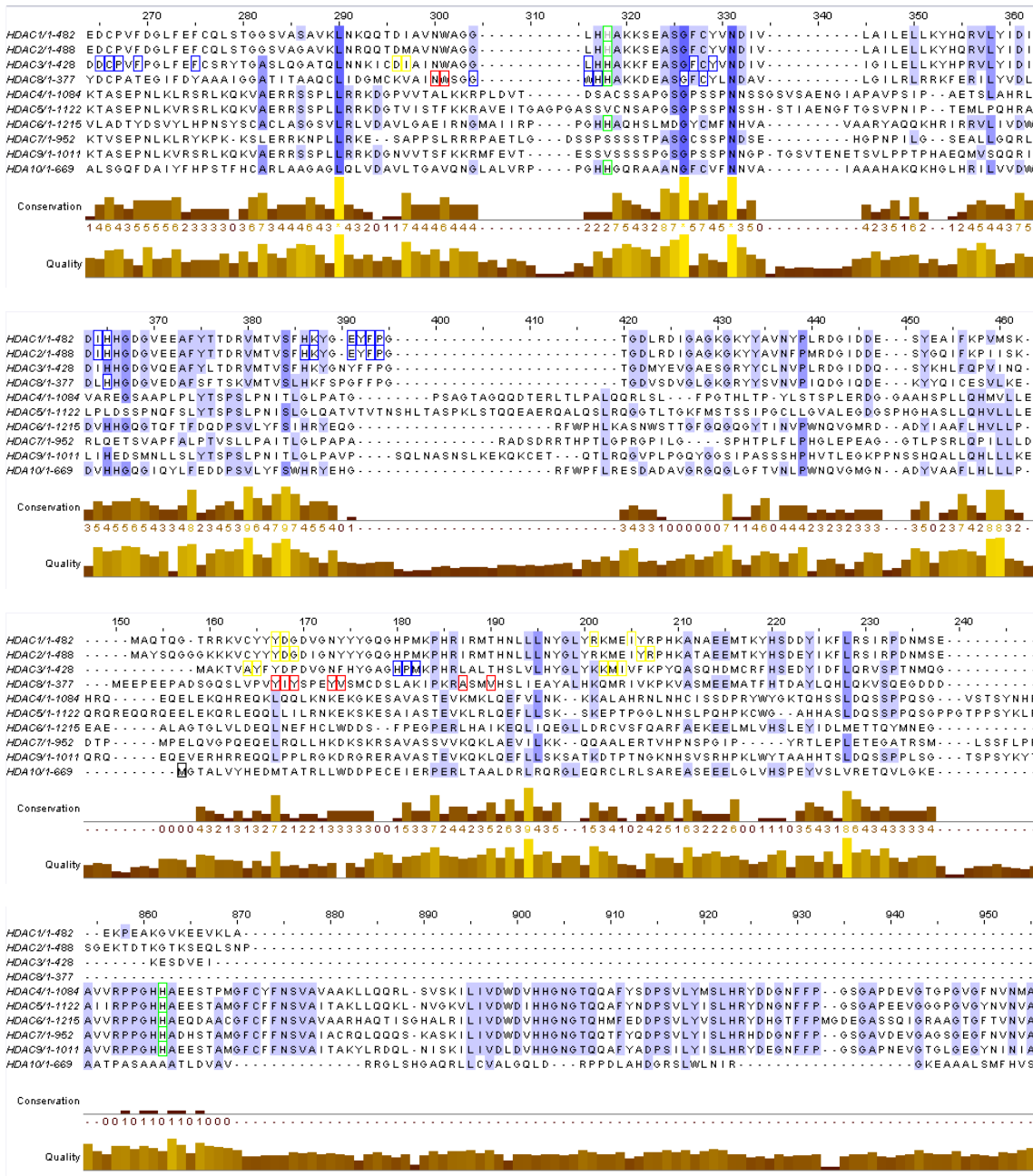


Figura 6. Alineamiento múltiple de las HDAC's de clase 1 y 2. Con verde se marcan los residuos del sitio catalítico. Códigos de fasta en Swissprot, HDAC1: Q13547, HDAC2: Q92769, HDAC3: O15379, HDAC4: P56524, HDAC5: Q9Z2V6, HDAC6: Q9UBN7, HDAC7: Q8WUI4, HDAC8: Q9BY41, HDAC9: Q9UKV0, HDAC10: Q969S.

Se decidió utilizar ambas estructuras en los estudios de docking para contrastar resultados y evidenciar de mejor forma al compuesto con mejores probabilidades de éxito.

El resto de isoformas fueron sometidas a los servidores de SwissModel y I-Tasser

para obtener la estructura tridimensional de forma teórica, los resultados de cada una se sometieron a un análisis de alineamiento tridimensional con el software STRAP y con los gráficos de Ramachandran de cada una (*Figura 7*). Lo que se concluyó fue usar las estructuras obtenidas mediante SwissModel para minimizar su energía, ya que presentaban mayor homología tridimensional con ambas HDAC8 cristalizadas y sus gráficos de Ramachandran estaban en niveles aceptables (las combinaciones de ángulos phi y psi se encontraban en sitios permitidos), además, los residuos que se encontraron en zonas no permitidas no pertenecían al sitio catalítico; la diferencia que encontramos entre las estructuras de ambos servidores se puede deber a que SwissModel construye la estructura a través de moldes (de ahí el nombre plegado por homología), mientras que I-Tasser pliega a la proteína de manera totalmente empírica, este último método tiene mayor funcionalidad cuando no se cuenta con homólogos cristalizados.

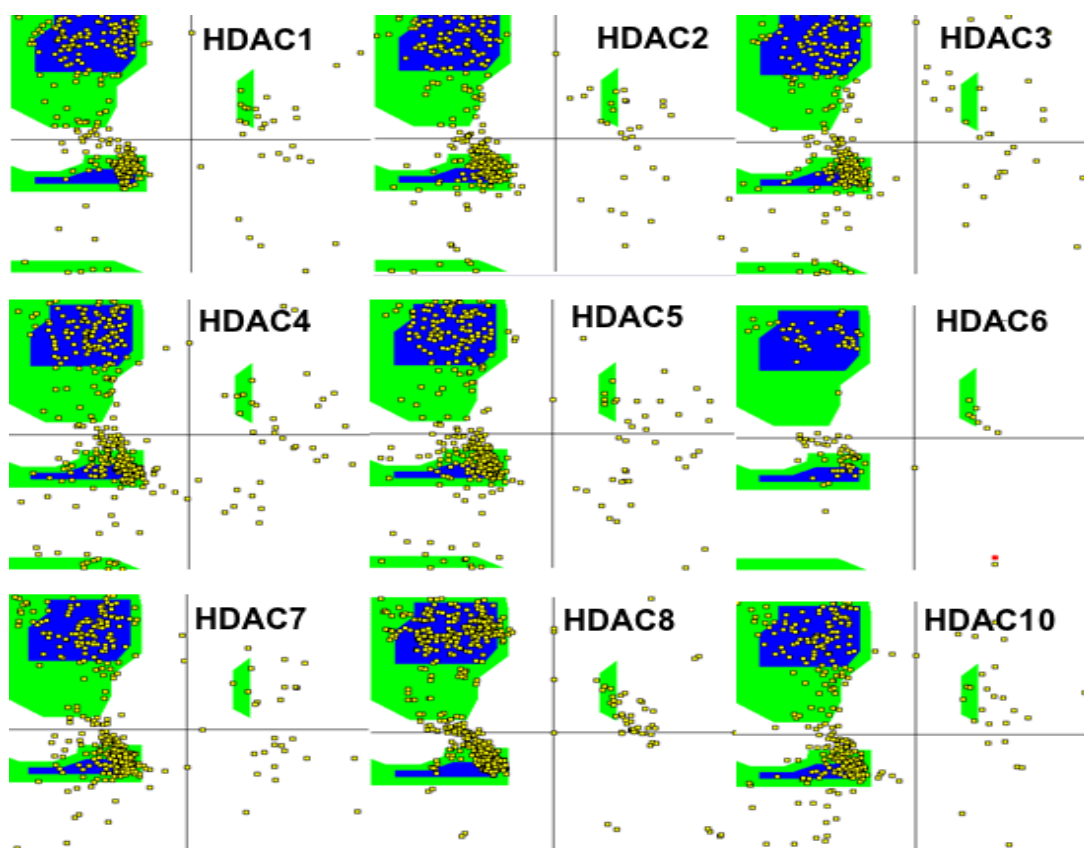


Figura 7. Gráficos de Ramachandran de cada una de las isoformas de HDAC.

7.2 Docking con HDAC8

Antes de realizar el tamizaje de la farmacoteca en una isoforma de la HDAC, condujimos un análisis teórico usando al VPA en las diferentes proteínas disponibles de esta familia, esto con el fin de encontrar aquella que nos mostrase mejor interacción con el VPA y por tanto, resultara más adecuado analizar al resto de la farmacoteca en esa isoforma. Los resultados de esto se encuentran en la *tabla 1*, en ella observamos que la isoforma con mayor afinidad por VPA es aquella que se encuentra cristalizada (HDAC8), también se encuentra una marcada diferencia entre las afinidades hacia las enzimas pertenecientes a ambas clases; cabe mencionar que se cuenta con datos experimentales (k_i sobre HDAC1: 0.4 mM)^[66] que se aproximan mucho a los valores de afinidad predichos por nuestra simulación (k_d sobre HDAC1: 0.5 mM).

Por otro lado, decidimos realizar una búsqueda intencionada de la unión del VPA con una región de la proteína que Vannini et al en 2007 reportaron como el sitio lanzadera del acetilo (SLA) que fue removido durante la catálisis^[65], esta región se encuentra cercana al sitio esteárico y conecta con el a través de un conducto estrecho, que probablemente sea el responsable de alejar al producto de la reacción y de esta forma hacerla irreversible. En esta búsqueda encontramos que en la isoforma 8 existió una tendencia del VPA a tener mayor afinidad por este sitio que por el sitio catalítico, mientras que en los miembros 1, 2 y 3 de la familia ocurrió lo contrario; en aquellas integrantes de la clase 2 no se tiene claro la ubicación o la existencia de este sitio de liberación de acetato.

Debido a lo encontrado con este análisis, se procedió a tamizar la farmacoteca contra la HDAC8.

Isoforma HDAC	Sitio catalítico		Sitio de liberación de acetato	
	ΔG	K_d (μM)	ΔG	K_d (μM)
1	-4.5	505.36	-2.42	16,790
2	-5.72	568.05	-3.13	5,060
3	-4.16	899.62	-4	1,160
4	-3.43	3,040	*	*
5	-3.55	2,510	*	*
7	-3.2	4,100	*	*
8 (1w22)AD3	-7.16	5.59	-7.27	4.63
8(1w22)AD4	-6.5	17.21	-7.37	3.94
8(2v5w)AD3	-6.56	15.5	-7	7.33
8(2v2w)AD4	-5.85	51.16	-7.23	5.01

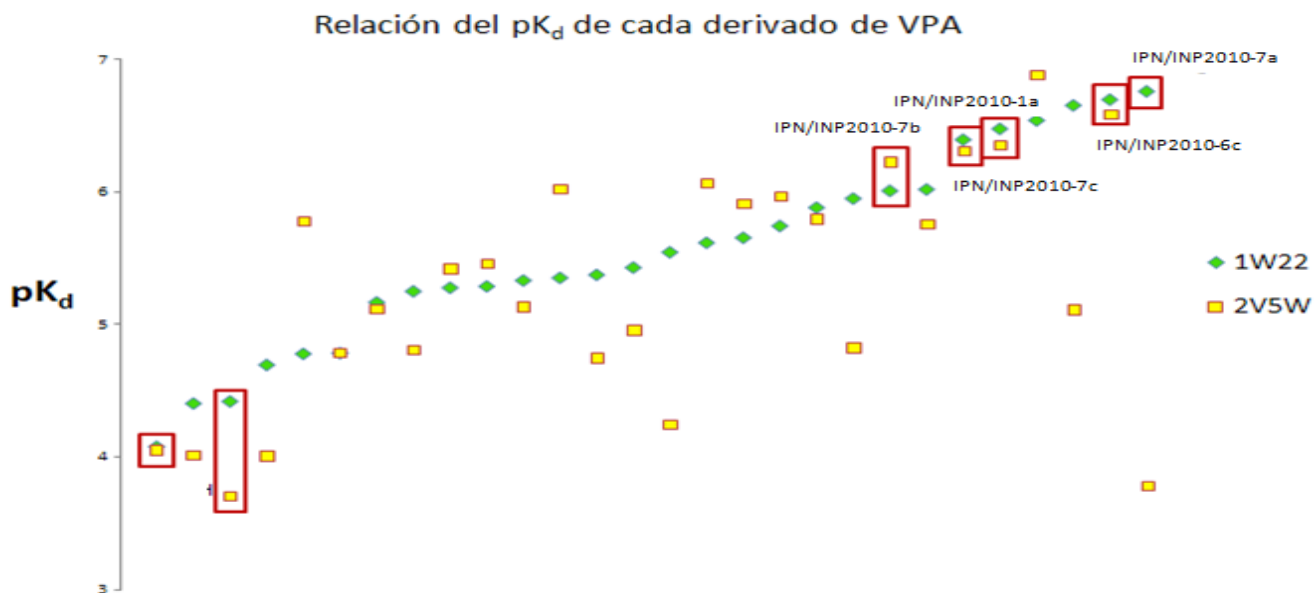
Tabla 1. Resultados del docking con VPA con diferentes isoformas de HDAC. Entre parentesis esta el código de PDB. AD3: AutoDock 3. AD4: AutoDock 4.

Mediante la simulación docking, se obtuvieron tanto las energías libres, como las constantes de disociación de cada compuesto, contra las 2 estructuras experimentales de la HDAC8 (PDB code: 1W22 y 2V5W) y en la *tabla 2* se resumen estos valores.

Compuesto	HDAC8			
	1w22		2v5w	
	ΔG	K_d (μM)	ΔG	K_d (μM)
Ac Valpróico	-7.27	4.63	-7	7.33
IPN/INP2010-0	-7.41	3.7	-8.12	11.1
IPN/INP2010-1a	-8.83	0.335	-8.25	0.442
IPN/INP2010-1b	-7.84	1.8	-8.15	1.07
IPN/INP2010-1c	-8.21	0.956	-7.86	1.74
IPN/INP2010-2a	-6.41	20	-5.46	98.8
IPN/INP2010-2b	-7.22	5.12	-7.45	3.49
IPN/INP2010-2c	-7.2	5.25	-7.39	3.81
IPN/INP2010-3b	-7.33	4.42	-8.21	0.952
IPN/INP2010-3c	-7.71	2.21	-8.07	1.22
IPN/INP2010-4a	-6.04	37.6	-5.05	198
IPN/INP2010-4b	-6.01	39	-5.47	98.1
IPN/INP2010-4c	-7.66	2.41	-8.27	0.864
IPN/INP2010-5a	-7.57	2.84	-5.79	57.5
IPN/INP2010-5b	-8.03	1.31	-7.91	1.6
IPN/INP2010-5c	-9.07	0.223	-6.97	7.75
IPN/INP2010-6a	-5.57	82.5	-5.52	89.5
IPN/INP2010-6b	-8.12	1.12	-6.58	15
IPN/INP2010-6c	-9.13	0.202	-8.98	0.261
IPN/INP2010-7a	-9.22	0.175	-5.15	167
IPN/INP2010-7b	-8.2	0.978	-8.49	0.594
IPN/INP2010-7c	-8.72	0.404	-8.6	0.493
TSA	-8.92	0.289	-9.39	0.131

Tabla 2. Energías libres y constantes de disociación obtenidas para cada compuesto. En rojo se encuentran los compuestos con mejores valores.

Nuestros resultados indican que los mejores compuestos fueron IPN/INP2010-1a, IPN/INP2010-6c, IPN/INP2010-7a, IPN/INP2010-7b e IPN/INP2010-7c, ya que presentaron las constantes de disociación más bajas (de forma indirecta mayor afinidad), la cual se evidenciaba mejor en la *gráfica 1*; cabe señalar que esta situación se ve favorecida debido al tipo de sustituyente químico y de su posición en el espacio.



Gráfica 1. Relación de pK_d ($-\log K_d$) de cada compuesto con las dos enzimas.

En la *figura 8* se observa la interacción de los derivados con las mejores afinidades de acuerdo a la simulación, y puede apreciarse que independientemente de la sustitución de cada compuesto, la orientación en el espacio del sitio catalítico es muy semejante, esto es debido a que las cadenas alifáticas estabilizan al compuesto en la entrada de la garganta en todos los casos (*figura 8* abajo), y la diferencia en la afinidad radica en el tipo y cantidad de interacciones débiles (fuerzas de Van der Waals e interacciones aromáticas como π - π o π -catión) provocado por el grupo químico sustituto que presenta un compuesto dado con los residuos de la profundidad del sitio (principalmente His180, Tyr306, Trp141, His142), y que el grupo funcional amida interactúa electrostáticamente con el átomo de Zinc en aquellos derivados que otorgan una carga parcial negativa al compuesto (*figura 8* izq).

En lo que respecta al VPA (*fig 9*), se observa que cuando se acerca al sitio catalítico, el grupo carboxilo interactúa electrostáticamente con el Zn, es importante señalar que se observó una energía menor de interacción con HDAC cuando esta sucedía en el sitio de liberación de acetato, para ello se realizó un docking dirigido y la energía se mantuvo menor en este último. Al añadir a la situación anterior que en esta enzima se encontraron las menores constantes de disociación, en comparación con

las otras isoformas y que según el alineamiento múltiple los aminoácidos que constituyen al SLA no están tan conservados aún entre las enzimas de la misma clase, podría explicarse esta mayor estabilidad con el subtipo 8, por lo que este hecho sera estudiado más profundamente mediante dinámica molecular.

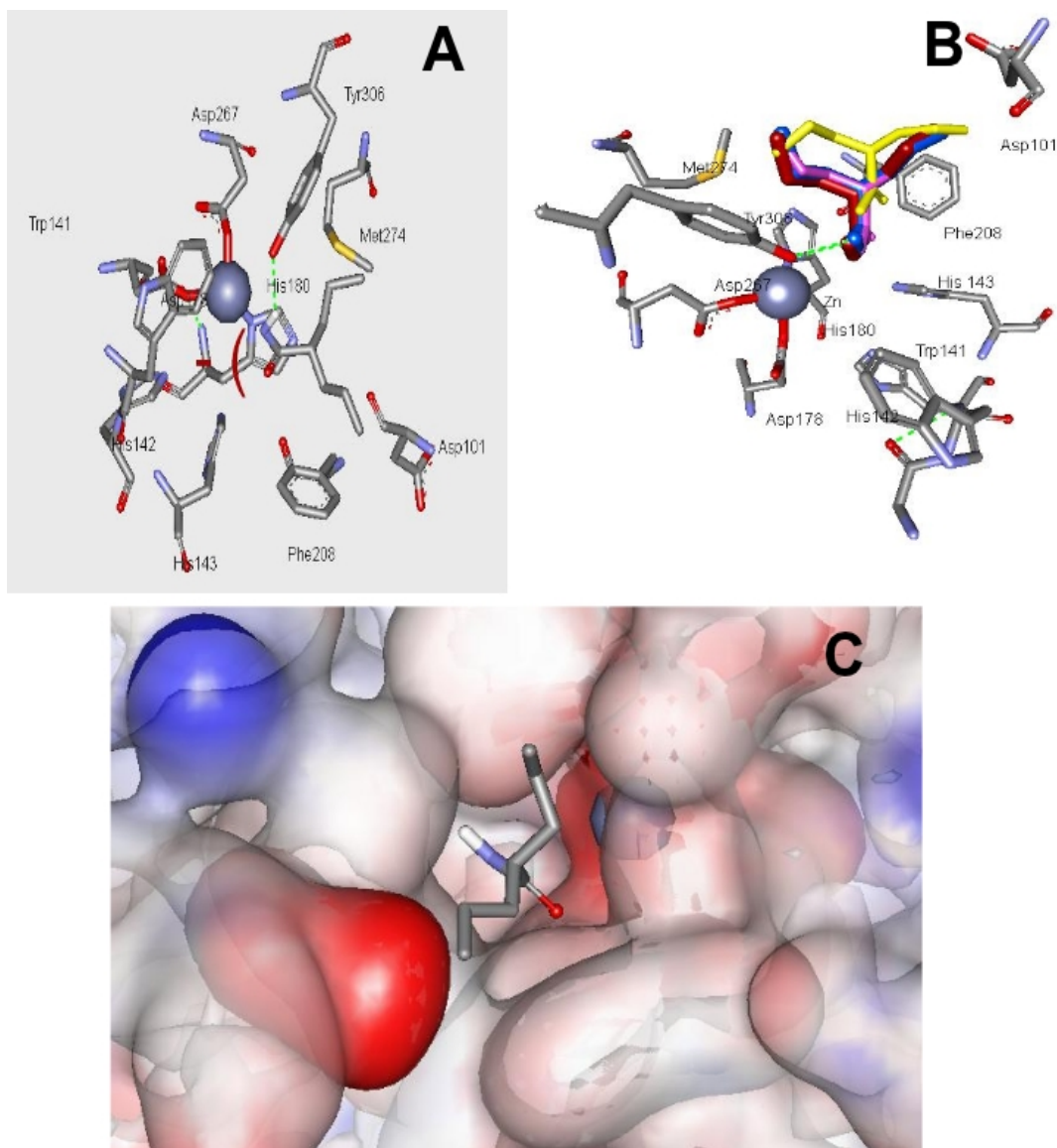


Figura 8. Interacciones del compuesto IPN/INP2010-1a, donde se observa la carga negativa expuesta en el sitio donde se realizó la derivación [A] y de IPN/INP2010-6c (rojo), IPN/INP2010-7a(morado), IPN/INP2010-7b(amarillo) y IPN/INP2010-7c (azul) [B]. Interacción de IPN/INP2010-1a con la superficie de la proteína [C]

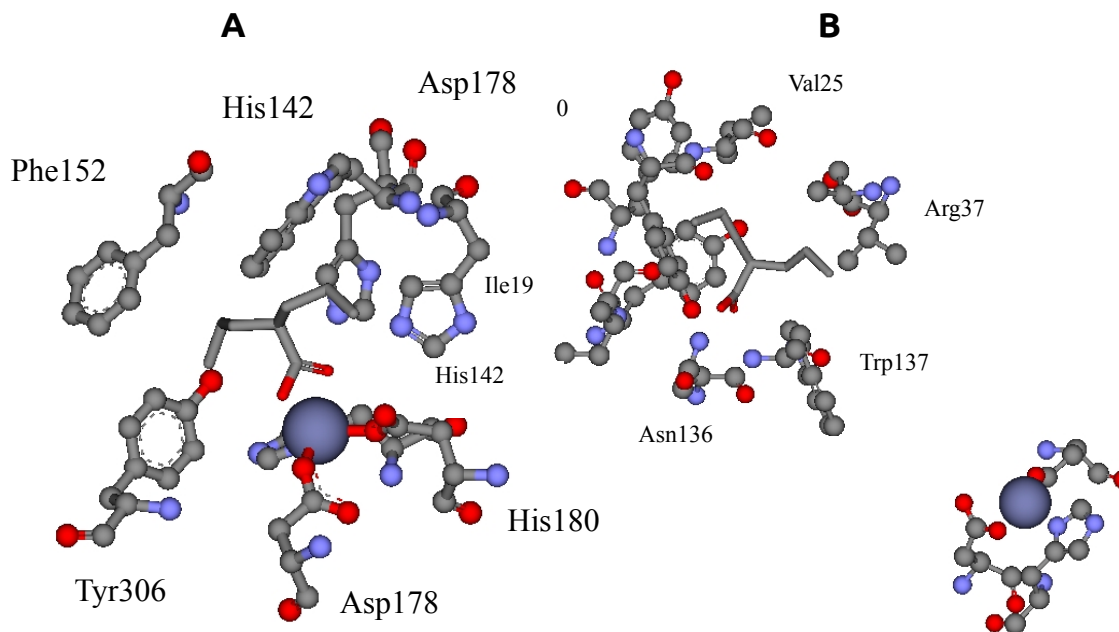


Figura 9. Interacción del VPA en el sitio catalítico (A) y en el sitio de liberación del acetilo (B).

7.3 Docking con CYP2C9

Una vez evaluados los compuestos por docking sobre la HDAC, se efectuaron estos estudios sobre el CYP2C9 (*tabla 3*) de forma teórica, observamos que la afinidad hacia el citocromo aumenta en orden de 10 veces, en comparación con el VPA; es posible interpretar lo anterior como un aumento en la interacción a nivel biológico de ambas moléculas. En lo que respecta a la predicción de la formación del metabolito tóxico secundario a la biotransformación del VPA, al observar la *figura 10*, es notorio que el ácido valproico (*fig 8, amarillo*) orienta una de sus cadenas alifáticas en dirección al grupo HEM, donde el producto enólico es formado (4-ene-valproico), la situación contraria es observada para el derivado propuesto (*fig 8, rojo*), ya que en dirección al grupo HEM se orientado el sitio sustituido, por lo que podría inferirse que el metabolito toxico^[29] (originado de la cadena alifática) no se producirá y de ser producido, lo hará en pequeña cantidad.

Compuesto	CYP2C9	
	ΔG	k_d (μM)
VPA	-4.25	765.32
IPN/INP2010-0	-5.49	93.98
IPN/INP2010-1a	-5.56	84.66
IPN/INP2010-1b	-5.19	157.22
IPN/INP2010-1c	-4.9	254.49
IPN/INP2010-2a	-5.5	92.96
IPN/INP2010-2b	-5.58	81.32
IPN/INP2010-2c	-5.51	91.99
IPN/INP2010-3b	-5.62	75.88
IPN/INP2010-3c	-5.46	99.81
IPN/INP2010-4a	-5.74	61.96
IPN/INP2010-4b	-5.85	51.44
IPN/INP2010-4c	-6.03	38.26
IPN/INP2010-5a	-5.69	67.18
IPN/INP2010-5b	-5.28	134.75
IPN/INP2010-5c	-5.34	121.24
IPN/INP2010-6a	-5.16	164.59
IPN/INP2010-6b	-5.43	104.69
IPN/INP2010-6c	-4.94	239.09
IPN/INP2010-7a	-5.2	153.72
IPN/INP2010-7b	-5.51	91.42
IPN/INP2010-7c	-4.82	293.64

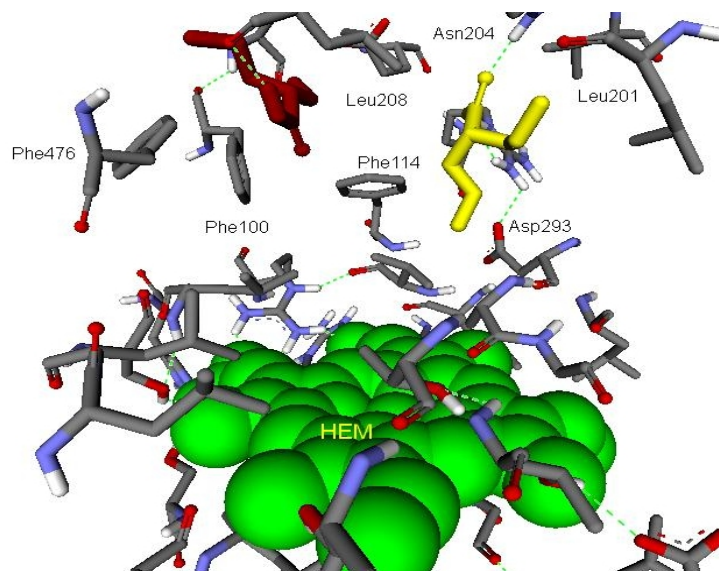
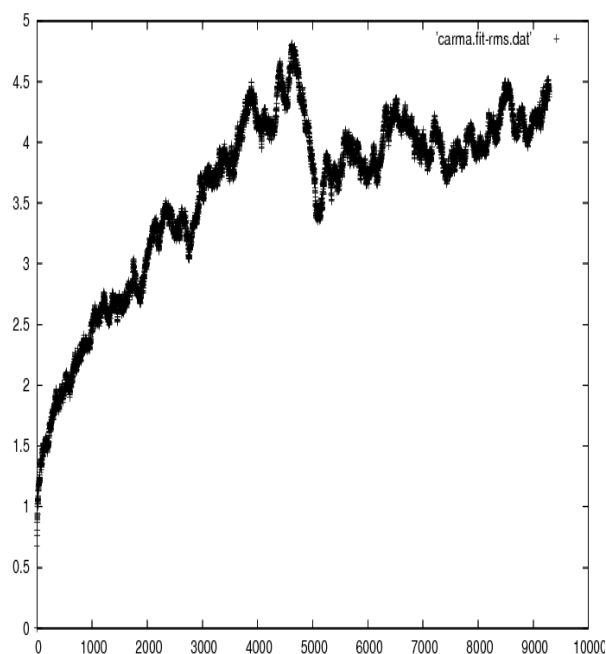


Figura 10. Interacción del VPA (amarillo) y del un compuesto propuesto (rojo) en el sitio catalítico de CYP2C9, en verde se representa el grupo HEM.

Tabla 3. Energías libres y constantes de disociación de la farmacoteca, cuando se hizo interactuar con CYP2C9.

7.4 Dinámica molecular de HDAC8

Los estudios de dinámica molecular fueron empleados para explorar el movimiento de la proteína y su comportamiento con aguas explícitas, encontrando que se trata de una macromolécula muy estable en el tiempo, como se refleja en el RMSD (*gráfica 2*), donde de manera temprana, las distancias relativas de los carbonos alfa varían en grado moderado, pero cuando el tiempo avanza, las variaciones disminuyen, lo que se interpreta como estabilidad conformacional.



Gráfica 2. RMSD de la dinámica molecular de HDAC8.

Snapshot	Sitio activo		Liberacion de acetato	
	ΔG	k_d (μM)	ΔG	k_d (μM)
0	-6.23	27.34	-7.01	7.29
0.5	-3.66	2080	-5.02	210
1.5	-4.66	386.31	-6.51	16.78
2	-4.8	304.52	0	0
2.5	-4.83	290.43	-5.66	70.76
3	-4.99	219.03	-6.04	37.12
3.5	-6.28	25.03	-6.18	29.36
4	-5.07	191.19	-5.46	99.4
4.5	0	0	0	0
5	-4.4	592.44	-6.27	25.25
5.5	-4.6	426.79	-6.41	19.94
6	-4.38	611.53	-6.8	10.41
6.5	-4.71	350.34	0	0
7	-5.33	124.82	0	0
7.5	-4.14	925.57	0	0
8	-4.67	375.86	0	0
8.5	-4.61	419.32	0	0
9	-4.83	289.26	0	0
9.5	-4.62	411.43	0	0

Tabla 4. Energías libres y constantes de disociación de VPA en el sitio catalítico y en de liberación de acetato, en cada confórmero obtenido de la DM.

La simulación docking del VPA con cada confórmero obtenido de la DM se resume en la *tabla 4*, donde puede apreciarse la variación de la afinidad con respecto al tiempo, esto es debido a que las distancias de los residuos, tanto en el sitio catalítico como en el de liberación de acetato, se modifican en el tiempo, por ejemplo, existen momentos conformacionales en que el SLA (sitio de liberación del acetato) no permite la interacción con VPA, la misma tendencia se observa en el sitio catalítico, aunque es importante destacar que en este existe una mayor tendencia a la mantenerse afín.

En la *figura 11*, se aprecia la apertura por la que la HDAC8 deja escapar al acetato de la reacción, existen momentos en los que se encuentra semi cerrada junto con el

conducto que lo conecta con un sitio colector (*fig 11 izq*), y otros en los que la puerta esta abierta y el conducto esta lo suficientemente ancho para permitir la difusión de la molécula de acetato (*fig 11 der*). En la *figura 11 (abajo)* se observan los residuos que componen la puerta de salida del SLA y sus cambios en el tiempo; los aminoácidos que contribuyen de forma mas importante son His42, His51, Glu46 y Lys52.

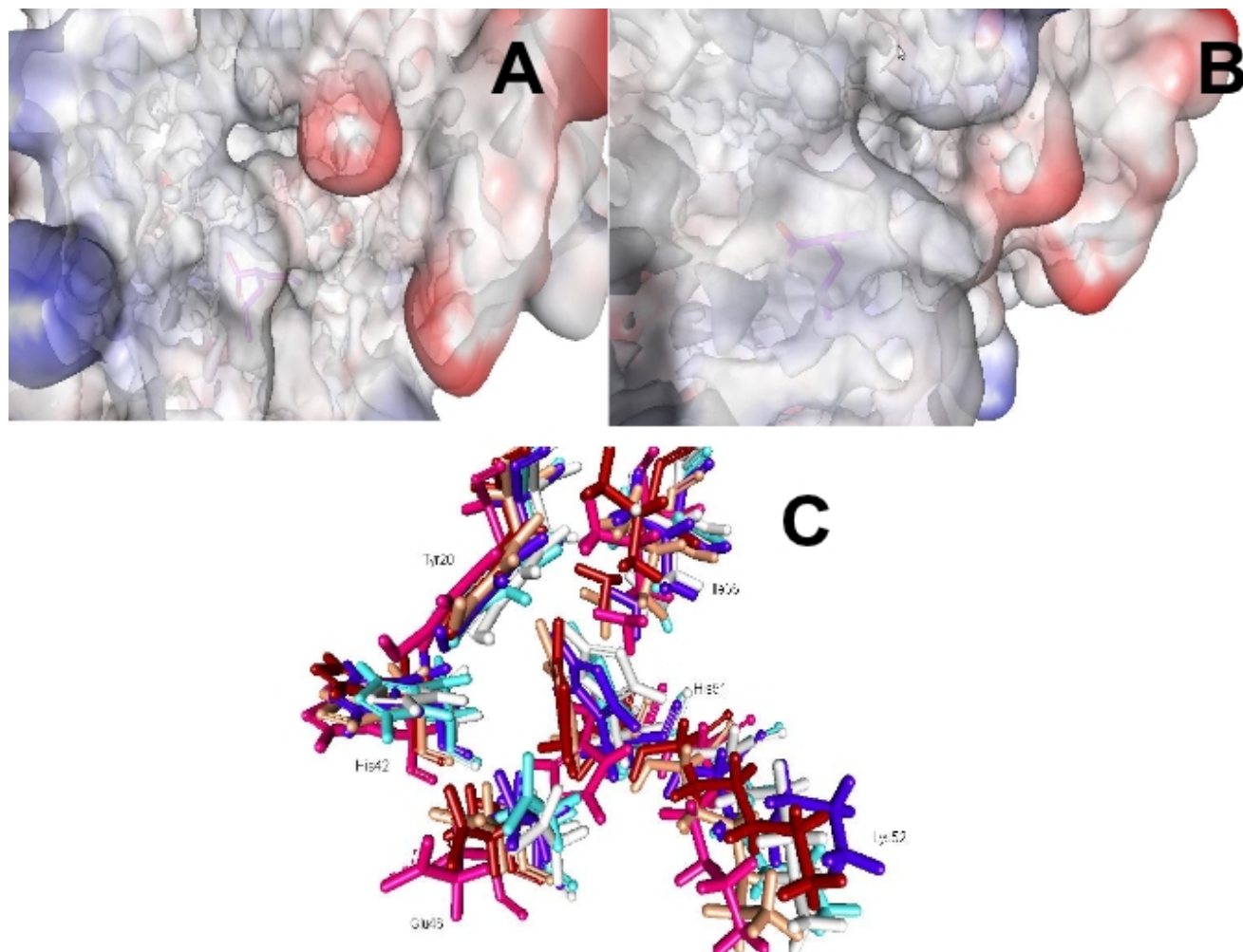


Figura 11. Cambios de la puerta de salida de SLA. A: la abertura esta parcialmente cerrada. B: la abertura esta abierta junto con el canal que conecta con el interior. C: residuos que componen la puerta a diferentes tiempos, 4.5 (rosa), 5.5 (rojo), 6.5 (crema), 7.5 (azul), 8.5 (gris) y 9.5 (azul cielo) ns.

7.5 Síntesis y caracterización

Debido a los resultados discutidos en las secciones anteriores, se decidió intentar la síntesis de los 5 compuestos con mayor probabilidad de éxito, estos fueron: IPN/INP2010-1a, IPN/INP2010-6c, IPN/INP2010-7a, IPN/INP2010-7b y IPN/INP2010-7c.

Se siguió la metodología descrita en la sección correspondiente con los siguientes resultados: el compuesto IPN/INP2010-1a se logró sintetizar con éxito (con un rendimiento de aproximadamente 63%), con un remanente de materias primas que fue removido mediante separación por fases agua-hexano, ya que nuestro compuesto es insoluble en ambos, el ácido valproico es soluble en hexano y la segunda materia prima en agua. Una vez que se contó con el compuesto puro se inicio la caracterización mediante cromatografía de capa fina en placas de silica gel y usando una proporción de solventes hexano-acetato de etilo (1:1) se encontró un RF de 0.17; el punto de fusión (PF) se estableció después de 3 mediciones como de 67.3 ± 1.7 . El espectro infrarrojo (*figura 12*) reveló la desaparición de las señales del grupo carboxilo del ácido valproico y del grupo amina de la segunda materia prima (espectros de las materias primas en la sección de anexo) y la aparición de las señales características de un grupo amida (C-N = 1242; N-H = 2959) la formación de este enlace nos sugiere que la reacción se llevo a cabo correctamente.

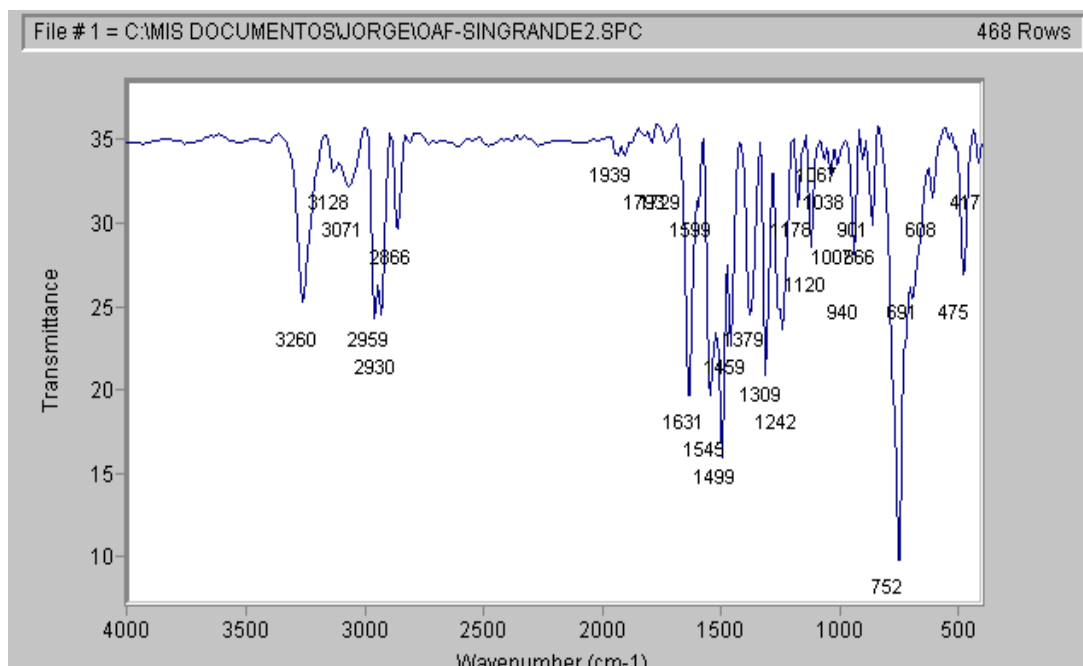


Figura 12. Espectro infrarrojo del Compuesto IPN/INP2010-1A.

Posteriormente se realizó una resonancia magnética nuclear de ¹³C y de protón a 300 MHz (*figuras 13 y 14*), en ellas se encontró de igual forma que la señal del grupo carboxilo (señal localizada a campo bajo o a más partes por millón) del VPA estaba ausente, lo que significa que este reaccionó a partir de esta región y que el compuesto estaba libre de esta materia prima; por otro lado, la cantidad de señales de carbono correspondió de forma exacta con las predichas para nuestro compuesto; de forma semejante, la cantidad y correlación de señales de protones correspondió tanto a la cantidad de ellos, al tipo de sustituyente al que están unidos y a la relación espacial entre ellos, caracterizada por la constante de acoplamiento. Se realizó un análisis elemental de este compuesto, el cual reporto: Teórico: C(71.46) H(8.545) N(5.95); Experimental: C(71.805) H(8.99) N(6.455); desviación c(0.49%) H(4.95%) N(7.82%). Con todos los datos expuestos anteriormente concluimos que la síntesis del compuesto IPN/INP2010-1a se llevo a cabo con éxito y con buena pureza.

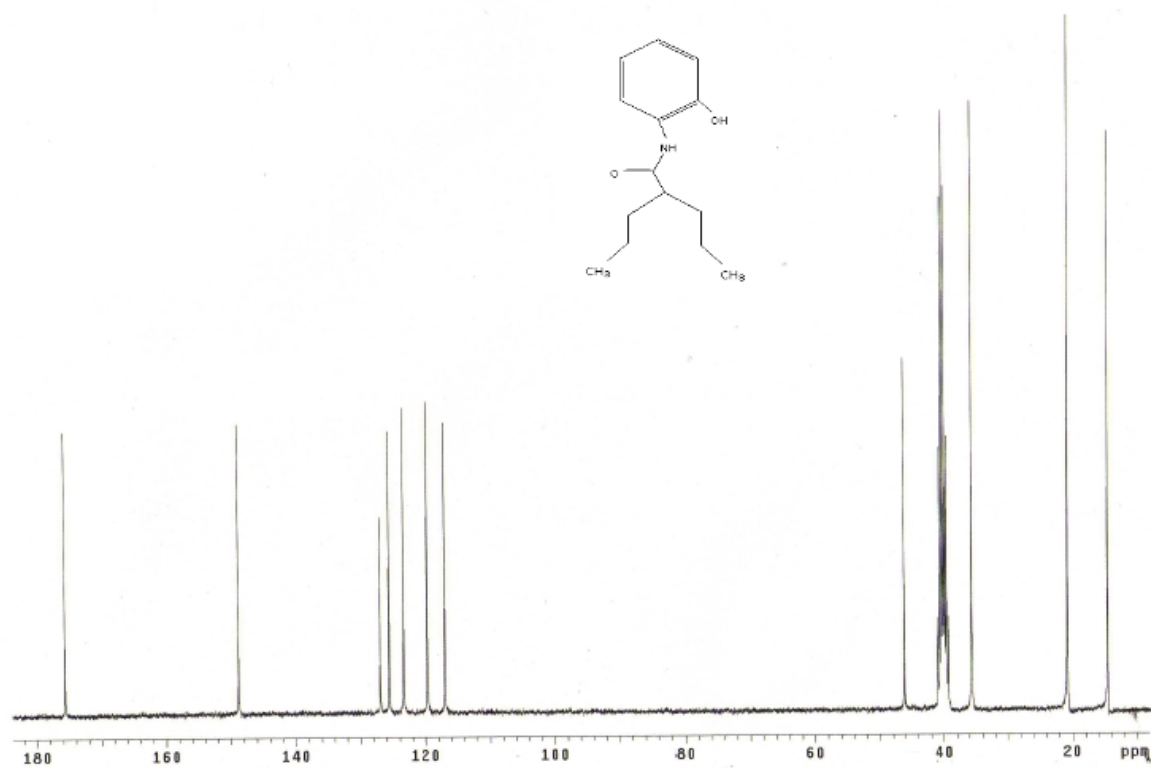


Figura 13. Espectro de RMN de C^{13} del compuesto IPN/INP2010-1A.

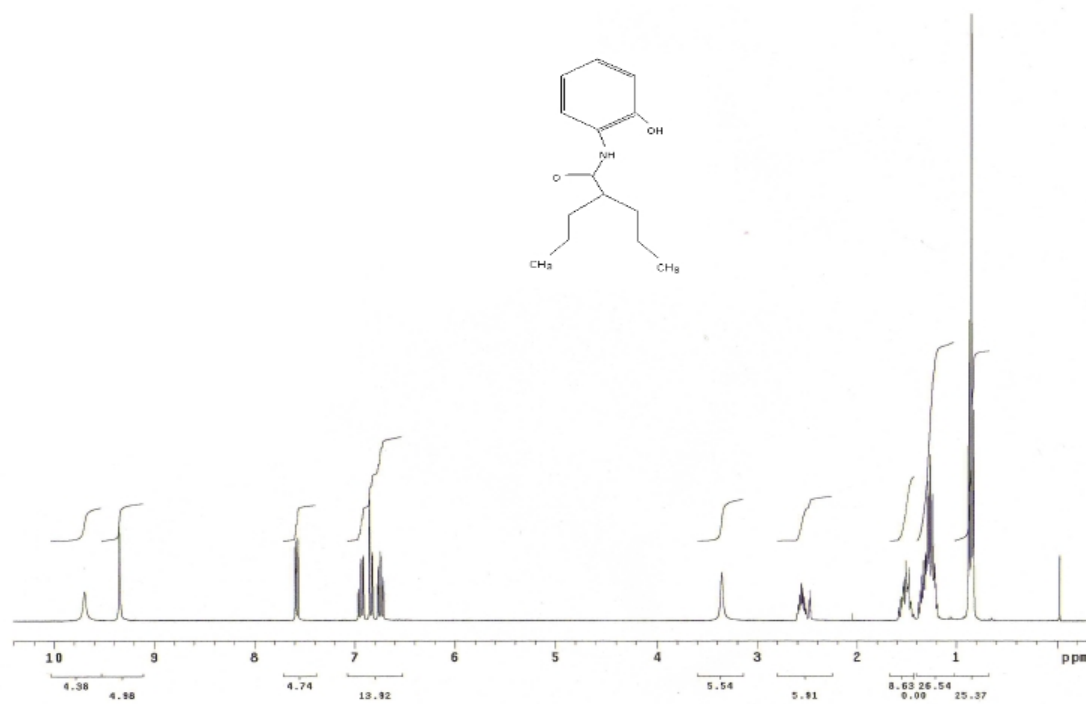


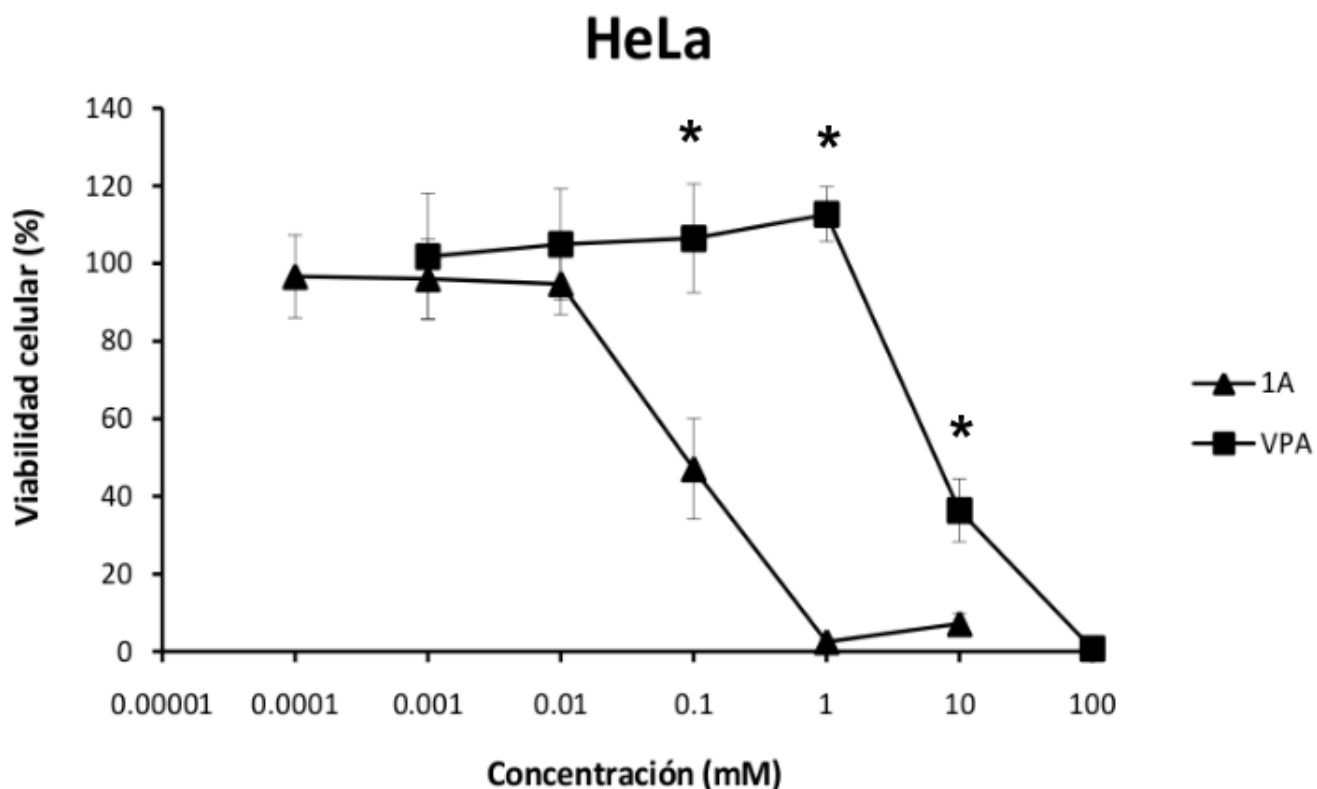
Figura 14. Espectro de RMN de protón del compuesto IPN/INP2010-1A.

En cuanto a la síntesis de los otros 4 derivados se tiene lo siguiente: no se logro hacer reaccionar a las materias primas necesarias para obtener al compuesto IPN/INP2010-6c; los compuestos: IPN/INP2010-7a, IPN/INP2010-7b y IPN/INP2010-7c tienen un grupo amino adicional en su estructura, por lo que al realizar la reacción se obtuvo una mezcla de productos, ya que el enlace amida podía formarse entre el cloruro de VPA y cualquiera de los dos grupos amino de la materia prima o con ambos; dado lo anterior se intento separar la mezcla mediante fases, cristalización, precipitación con hexano en frío, filtrado por gravedad y al vacío, cromatografía en columna de silica; desafortunadamente ninguno de ellos dio resultados aceptables, por tanto, y ya que se cuenta con uno de los derivados con mayor probabilidad de éxito, nuestro grupo de trabajo decidió continuar al siguiente paso del protocolo, evaluando los efectos biológicos de IPN/INP2010-1a.

7.6 Proliferacion y viabilidad

7.6.1 Cancer cervicouterino (HeLa)

Tras la estandarización en el manejo de la línea celular se procedió a la obtención de información sobre el efecto del compuesto sintetizado (IPN/INP2010-1a, de quien en adelante nos referiremos como 1A), y contrastarlo con aquel obtenido con VPA. Se construyo una curva concentración respuesta, donde en el eje de las abscisas se colocaron concentraciones crecientes en unidades logarítmicas de fármaco (VPA de 0.001mM a 100mM y 1A de 0.0001mM a 10mM) y en el eje de las ordenadas se tabuló el efecto interpretado como descenso de la viabilidad en porcentaje con respecto al control (células neoplásicas no tratadas). En la *gráfica 3* se observan curvas sigmoideas que reflejan el efecto dosis-dependiente de ambos compuestos con respecto a la disminución de la viabilidad celular; también es posible apreciar que el compuesto 1A es mas potente que el VPA en un orden de 100 veces. Con esta curva fue posible calcular la GI_{50} para cada compuesto, las cuales son 0.92656 mM para 1A y 9.121312 mM para VPA esta ultima ha sido reportada por Dejligbjerg M y cols en 2008 como de 3mM^[67].



Gráfica 3. Curva concentración-respuesta de VPA y 1A en células HeLa.

Ya que contamos con la GI_{50} de cada fármaco, realizamos una siembra de 10^6 células en frascos de cultivo de 25 mL, todos con 5 mL de medio DMEM (solo o en combinación con la concentración GI_{50} de cada fármaco) para dar un seguimiento fotográfico temporal y efecto dependiente del tiempo, el seguimiento se resume en la *figura 15*, en ella observamos existe un mantenimiento de la concentración celular desde las 0 h hasta las 24 h, tanto en 1A como con VPA, también llama la atención que el control incrementa su número de células mientras las células tratadas no lo hacen, esto puede deberse a que los fármacos producen citostasis a la GI_{50} o provocan apoptosis de un porcentaje de las células.

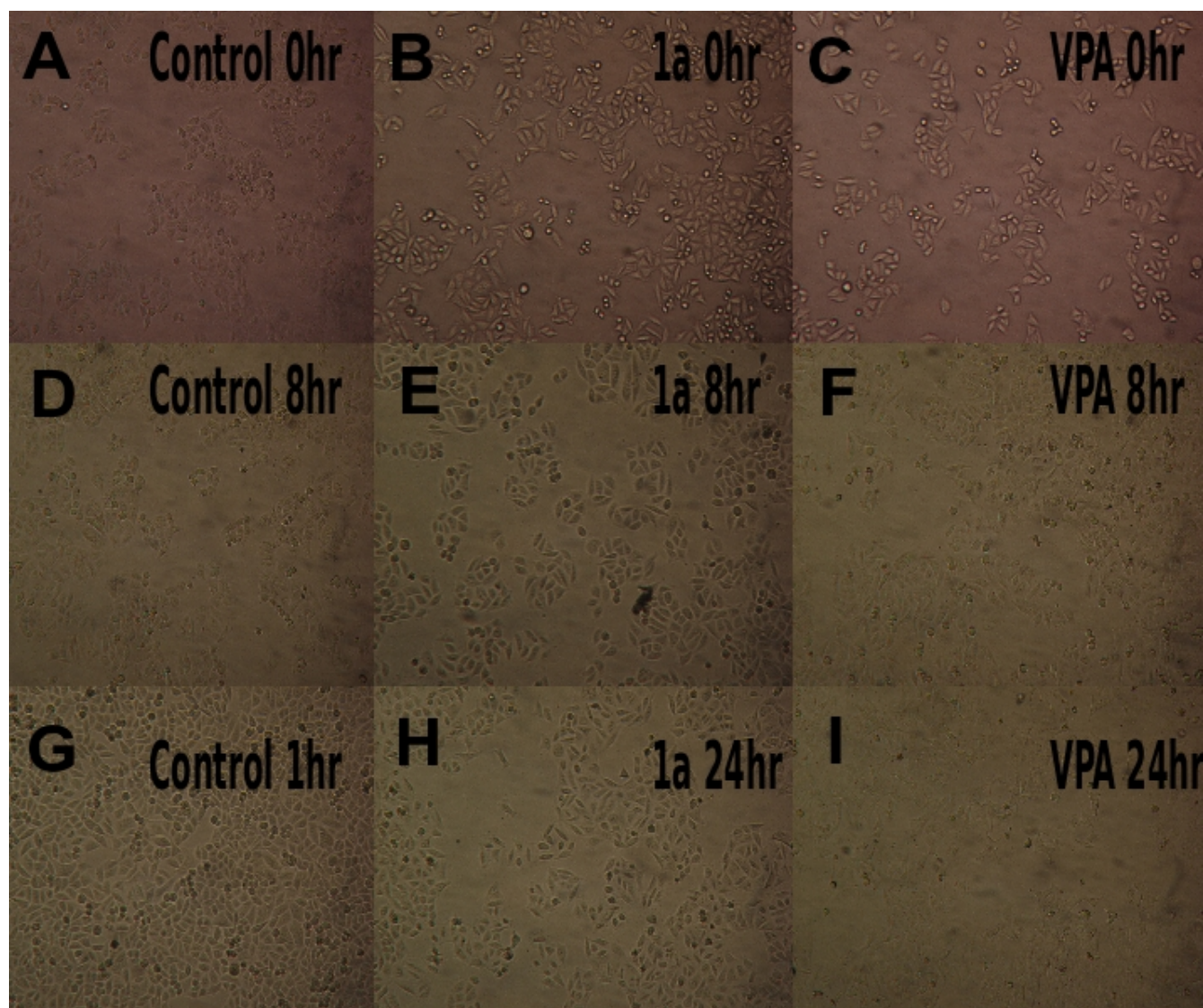


Figura 15. Seguimiento fotográfico tras la administración de la GI_{50} de 1A y VPA. A: control a la hora 0, B: tratamiento con 1A la hora 0, C: tratamiento con VPA a la hora 0, D: control a la hora 8, E: tratamiento con 1A la hora 8, F: tratamiento con VPA a la hora 8, G: control a la hora 24, H: tratamiento con 1A la hora 24, I: tratamiento con VPA a la hora 24.

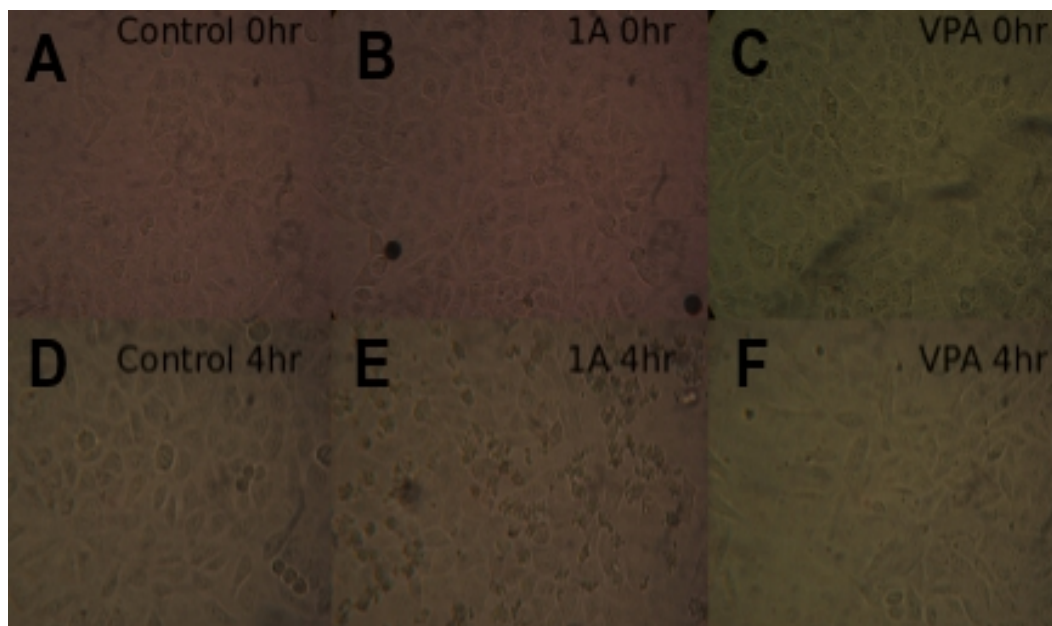


Figura 16. Seguimiento fotográfico tras la administración de la GI_{99} de 1A y VPA. A: control a la hora 0, B: tratamiento con 1A a la hora 0, C: tratamiento con VPA a la hora 0, D: control a la hora 4, E: tratamiento con 1A a la hora 4, F: tratamiento con VPA a la hora 4.

Se realizó un experimento semejante al anterior pero tratando a las células con la concentración aproximada que inhibía el viabilidad del 99% de las células (GI_{99}): 0.01 mM para 1A y 1mM para VPA, el seguimiento fotográfico se resume en la *figura 16*, donde se observa la aparición de detritos celulares en abundancia a las 4 h de tratamiento con 1A, y algunos en el caso de VPA a la misma hora; dado lo anterior se realizó un ensayo de detección de apoptosis (prueba de túnel) para buscar el tipo de muerte celular que causaban ambos fármacos (necrosis o apoptosis), esto se hizo con el kit de detección de apoptosis in situ de takara Inc. el cual se basa, en que el DNA de una célula se fragmenta durante la apoptosis por la acción de endonucleasas, a diferencia de la necrosis, donde esta situación no ocurre; para identificar la fragmentación de DNA se añade la enzima TdT (terminal deoxynucleotide transferase) quien añade nucleótidos a los extremos 3'OH que encuentre en la muestra, los nucleótidos que usamos están marcados con fluorescencia, por lo tanto, al ser estimulados con luz UV, la cantidad de fluorescencia es proporcional a la

cantidad de nucleótidos marcados incorporados al DNA, y esto es proporcional al número de extremos 3'OH (generados por fragmentación). El resultado del ensayo se muestra en la *figura 17*, donde observamos al testigo (células no tratadas) de color rojo y sin fluorescencia, mientras que tras el tratamiento con la GI_{50} se observan algunas células ligeramente positivas de forma dependiente del tiempo (24 h < 48 h) y tras el tratamiento con la GI_{99} por 4 h con ambos fármacos las células son completamente positivas ya que la reacción se observa de forma intensa y predominantemente en núcleo.

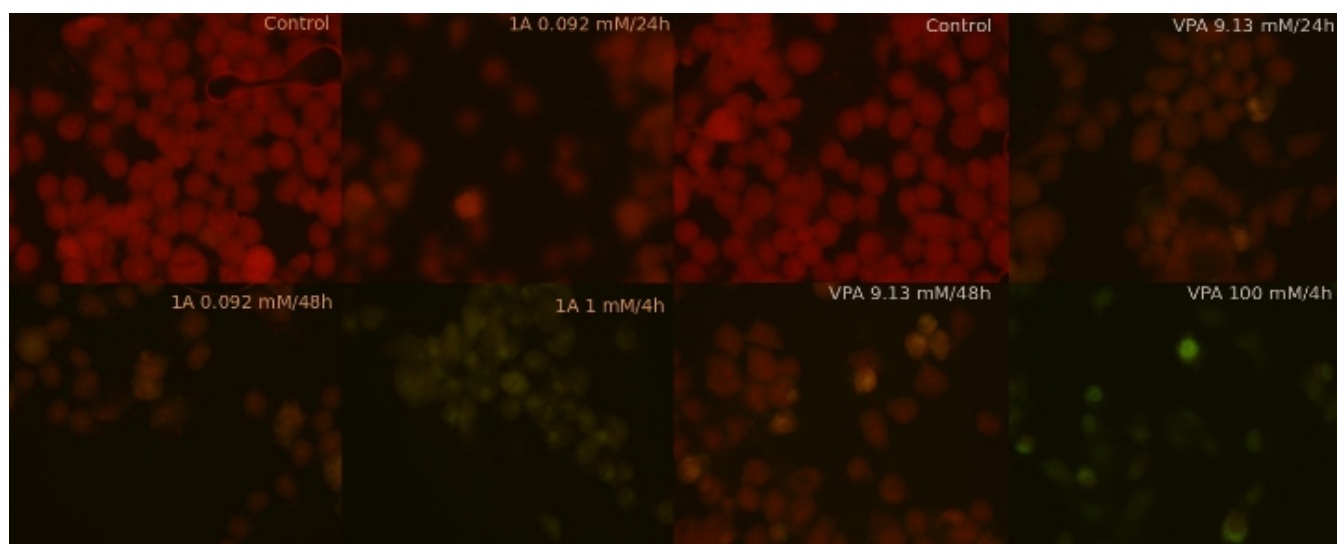
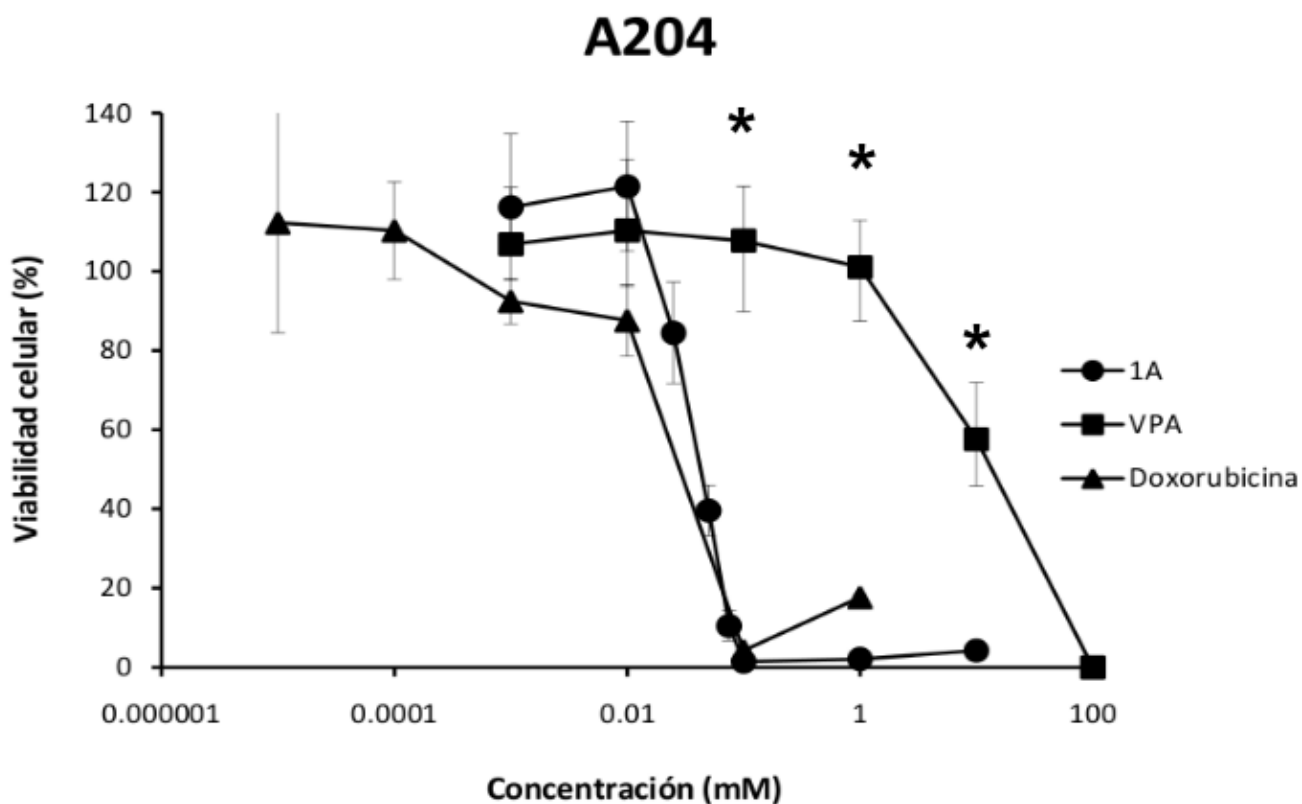


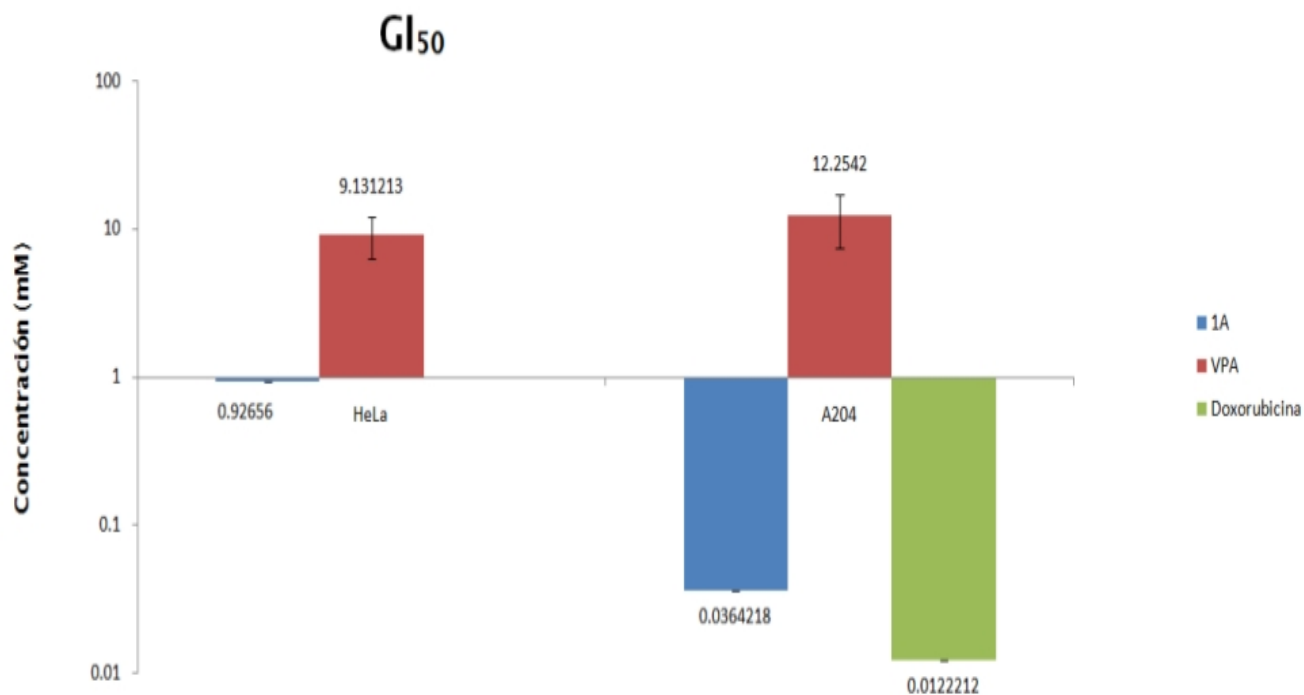
Figura 17. Prueba de túnel para células de HeLa tratadas con 1A y VPA.

7.6.2 Rbdomiosarcoma (A204)

Se realizaron ensayos para identificar la actividad de estos compuestos sobre esta línea tumoral, de la misma forma que en el apartado anterior, en esta ocasión se agregó como control doxorubicina, ya que es parte del tratamiento estándar del rbdmiosarcom. La curva obtenida se resume en la *gráfica 4*, donde se aprecia que el compuesto 1A y la doxorubicina tienen un perfil de inhibición del crecimiento celular parecido, mientras que el VPA es aproximadamente 100 veces menos potente que 1A y doxorubicina; estas curvas se trataron a través del servidor de la universidad de Tokyo para obtener la GI_{50} , las cuales resultaron como sigue: 0.0364218 mM para 1A; 12.2542 mM para VPA y 0.0122212 mM para doxorubicina, estos valores, junto con los obtenidos con células HeLa se concentran en la *gráfica 5*.



Gráfica 4. Curva concentración-respuesta de VPA y 1A en células A204.



Gráfica 5. GI₅₀ de los fármacos de este estudio por línea celular.

7.7 Extracción de RNA

Con el fin de obtener las muestras para buscar los cambios en los perfiles de expresión, se trataron células HeLa (previamente sembradas en frascos de 25 mL) con la GI₅₀ de 1A y VPA por 24 h y 72 h (se formaron 5 grupos: un grupo control de células no tratadas, un grupo tratado con 1A por 24 h y otro tratado por 72 h; un grupo tratado con VPA 24 h y otro por 72 h), posteriormente se desprendieron las células de sus respectivos frascos de cultivo con una espátula para citología y se realizó la extracción de RNA total, esto se hizo por triplicado.

Los resultados de la concentración, pureza e integridad del RNA extraído se resumen en los electroferogramas que se encuentran en la sección anexa. De forma resumida se puede decir que todas las muestras tuvieron concentración adecuada y RIN mayor de 8, por lo que todas fueron procesadas hacia microarreglos.

7.8 Microarreglos

Las 15 muestras obtenidas fueron procesadas con el protocolo Gene Chip 3' IVT Express como se describió en la sección de métodos. Las 15 muestras estaban separadas en 5 grupos que contaban con triplicado (sección anterior).

Para que los microarreglos puedan ser interpretados como confiables debe cumplirse con todos los puntos contenidos en el protocolo (concentración, pureza e integridad del RNA), así como pasar los controles internos con los que cuenta el experimento. El primero los controles es el de hibridación (*figura 18*), en ella se observa que la cantidad de sondas control que hidridó en cada chip (abscisas) es semejante.

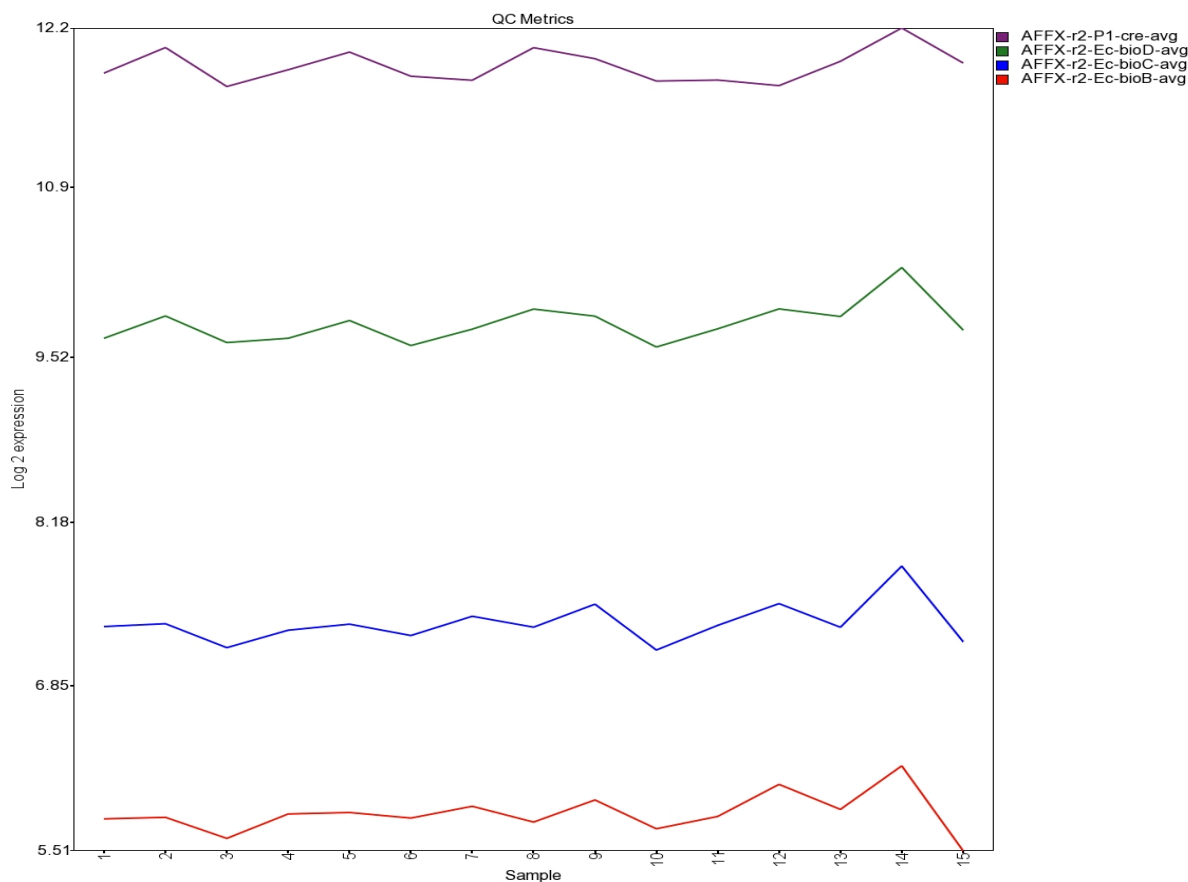


Figura 18. Control de hibridación de microarreglos.

Los siguientes controles: 3' (*fig 19*) y labeling (*fig 20*) se encuentran dentro de lo aceptable y esto se traduce como que los experimentos son comparables.

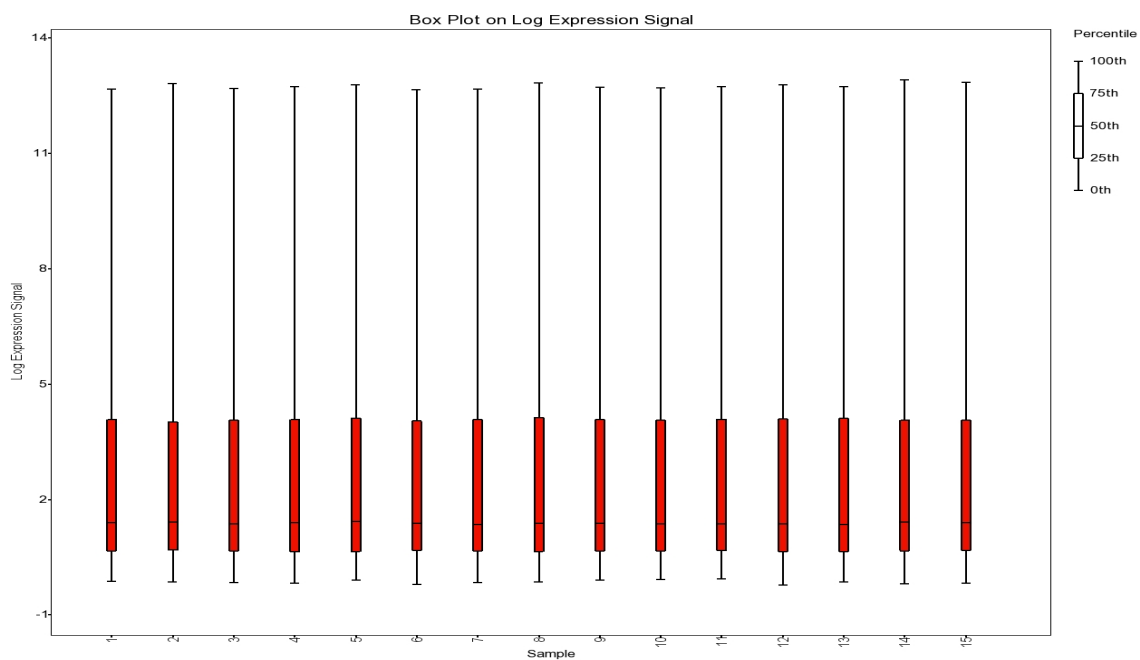


Figura 18. Control 3' de microarreglos.

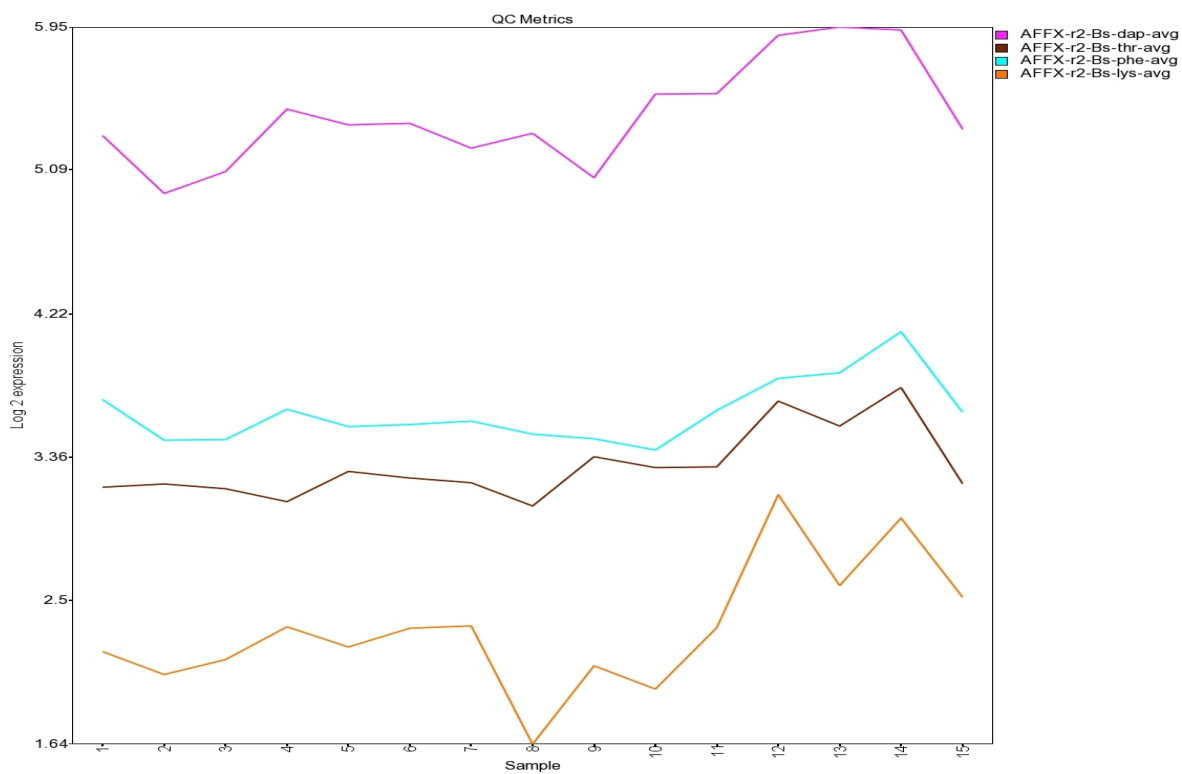


Figura 20. Control de labeling de microarreglos.

El último paso del control de calidad de los experimentos es el comparar las las intensidades de fluorescencia generales del cada arreglos haciendo un histograma (fig 21), en el se aprecia el numero de sondas con la misma intensidad de fluorescencia y su distribución en el espectro de intensidades, después se ubica el rango dinámico (valores que se consideran aceptables o propios del experimento, cualquier valor fuera de este rango se considera ruido); en nuestro caso, todos los experimentos mostraron un comportamiento muy parecido, aunque es importante aclarar que pocas sondas son las que se encontraron dentro del rango dinámico (5-12 unidades).

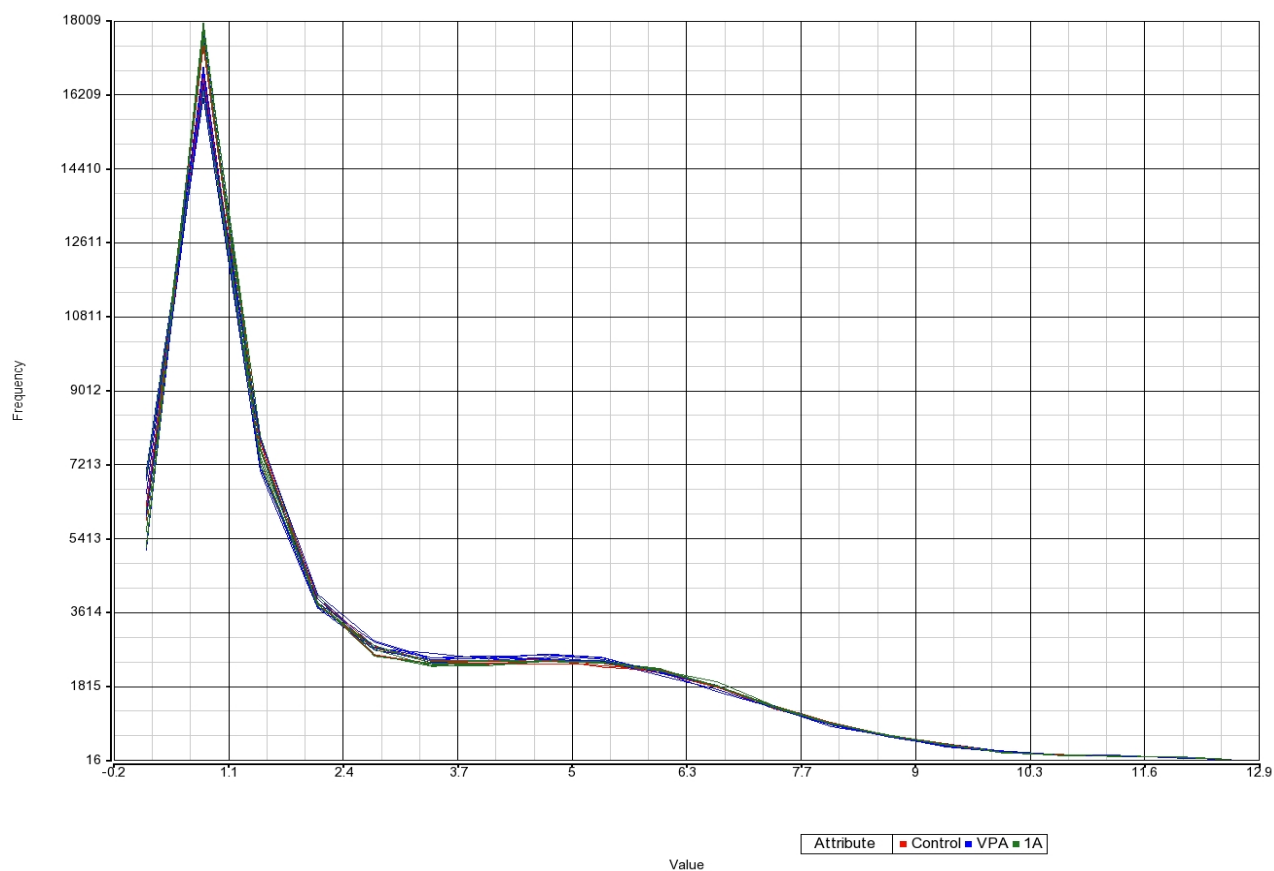


Figura 21. Histograma de intensidades de fluorescencia de todos los experimentos de microarreglos.

Una vez que el análisis de control de calidad fue satisfactorio, se procedió a comparar a los grupos experimentales de forma no jerárquica con un análisis de componentes principales (PCA), este método consiste en utilizar un algoritmo computacional para encontrar 3 características que sean comunes para todos los grupos y que funcionen con significado estadístico para separar o unir grupos, dependiendo la forma en que expresen ese rasgo.

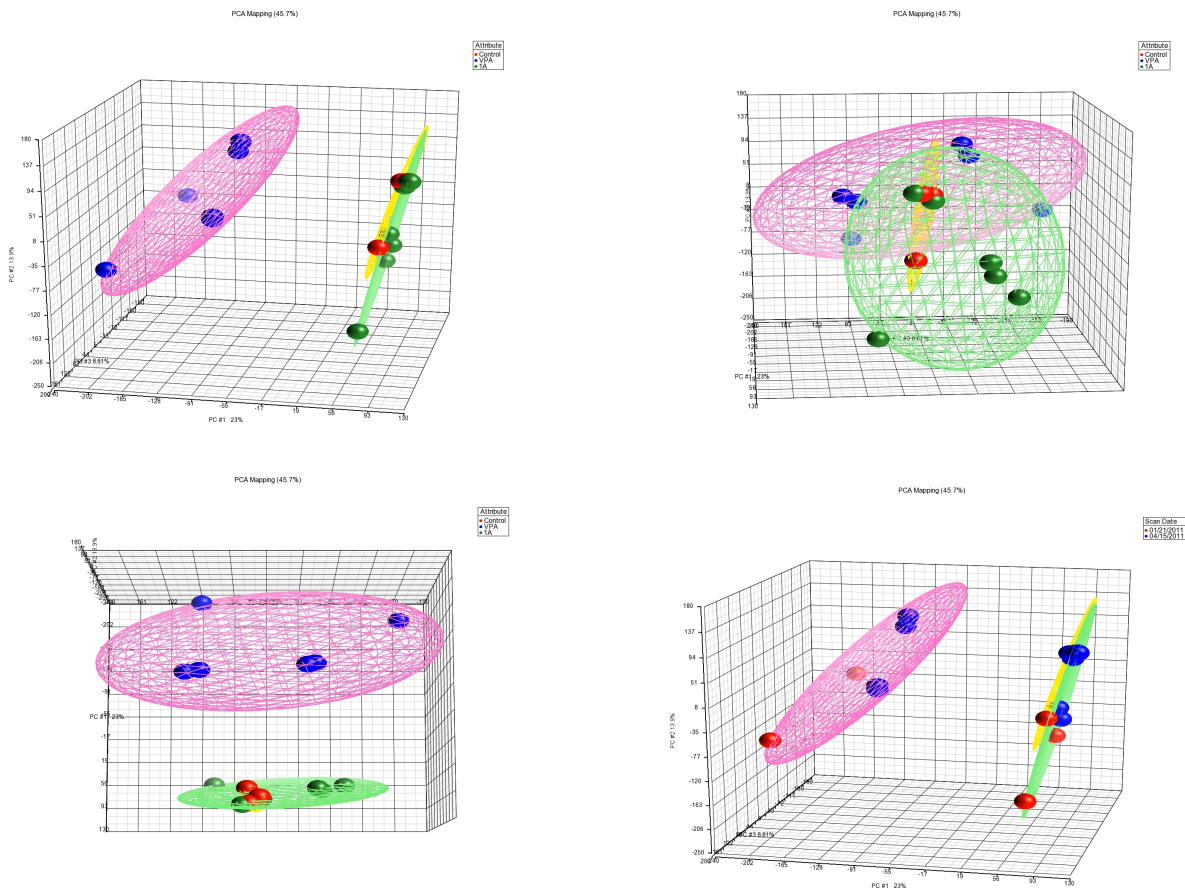


Figura 22. PCA de los arreglos para las tres condiciones experimentales: control (rojo), tratadas con 1A (verdes) y tratadas con VPA (azul) (arriba izq y der y abajo izq representan la separación por tratamiento; abajo der separa grupos por día en que se realizó el experimento).

En la *figura 22* se observan los gráficos de PCA donde los grupos fueron separados de forma no jerárquica y se encontró que los experimentos tratados con VPA (azul) son muy semejantes entre sí, mientras que aquellas muestras tratadas con 1A no se separan en todos sus componentes del control. Estos datos sugieren de forma general que las células de HeLa no tienen un cambio drástico y notorio tras ser tratados con 1A con respecto al control, como los que se encuentran cuando las células son tratadas con VPA. Tras encontrar esto, se realizó un PCA más fino, separando a los grupos de acuerdo al fármaco y la duración del tratamiento, lo que se encontró se resume en la *figura 23*.

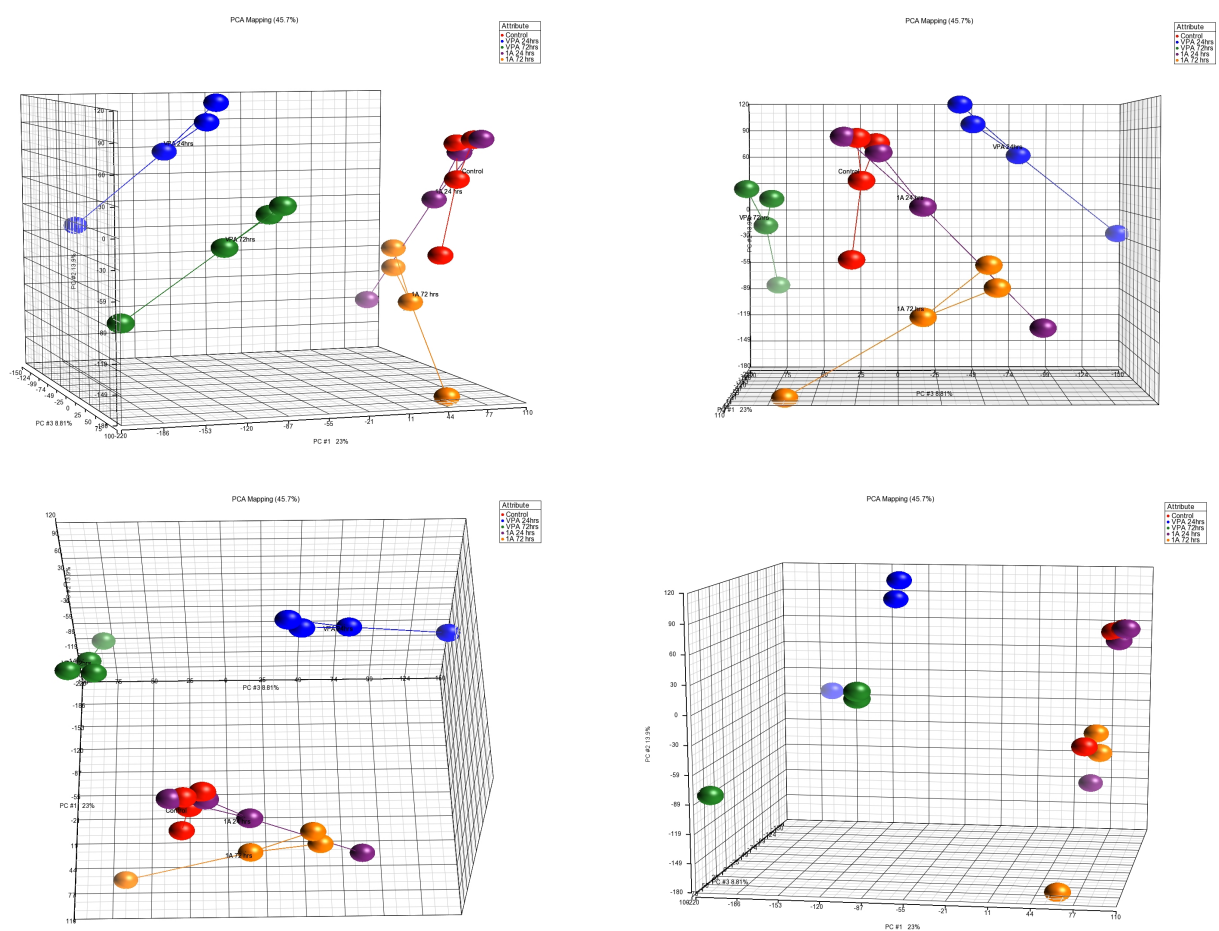


Figura 23. PCA de los arreglos que separa a los 5 grupos: control (rojo), tratado con 1A por 24h (morado), tratado con 1A por 72 h (amarillo), tratado con VPA por 24 h (azul) y tratado con VPA por 72 h (verde) (arriba izq y der y abajo izq representan la separación y el calculo del centroide por tratamiento; abajo der sin cálculo).

La distribución de los experimentos en la gráfica señala que VPA cambia en general los rasgos de expresión génica de las células HeLa desde 24 h de tratamiento; en cambio, cuando se administró tratamiento con 1A por 24 h, no es posible diferenciar plenamente estas células del control, sin embargo, cuando el tratamiento se realizó por 72 h se observa un desplazamiento de los resultados, alejándoles del control y dándoles sus propias características. Teóricamente se esperaba que al realizar el algoritmo no supervisado los resultados agruparan a ambos fármacos y que estos se diferenciara del control, con la hipótesis de que el mismo mecanismo de acción provocaría un efecto global semejante; esto no fue encontrado, al contrario de lo que se esperaba, el tratamiento con 1A no tiene semejanza con el tratamiento con VPA en lo que respecta al cambio del perfil de expresión general; aunque con los resultados en la sección 7.6 se demostró que 1A y VPA inhiben el crecimiento celular, y a mayores concentraciones provocan ambos apoptosis; explicaciones tentativas de este fenómeno son: 1) que actúen por mecanismos diferentes; 2) que si ambos tienen la capacidad de inhibir a las HDAC, tengan un patrón diferente de inhibición; 3) que ambos tengan el mismo mecanismo de acción pero tengan efectos secundariamente en otras vías. Esta situación no se resolverá en este trabajo, aunque sí se establece su importancia.

Después de calificar a los experimentos como comparables (tras el análisis de control de calidad) y de hacer un primer abordaje de sus características generales (PCA), continuamos con un análisis más fino en el que se obtuvieron los genes que se encontraban diferencialmente expresados (sub o sobre expresados), esto se construyó en base a un análisis de ANOVA de 1 vía, y aquellos genes que resultaron con un cambio estadísticamente significativo ($p < 0.05$) se recolectaron en una base de datos. La base que se generó contó con los genes que cumplieron con un Fold Change > 2 , para cada comparación (por ejemplo: 1A vs control, 1A vs VPA etc). Posteriormente se utilizó el software de Partek para construir cluster comparativos de cada condición.

Posteriormente, se obtuvo la lista de genes que cambian con respecto al control cuando se administra tratamiento con VPA de forma general (cualquier tiempo). Este resultado se muestra en la figura 25, en esta figura se observa que los genes que se encuentran sub/sobreexpresados en las muestras tratadas con VPA, no lo están en las tratadas con 1A, de hecho, estas últimas agrupan como parte del control ya que su perfil (con esta lista de genes en específico) y grado de expresión es sumamente parecido al mostrado por el control y contrario al mostrado por el grupo tratado con VPA. Otros clusters se encuentran en la sección de anexo.

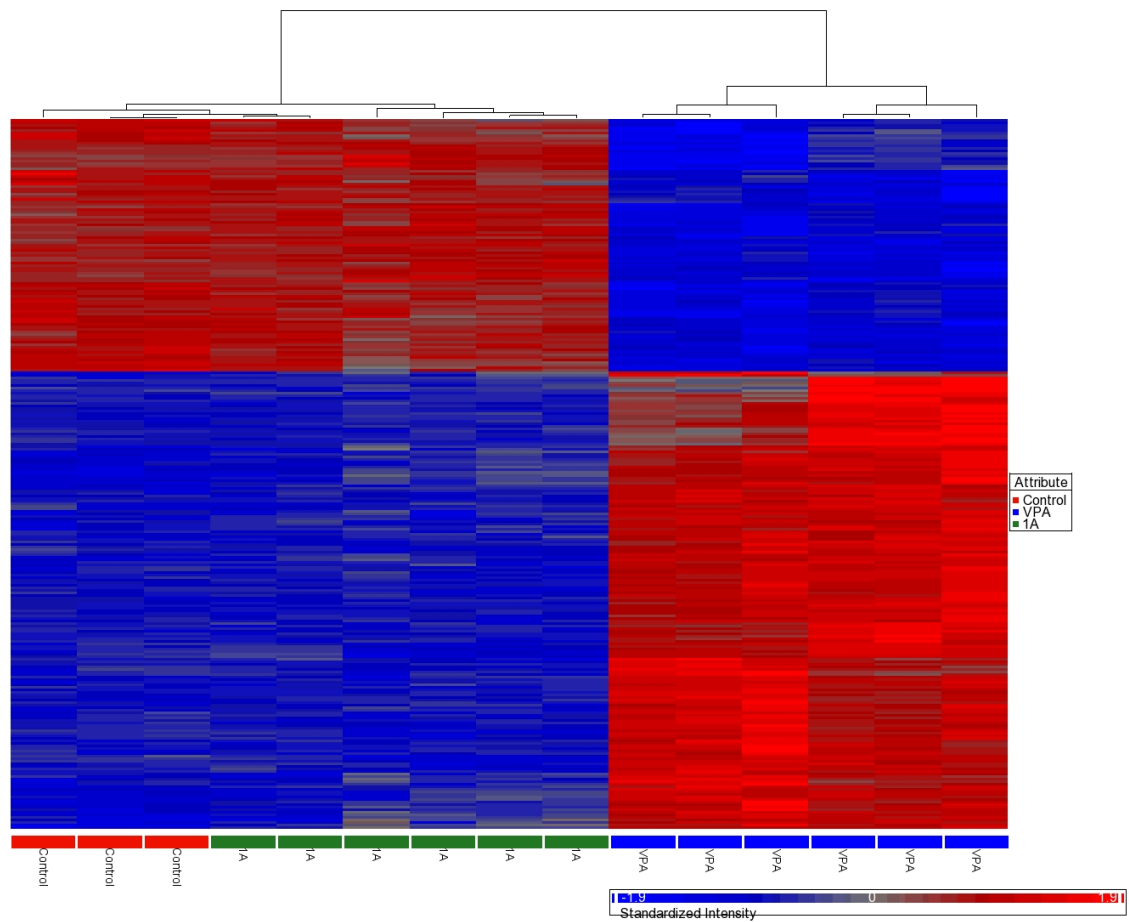


Figura 25. Cluster jerárquico obtenido con la lista de genes que se subexpresan (azul) o sobre expresan (rojo) comparando los perfiles de VPA vs control.

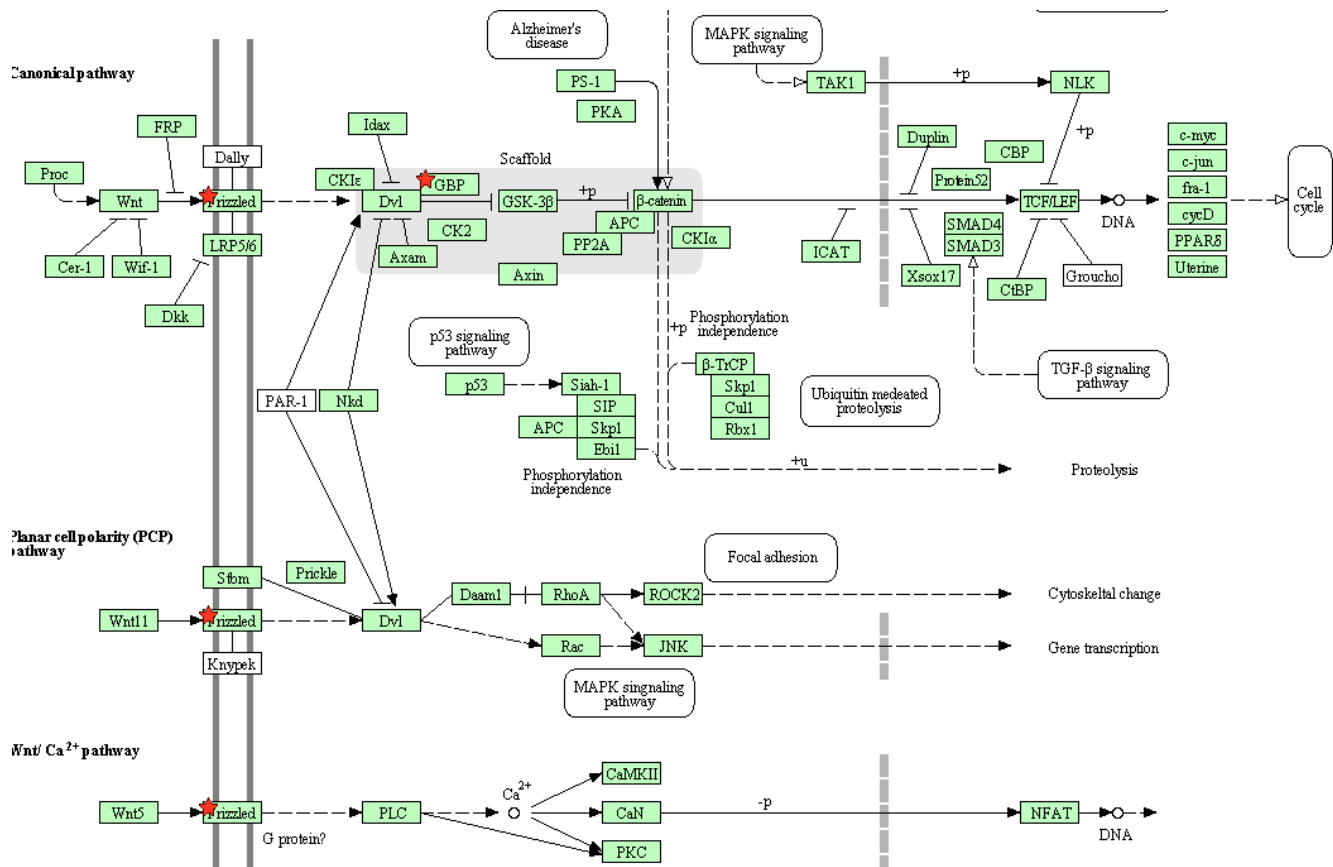


Figura 27. Vía del Wnt, se marcan con estrella roja las moléculas sobreexpresadas.

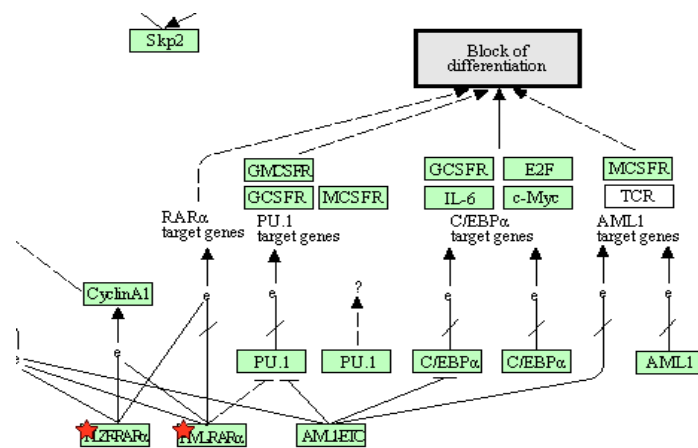


Figura 28. Vía del RAR, se marcan con estrella roja las moléculas sobreexpresadas.

En las *figuras 26, 27 y 28* (vías del p53, Wnt y RAR) es posible apreciar que el incremento en la expresión de los genes marcados (estrella roja) podría tener tentativamente el efecto macroscópico que se observó en la proliferación celular (detención del crecimiento y/o apoptosis).

Genes que sufrieron incremento en la expresión como consecuencia del tratamiento con VPA: Se encontraron 180 genes que incrementaron su expresión con significado estadístico ($p < 0.000001$) y al ser sometidos 47 vías fueron implicadas, aunque la mayoría de ellas están implicadas en metabolismo intermedio, migración, adhesión celular etc., se encontraron alteraciones que pueden explicar la citostasis y/o apoptosis encontrada en los ensayos de proliferación celular. Algunos de los genes implicados fueron: amphiregulin, amphiregulin B, v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogen homolog 3 (vía del ErbB), dual specificity phosphatase 10, phospholipase A2, related RAS viral (r-ras) oncogen homolog (vía MAPK).

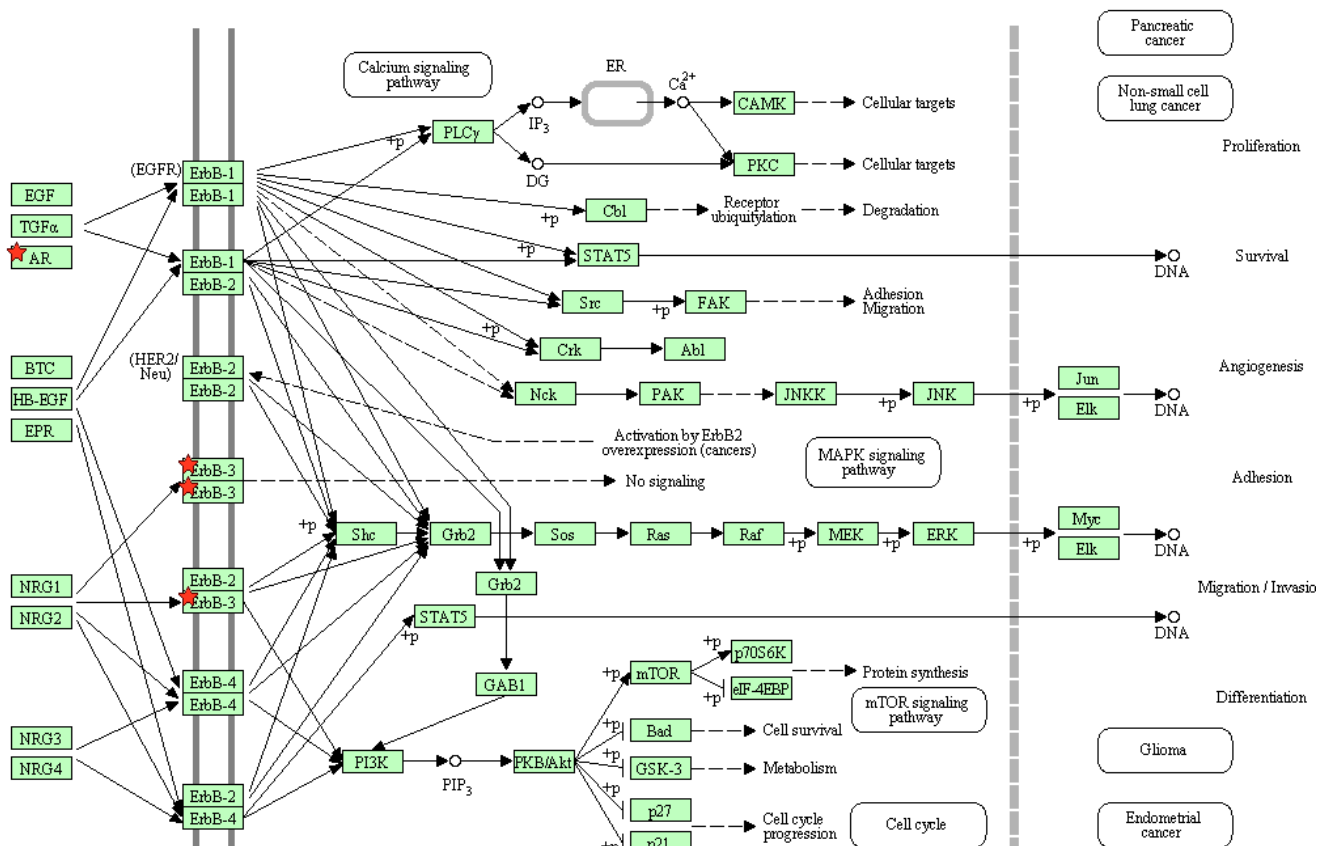


Figura 29. Vía del ERBB, se marcan con estrella roja las moléculas sobreexpresadas.

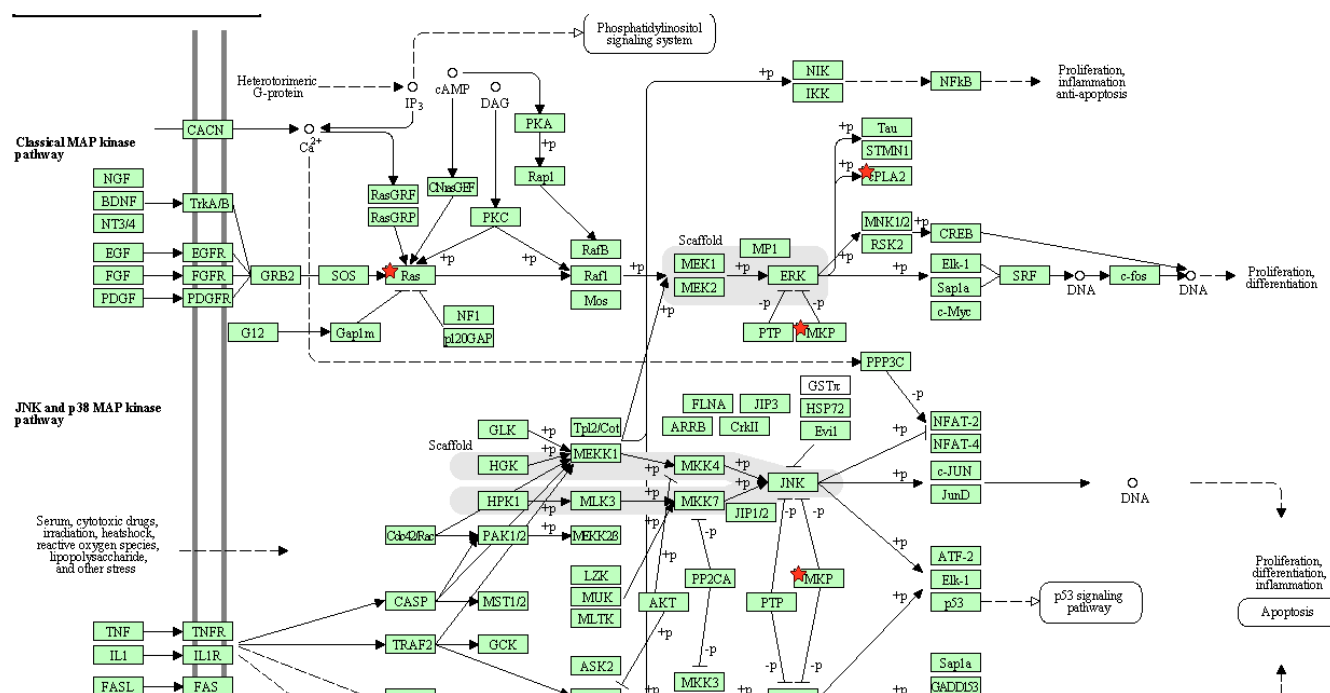


Figura 30. Vía de las MAPK se marcan con estrella roja las moléculas sobreexpresadas.

En las *figuras 29 y 30* (vías de ERBB y MAPK) se integran los productos de los genes que se encontraron incrementados, como se demuestra en las imágenes, la vía de detención del crecimiento, reparación del DNA o apoptosis son puntos finales comunes.

Genes que sufrieron descenso en la expresión como consecuencia del tratamiento con 1A: se encontraron 58 genes que disminuyeron su expresión de forma significativa ($p < 0.05$), de los cuales 10 se encuentran en vías descritas y bien caracterizadas. Dentro de estas se encuentran genes que participan en metabolismo, splicesosoma, adhesión y migración; los siguientes fueron considerados importantes para tratar de explicar los efectos de 1A: heat shock 70kDa protein 1-like, heat shock protein 70kDa protein 1A, 1B y el oncogen jun (vías de MAPK, ErbB, WNT). En las *figuras 31, 32 y 33* se demuestra la implicación de los genes subexpresados en las vías MAPK Wnt y en cáncer (respectivamente).

Síntesis y evaluación *in silico* e *in vitro* de derivados del ácido valproico como antineoplásicos

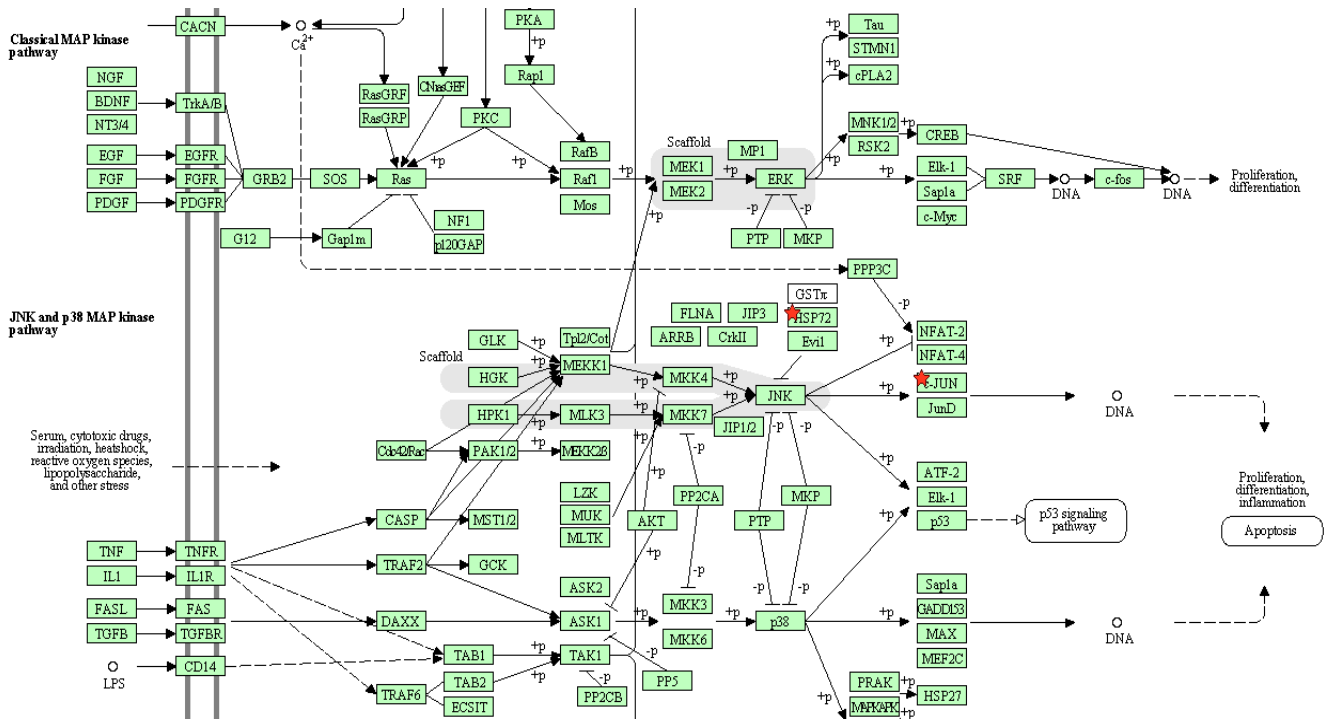


Figura 31. Vía del las MAPK se marcan con estrella roja las moléculas subexpresadas.

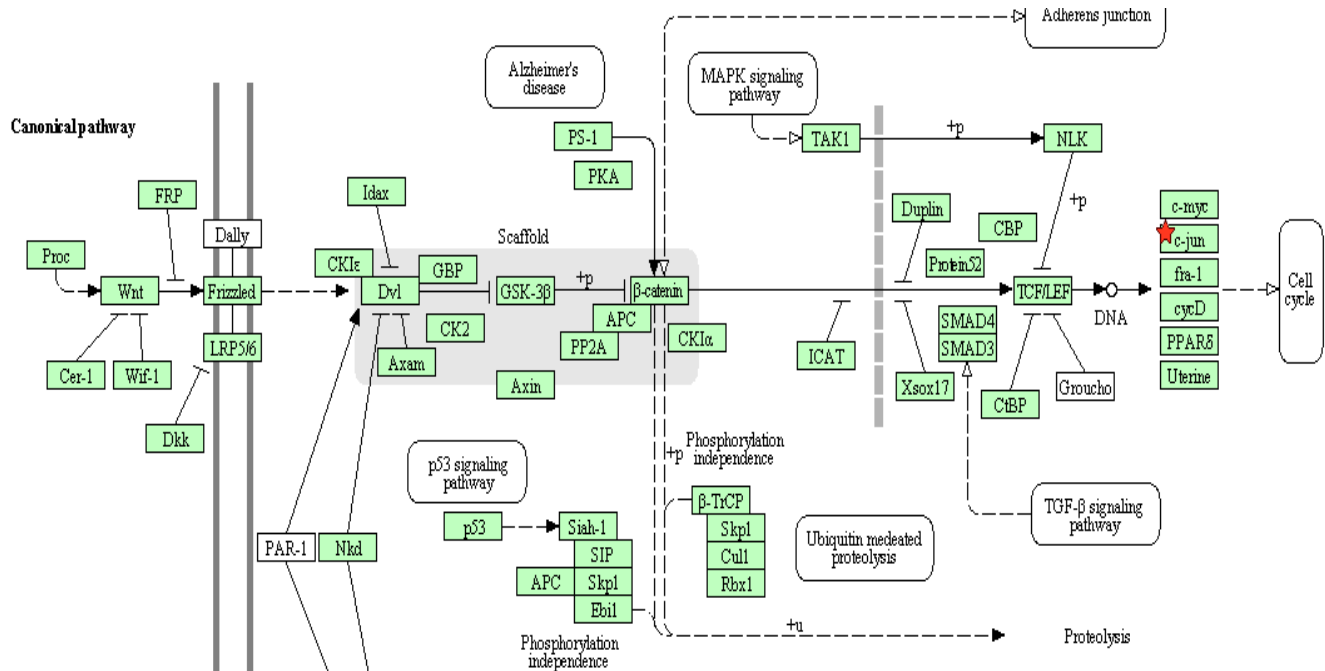


Figura 32. Vía del las Wnt se marcan con estrella roja las moléculas subexpresadas.

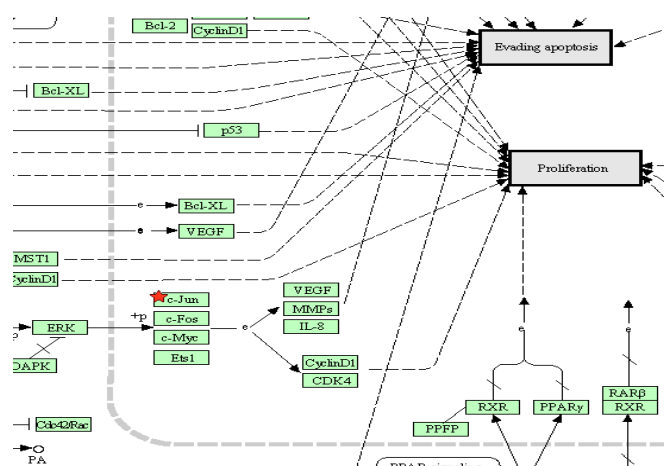


Figura 33. Vías descritas en cáncer. Se marcan con estrella roja las moléculas subexpresadas.

Genes que sufrieron descenso en la expresión como consecuencia del tratamiento con VPA: se encontraron 99 genes subexpresados con significado estadístico ($p < 0.000001$), de los cuales 15 están implicados en vías descritas por esta base de datos. Los productos considerados importantes son los siguientes: CREB binding protein (ciclo celular, vía Wnt, Notch, TGF beta, Jak-Stat y en cáncer), anaphase promoting complex subunit 1, transcription factor Dp-1 (ciclo celular), signal transducer and activator of transcription 6, interleukine-4 induced (Vía Jak-Stat) y sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK (vía MAPK).

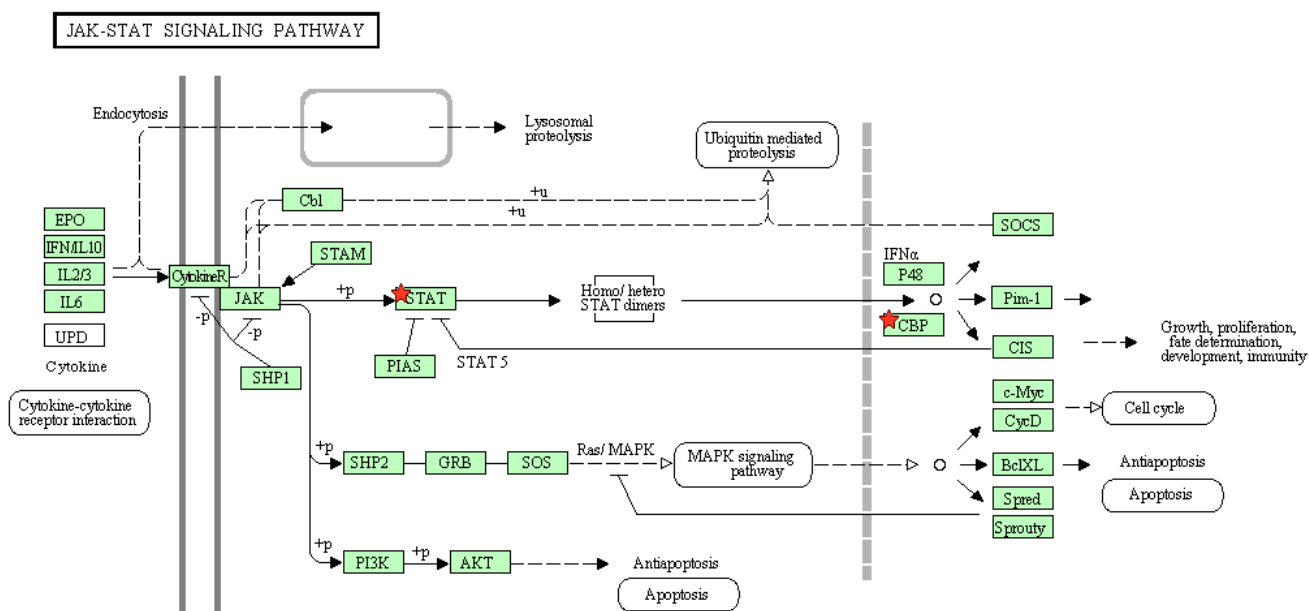


Figura 34. Vías Jak-Stat. Se marcan con estrella roja las moléculas subexpresadas.

8 RESUMEN DE RESULTADOS

- Las diferencias en los sitios catalíticos entre las diversas isoformas de HDAC pueden ser utilizadas para diseñar fármacos específicos.
- El ácido valproico tiene preferencia por las isoenzimas de la clase 1, en comparación con las clase 2.
- Los derivados que tienen más probabilidades de éxito como antineoplásicos de ser sintetizados son: IPN/INP2010-1a, IPN/INP2010-6c, IPN/INP2010-7a, IPN/INP2010-7b y IPN/INP2010-7c.
- Se encontró una mayor afinidad del VPA por la HDAC8, esto debido a que esta enzima tiene una constitución particular en una región por la que se creó libera al acetato tras la catálisis.
- El análisis teórico contra CYP2C9 reveló que es probable que los derivados interaccionen con una diferente orientación en el espacio, y por tanto e indirectamente, podría pensarse que no se generarían productos tóxicos de las cadenas alifáticas o lo harían en muy pequeñas cantidades.
- Se logró sintetizar y caracterizar al compuesto IPN/INP2010-1a.
- El compuesto IPN/INP2010-1a disminuye la viabilidad de células HeLa y A204, de forma concentración-dependiente, del mismo modo que el VPA.
- El compuesto IPN/INP2010-1a es 100 veces mas potente que VPA para disminuir la viabilidad de células HeLa y A204.

- El VPA y IPN/INP2010-1a provocan citostasis a su GI_{50} por el ytratamiento se administra por 24 h, empezando a causar apoptosis a las 48 h; tras el tratamiento con la GI_{99} , causan muerte celular por apoptosis en un promedio de 4 h.
- El tratamiento de células HeLa con IPN/INP2010-1^a provoca modificaciones en el perfil de expresión; el tratamiento con VPA también provoca un cambio en el perfil de expresión.
- Los cambios en la expresión génica provocados por IPN/INP2010-1a son diferentes a los provocados por VPA, aunque de forma global, ambos tienen el mismo efecto sobre la proliferación y apoptosis.

9 PERSPECTIVAS

- Es necesario ampliar la investigación sobre IPN/INP2010-1a, y caracterizar si inhibe a HDAC's y que isoformas.
- Describir su perfil farmacocinético y farmacodinámico.
- Realizar ensayos in vivo en modelos de cáncer buscando un efecto antineoplásico, y del mismo modo caracterizar su perfil toxicológico

10 CONCLUSION GENERAL

Para finalizar, nuestro grupo de trabajo usó un tamizaje computacional para después sintetizar un derivado de ácido valproico, que posteriormente fue evaluado en células HeLa y A204, y quien mostró un efecto antineoplásico 100 veces más potente que VPA.

11 REFERENCIAS

- [1] Lopez J, Percharde M, Coley HM, Webb A, Crook T. The context and potential of epigenetics in oncology. *Br J Cancer*. 100:571-7. 2009
- [2] Sistema nacional de información en salud (SINAIS). Secretaria de Salud. México. <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>
- [3] Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E, Herrera LA. Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev*. 34:206-22. 2008
- [4] Krämer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, Brill B, Groner B, Bach I, Heinzl T, Göttlicher M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J*. 22:3411-20. 2003.
- [5] SEER Cancer Statistics Review 1975-2006
http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/browse_csr.php?section=2&page=sect_02_table.18.html
- [6] Jemal A, Thun MJ, Ries LA, Howe HL, Weir HK, Center MM, Ward E, Wu XC, Ehemann C, Anderson R, Ajani UA, Kohler B, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst*. 100:1672-94. 2008
- [7] Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. RHNM. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.htm>
- [8] Puente XS, Velasco G, Gutiérrez-Fernández A, Bertranpetit J, King MC, López-Otín C. Comparative analysis of cancer genes in the human and chimpanzee genomes. *BMC Genomics*. 26;7:15. 2006
- [9] Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 358:502-11. 2008
- [10] Spandidos DA. Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in

- oncogenesis. *J BUON*. 12 Suppl 1:9-12. 2007
- [11] Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 10:789-99. 2004
- [12] Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol*. 3:999-1005. 2002
- [13] Gunjan A, Paik J, Verreault A. Regulation of histone synthesis and nucleosome assembly. *Biochimie*. 87:625-35. 2005
- [14] Biel M, Wascholowski V, Giannis A. Epigenetics, an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes. *Angew Chem Int Ed Engl*. 44:3186-216. 2005
- [15] Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21(WAF1) expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:10014-9. 2000
- [16] Jiang WQ, Zhong ZH, Nguyen A, Henson JD, Toouli CD, Braithwaite AW, Reddel RR. Induction of alternative lengthening of telomeres-associated PML bodies by p53/p21 requires HP1 proteins. *J Cell Biol*. 185:797-810. 2009.
- [17] Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA. 1. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet*. 19:187-97. 2010.
- [18] Jung JW, Lee S, Seo MS, Park SB, Kurtz A, Kang SK, Kang KS. Histone deacetylase controls adult stem cell aging by balancing the expression of polycomb genes and jumonji domain containing 3. *Cell Mol Life Sci*. 67:1165-76. 2010
- [19] Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*. 401:188-93. 1999.
- [20] Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R. Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med Res Rev*. 25:261-309. 2005.
- [21] Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, and Baylin SB.

- Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet.* 21:103–107. 1999.
- [22] Giannini G, Marzi M, Pezzi R, Brunetti T, Battistuzzi G, Marzo MD, Cabri W, Vesci L, Pisano C. N-Hydroxy-(4-oxime)-cinnamide: A versatile scaffold for the synthesis of novel histone deacetylase (HDAC) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 19:2346-9. 2009.
- [23] Witt O, Deubzer HE, Lodrini M, Milde T, Oehme I. Targeting histone deacetylase in neuroblastoma. *Curr Pharm Des.* 15:436-47. 2009.
- [24] Zhu WG, Otterson GA. The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 3:187-99. 2003.
- [25] Lindemann RK, Gabrielli B & Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Cell Cycle.* 3:779–788. 2004.
- [26] Johannessen CU, Johannessen SI. Valproate: past, present, and future. *CNS Drug Rev.* 9:199-216. 2003.
- [27] Adler JT, Hottinger DG, Kunnimalaiyaan M, Chen H. Histone deacetylase inhibitors upregulate Notch-1 and inhibit growth in pheochromocytoma cells. *Surgery.* 144:956-61. 2008
- [28] Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature reviews.* 5:769-784. 2006
- [29] Eyal S, Yagen B, Shimshoni J, Bialer M. Histone deacetylases inhibition and tumor cells cytotoxicity by CNS-active VPA constitutional isomers and derivatives. *Biochem Pharmacol.* 69:1501-8. 2005
- [30] Dowdell KC, Pesnicak L, Hoffmann V, Steadman K, Remaley AT, Cohen JI, Straus SE, Rao VK. Valproic acid (VPA), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, diminishes lymphoproliferation in the Fas -deficient MRL/lpr(-/-) murine model of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Exp Hematol.* 37:487-94. 2009
- [31] Takai N, Desmond JC, Kumagai T, Gui D, Said JW, Whittaker S, Miyakawa

- I, Koeffler HP. Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells. *Clin Cancer Res.* 10:1141-9. 2004.
- [32] Göttlicher M. Valproic acid: an old drug newly discovered as inhibitor of histone deacetylases. *Ann Hematol.* 83 Suppl 1:S91-2. 2004
- [33] Ferrajolo C, Capuano A, Verhamme KM, Schuemie M, Rossi F, Stricker BH, Sturkenboom MC. Drug-induced hepatic injury in children: a case/non-case study of suspected adverse drug reactions in Vigibase. *Br J Clin Pharmacol.*70:721-8. 2010
- [34] Powell-Jackson PR, Tredger JM, Williams R. Hepatotoxicity to sodium valproate: a review. *Gut.* 25: 673–681. 1984
- [35] Hallas J, Friis S, Bjerrum L, Støvring H, Narverud SF, Heyerdahl T, Grønbaek K, Andersen M. Cancer risk in long-term users of valproate: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 18:1714-9. 2009.
- [36] Catalano MG, Fortunati N, Pugliese M, Poli R, Bosco O, Mastrocola R, Aragno M, Boccuzzi G. Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, enhances sensitivity to doxorubicin in anaplastic thyroid cancer cells. *Journal of Endocrinology.* 191:465-472. 2006.
- [37] Xia Q, Sung J, Chowdhury W, Chen CL, Hoti N, Shabbeer S, Carducci M, and Rodriguez R. Chronic administration of valproic acid inhibits prostate cancer cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 66:7237–7244. 2006
- [38] Kaiser M, Zavrski I, Sterz J, Jakob C, Fleissner C, Kloetzel PM, Sezer O, Heider U. The effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on cell cycle, growth suppression and apoptosis in multiple myeloma. *Haematologica* 2006; 91:248-251.
- [39] Tuccinardi T. Docking-based virtual screening: recent developments. *Comb Chem High Throughput Screen.* 12:303-14. 2009
- [40] Rosales-Hernandez MC, Bermúdez-Lugo J, Garcia J, Trujillo-Ferrara J, Correa-Basurto J. Molecular modeling applied to anti-cancer drug

- development. *Anticancer Agents Med Chem.* 9:230-8. 2009.
- [41] Bermudez-Lugo JA, Correa-Basurto J. Diseño de Inhibidores de Acetilcolinesterasa Asistido por Métodos Computacionales: Modelado por Homología, Docking y Dinámica Molecular. Tesis de licenciatura. ESM-IPN. 2009
- [42] Nogueira IA, Leão AB, Vieira Mde S, Benfica PL, da Cunha LC, Valadares MC. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. *J Ethnopharmacol.* 120:474-8. 2008.
- [43] Mandy R. Microarray: a technique review. *J Young Invest.* 21:1-6. 2011
- [44] Gurvich N, Berman MG, Wittner BS, Gentleman RC, Klein PS, Green JB. Association of valproate-induced teratogenesis with histone deacetylase inhibition in vivo. *FASEB J.* 19:1166-8. 2005.
- [45] Chavez-Blanco A, Perez-Palencia C, Perez-Cardenas E, Carrasco-Legal C, Rangel-Lopez E, Segura-Pacheco B, Taja-Chayeb L, Trejo-Becerril C, Gonzalez-Fierro A, Candelaria M, Cabrera G, Duenas-Gonzalez A. Antineoplastic effect of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines. *Cancer Cell International* 6:1-9. 2006
- [46] Pan JS, Hong MZ, Ren JL. Reactive oxygen species: a double-edged sword in oncogenesis. *World J Gastroenterol.* 15:1702-7. 2009.
- [47] Yu XN, Chen XL, Li H, Li XX, Li HQ, Jin WR. Reversion of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human leukemic cell line by carnosic acid. *Chin J Physiol.* 51:348-56. 2008
- [48] ISIS/Draw, MDL Information System, 14600 Catalina Street, San Leandro, CA 94677, USA. The program (editions of 2.5 and 2.3) is available at the MDL at <http://www.mdli.com/>
- [49] WebLab Viewer, available at <http://www.liv.ac.uk/ctichem/16weblab.html>
- [50] Frisch, M.J. Trucks, G.W. H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, V.G. Zakrzewski, J.A. Montgomery Jr., R.E. Stratmann, J.C. Burant, S. Aprich, J.M. Millam, A.D. Daniels, K.N. Kudin, M.C. Strain, O. Farkas, J.

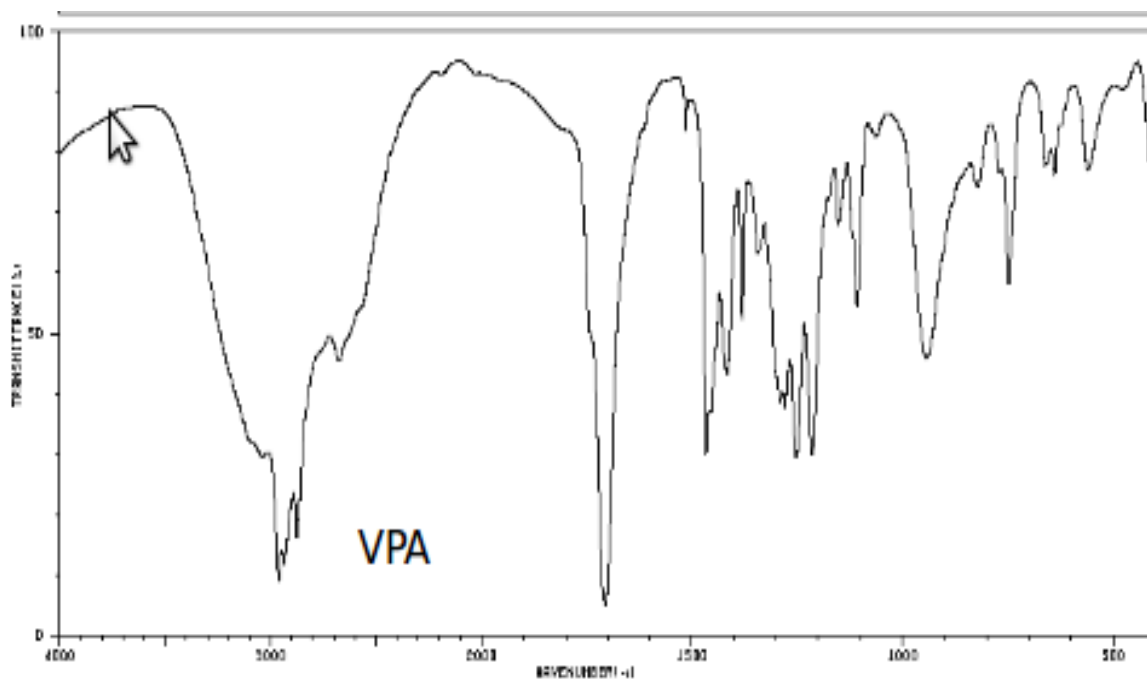
- Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. ennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G.A. Peterson, P.Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski, J.V. Ortiz, A.G. Baboul, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I.Komaromi, R.Gomperts, R.L.Martin,D.J. Fox, T.Keith,M.A.Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E.S. Replogle, J.A. Pople, Gaussian 98, Revision A.9, Gaussian, Inc, Pittsburgh, PA, 1998.
- [51] P.F. Flukiger. Development of the molecular graphics package MOLEKEL and its application to selected problems in organic and organometallic chemistry. The`se No 2561, De´partement de chimie physique, Universite´ de Gene`ve, Gene`ve, (1992).
- [52] Morris, G.M. D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A. J. Olson. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *J. Comp. Chem.* 19:1639. 1998.
- [53] ClustalW2. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>
- [54] RCSB Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- [55] Guex, N. and Peitsch, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723. <http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>
- [56] Yang Zhang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics.* 9:40. 2008.
- [57] Humphrey , W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Molec. Graphics.* 14:33-38. 1996
- [58] MacKerell, Jr, A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, Jr. R. L.; Evanseck, J.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, I. W. E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J.; Stote, R.;

- Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus. M. All-hydrogen empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins using the CHARMM22 force field. *J. Phys. Chem.* 102:3586–3616. 1998
- [59] Phillips, J.C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kale, L.; Schulten, K. Scalable Molecular Dynamics with NAMD, *J. Comp. Chem.* 26:1781-1802. 2005
- [60] Glykos, N.M. "Carma: a molecular dynamics analysis program", *J. Comput. Chem.* 27:1765-1768. 2006.
- [61] Vogel A. Textbook of practical Organic Chemistry. Ed Longman scientific Technical.5 ed. 1989. London. 705-706.
- [62] Jergil M, Kultima K, Gustafson AL, Dencker L, Stigson M. Valproic acid-induced deregulation in vitro of genes associated in vivo with neural tube defects. *Toxicol Sci.* 108:132-48. 2009.
- [63] Minucci S, Nervi C, Lo Coco F, Pelicci PG. Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias?. *Oncogene.* 20:3110-3115. 2001
- [64] Vannini, A., Volpari, C., Filocamo, G., Caroli Casavola, E., Brunetti, M., Renzoni, D., Chakravarty, P., Paolini, C., De Francesco, R., Gallinari, P., Steinckuhler, C., Di Marco, S. Crystal Structure of a Eukaryotic Zn-Dependent Histone Deacetylase, Human Hdac8, Complexed with a Hydroxamic Acid Inhibitor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 101: 15064. 2004.
- [65] Vannini, A., Volpari, C., Gallinari, P., Jones, P., Mattu, M., Carfi, A., De Francesco, R., Steinkuhler, C., Di Marco, S. Substrate Binding to Histone Deacetylases as Revealed by Crystal Structure of Hdac8-Substrate Complex. *Embo Rep.* 8: 879-884. 2007.
- [66] Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem.* 276:36734-41. 2001.
- [67] Dejligbjerg M, Grauslund M, Litman T, Collins L, Qian X, Jeffers M,

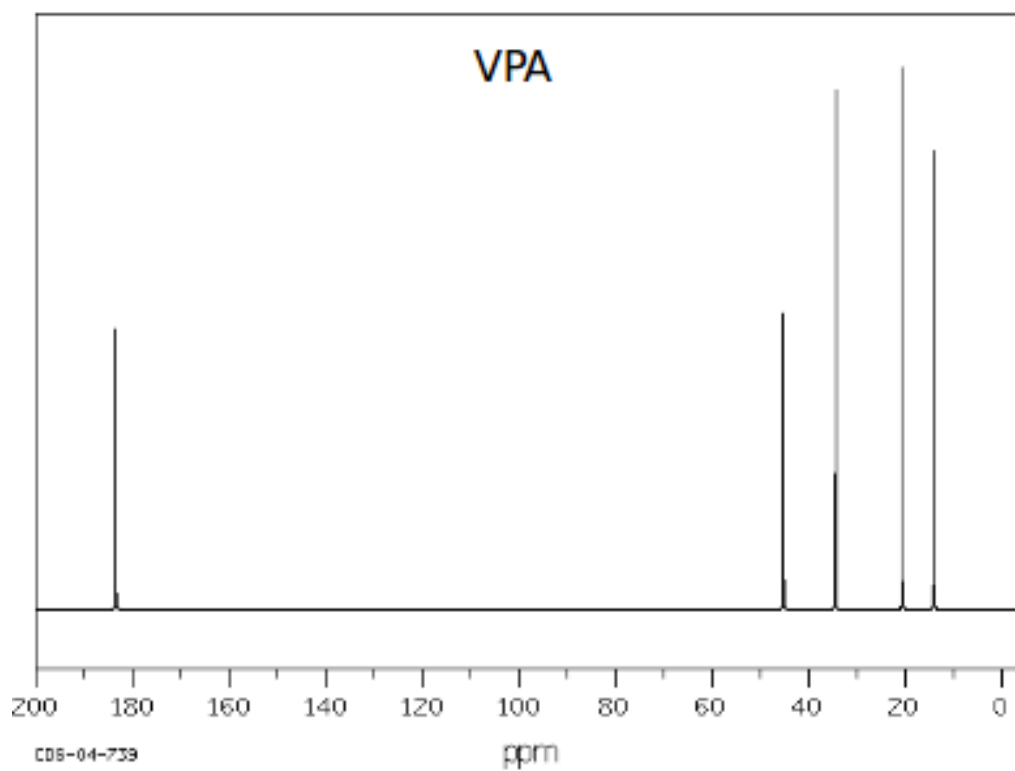
Lichenstein H, Jensen PB, Maxwell Sehested M. Differential effects of class I isoform histone deacetylase depletion and enzymatic inhibition by belinostat or valproic acid in HeLa cells. *Molecular cancer*. 7:1-12. 2008.

12 ANEXO

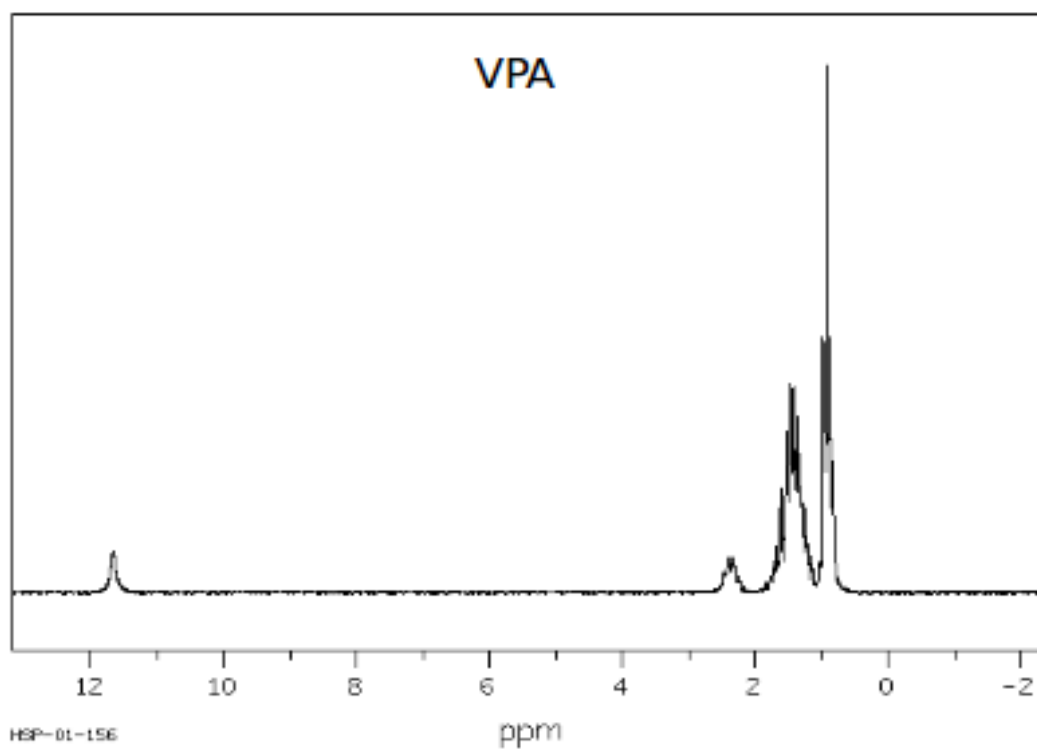
Espectro infrarrojo de ácido valproico



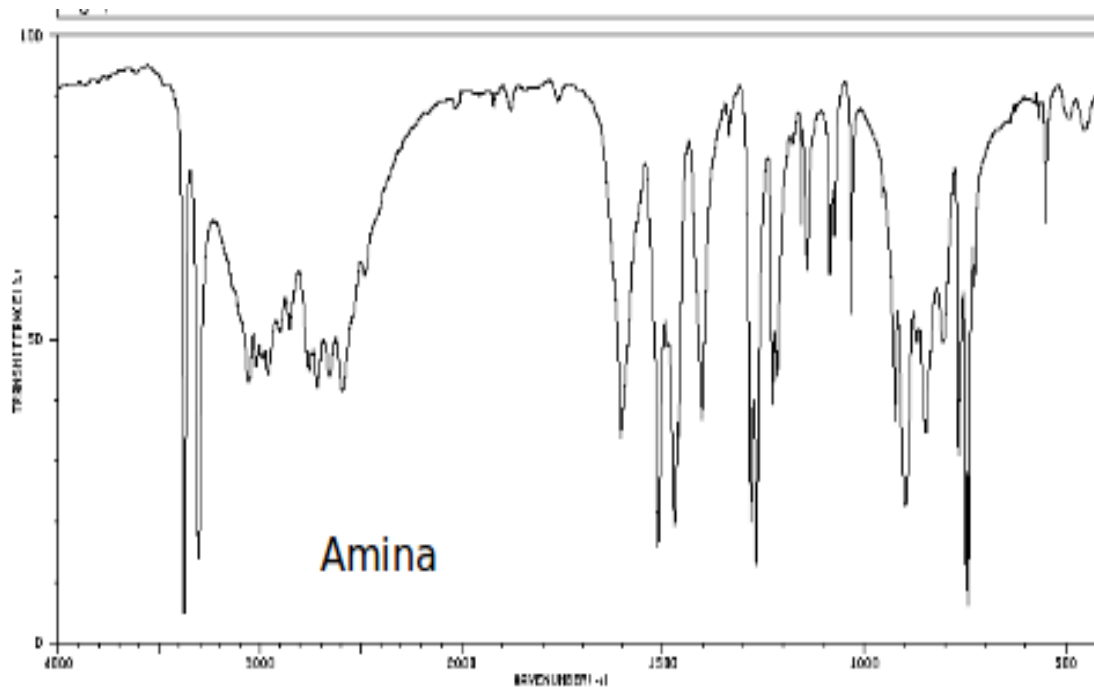
RMN de ^{13}C de ácido valproico



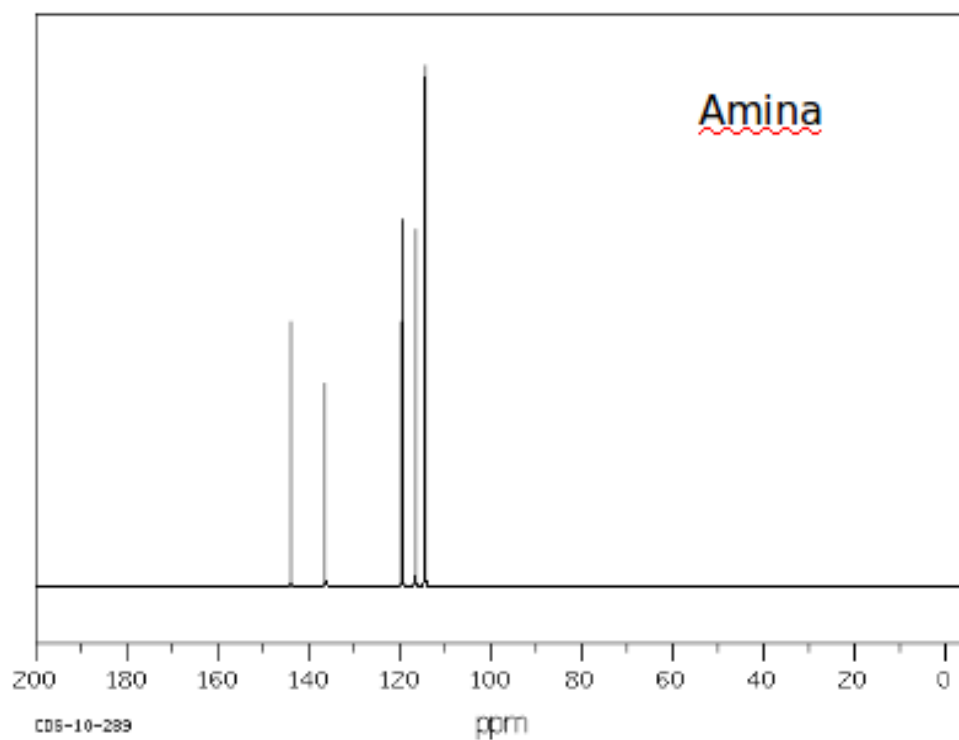
RMN de protón de ácido valproico



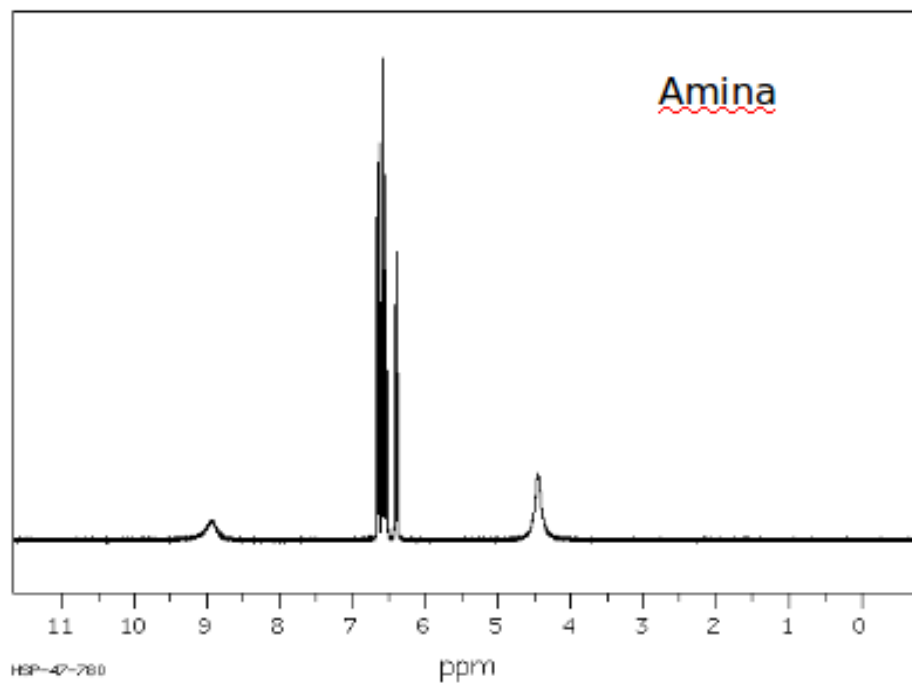
Espectro infrarrojo de la amina usada en la síntesis de IPN/INP2010-1A



RMN de ^{13}C de la amina usada en la síntesis de IPN/INP2010-1A

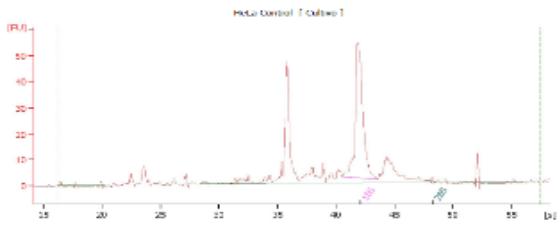


RMN de protón de la amina usada en la síntesis de IPN/INP2010-1A



Electroferogramas de extracciones de RNA.

Electroferogram Summary Continued ...

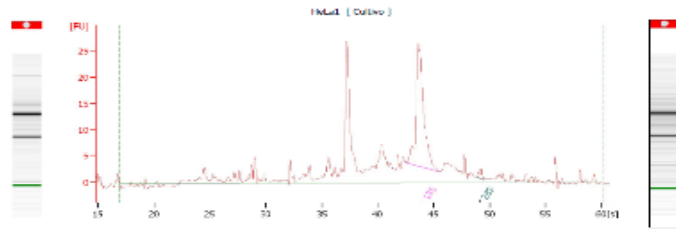


Overall Results for sample 9 : **HeLa Control**
 RNA Area: 271.4 RNA Integrity Number (RIN): N/A (A-DI 0.0)
 RNA Concentration: 0.242 ng/µl Result Flagging Color:
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.0 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 9 : **HeLa Control**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	0	0	191.6	69.9
28S	0	0	0.8	0.3

Electroferogram Summary Continued ...

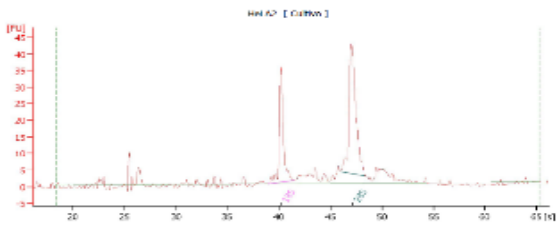


Overall Results for sample 10 : **HeLa 1**
 RNA Area: 2282.5 RNA Integrity Number (RIN): N/A (A-DI 0.0)
 RNA Concentration: 0.600 ng/µl Result Flagging Color:
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.0 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 10 : **HeLa 1**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	0	0	42.8	18.8
28S	0	0	1.0	0.5

Electroferogram Summary Continued ...

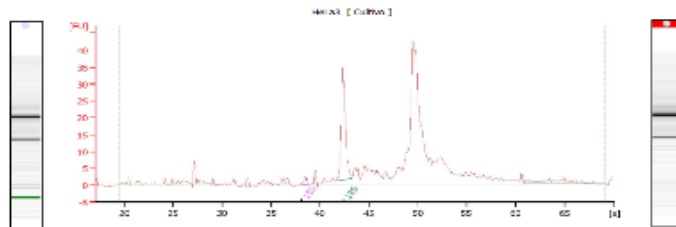


Overall Results for sample 11 : **HeLa 2**
 RNA Area: 189.1 RNA Integrity Number (RIN): 3.1 (A-DI 0.0)
 RNA Concentration: 4.248 ng/µl Result Flagging Color:
 rRNA Ratio (28s / 18s): 1.3 Result Flagging Label: RIN 3.1

Fragment table for sample 11 : **HeLa 2**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	0	0	42.8	22.9
28S	0	0	65.7	33.7

Electroferogram Summary Continued ...

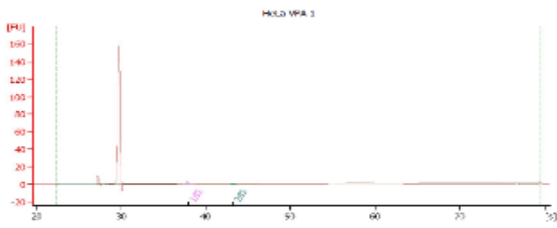


Overall Results for sample 12 : **HeLa 3**
 RNA Area: 264.2 RNA Integrity Number (RIN): N/A (A-DI 0.0)
 RNA Concentration: 8.237 ng/µl Result Flagging Color:
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.9 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 12 : **HeLa 3**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	0	0	2.0	1.0
28S	0	0	98.8	14.1

Electroferogram Summary

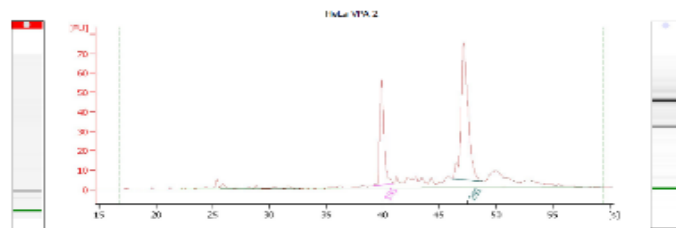


Overall Results for sample 1 : **HeLa VPA 1**
 RNA Area: 164.2 RNA Integrity Number (RIN): N/A (A-DI 0.0)
 RNA Concentration: 517 ng/µl Result Flagging Color:
 rRNA Ratio (28s / 18S): 0.2 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 1 : **HeLa VPA 1**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	501	675	3.4	2.1
28S	988	1,094	0.7	0.4

Electroferogram Summary Continued ...

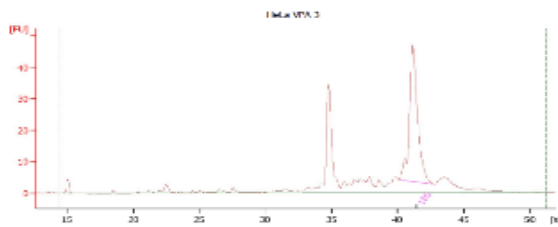


Overall Results for sample 2 : **HeLa VPA 2**
 RNA Area: 221.0 RNA Integrity Number (RIN): 9.0 (A-DI 0.0)
 RNA Concentration: 1,011 ng/µl Result Flagging Color:
 rRNA Ratio (28s / 18s): 1.8 Result Flagging Label: RIN 9.0

Fragment table for sample 2 : **HeLa VPA 2**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	643	805	27.8	12.6
28S	1,400	1,943	109.2	34.0

Electroferogram Summary Continued ...

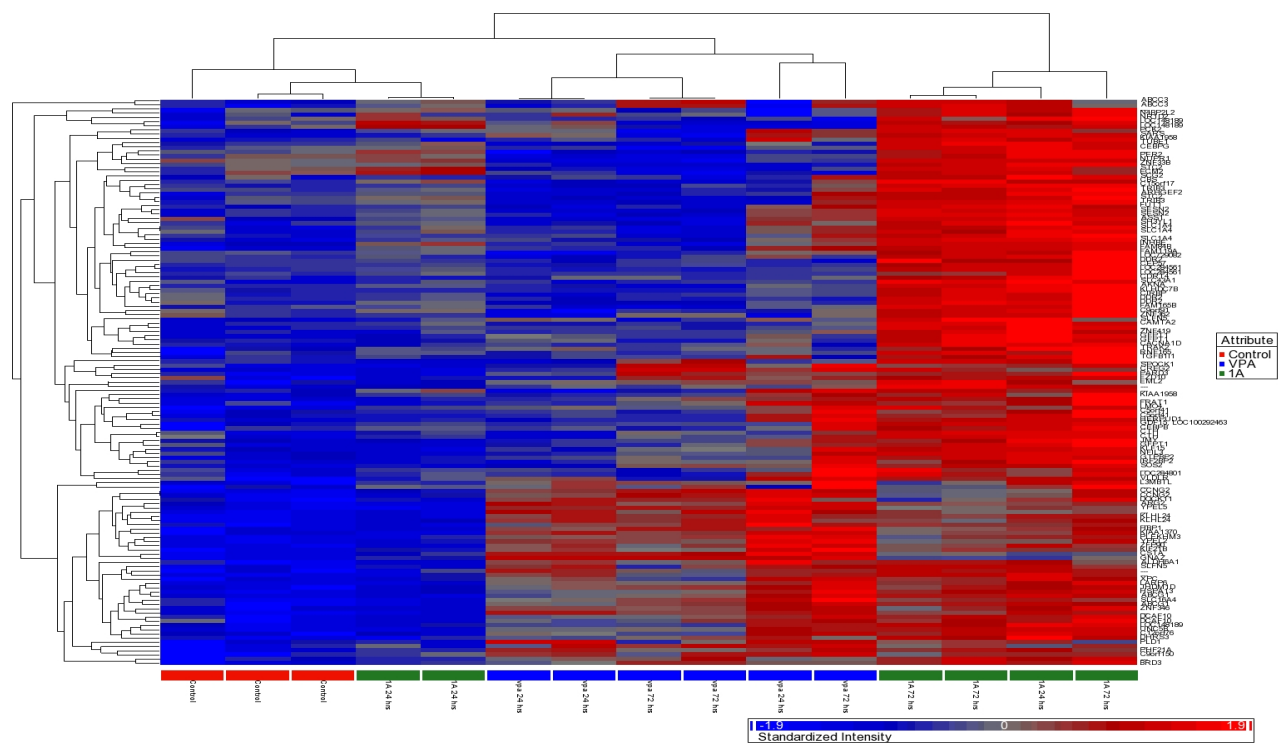


Overall Results for sample 3 : **HeLa VPA 3**
 RNA Area: 231.6 RNA Integrity Number (RIN): N/A (A-DI 0.0)
 RNA Concentration: 729 ng/µl Result Flagging Color:
 rRNA Ratio (28s / 18S): 0.0 Result Flagging Label: RIN N/A

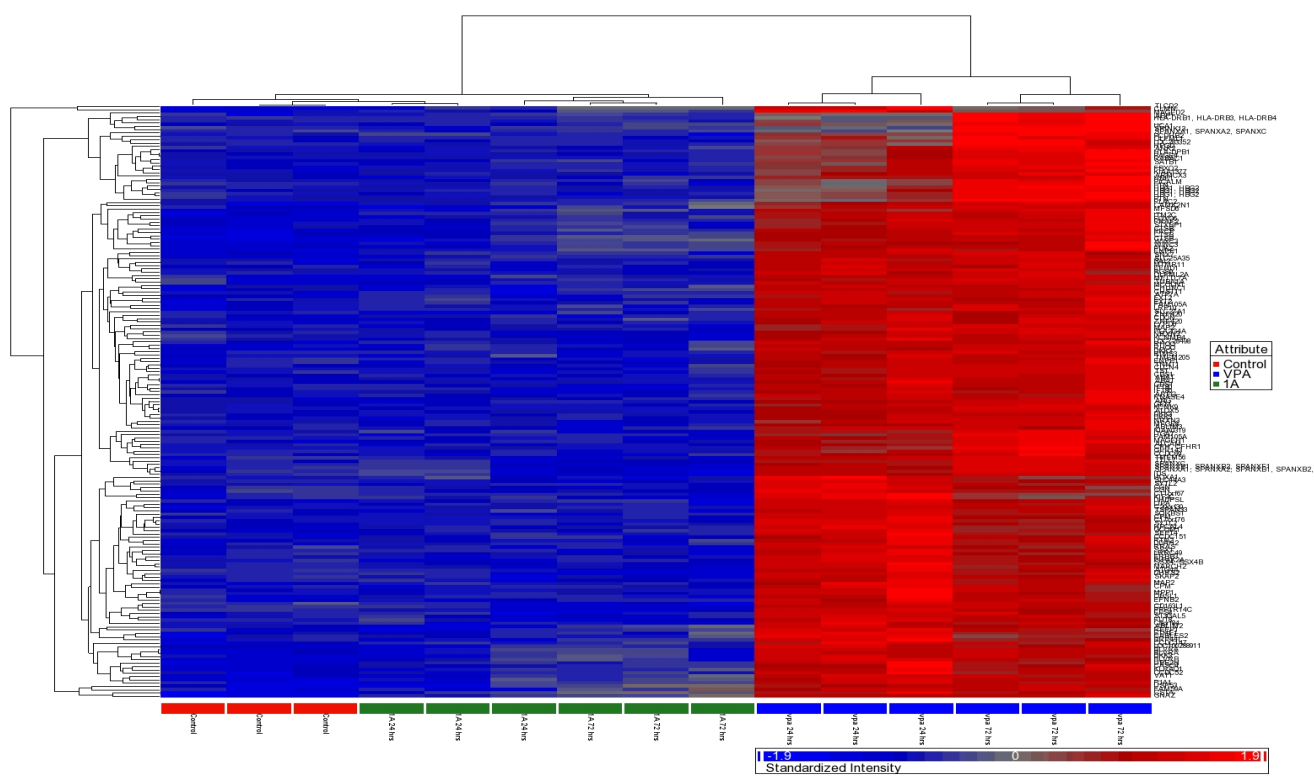
Fragment table for sample 3 : **HeLa VPA 3**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	779	971	77.2	33.3

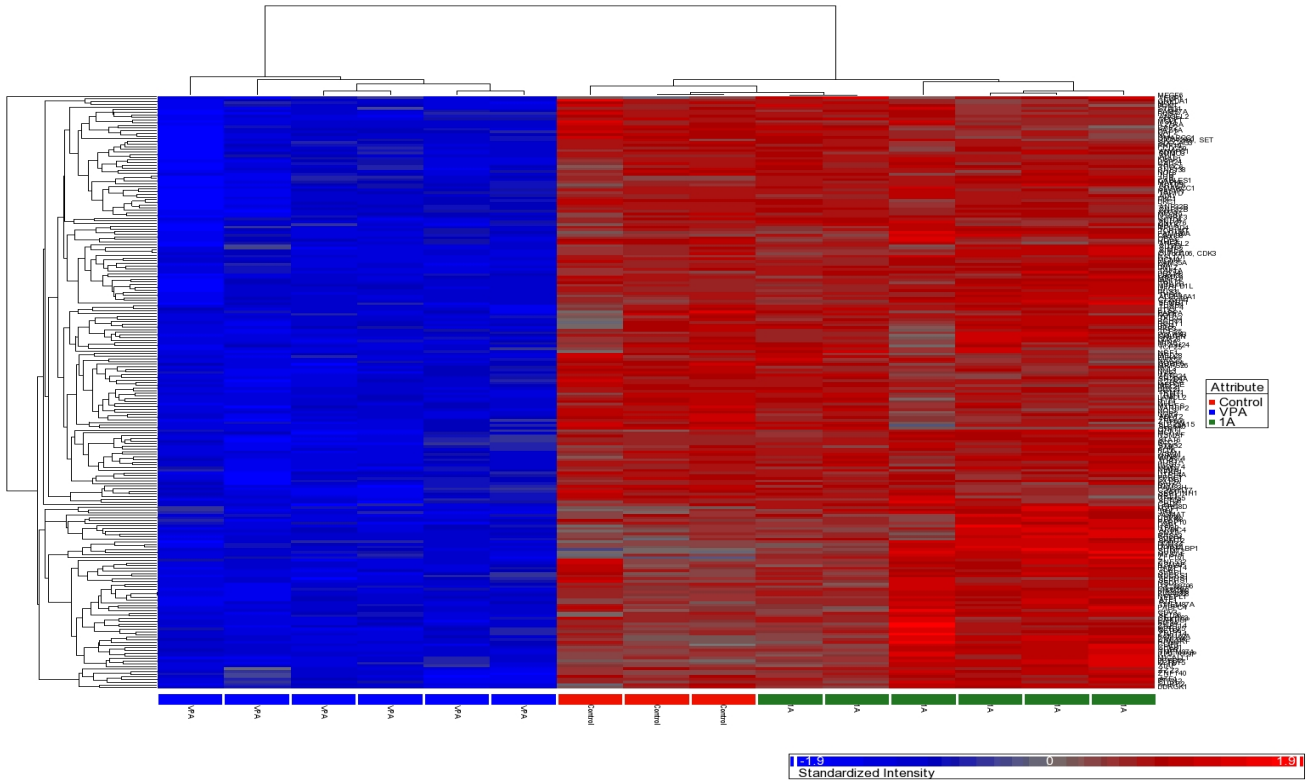
Genes sobreexpresados 1A vs control



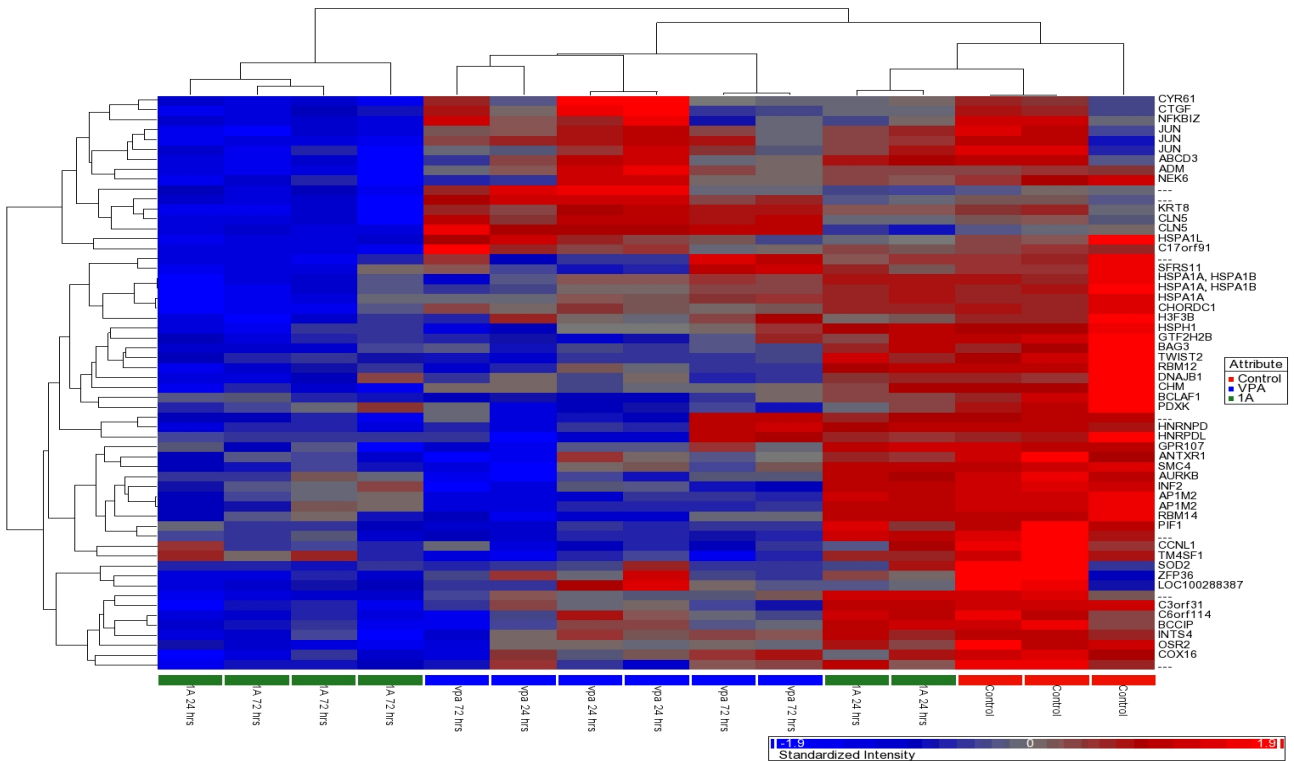
Genes sobreexpresados VPA vs control



Genes subexpresados 1A vs control



Genes subexpresados VPA vs control



Síntesis y evaluación in silico e in vitro de derivados del ácido valproico como antineoplásicos

Genes que sufrieron incremento en la expresión como consecuencia del tratamiento con 1A

208161_s_at, 209641_s_at	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	ABC transporters,		
211113_s_at, 204567_s_at	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	ABC transporters,		
229787_s_at	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase)	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	O-Glycan biosynthesis,		
209435_s_at	Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Pathogenic Escherichia coli infection,		
221588_x_at	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Valine, leucine and isoleucine degradation, Inositol phosphate metabolism, Propanoate metabolism,		
203946_s_at	arginase, type II	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Arginine and proline metabolism,		
230406_at, 207076_s_at	argininosuccinate synthetase 1	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Alanine, aspartate and glutamate metabolism, Arginine and proline metabolism,		
210108_at	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	MAPK signaling pathway, Calcium signaling pathway, Cardiac muscle contraction, Vascular smooth muscle contraction, GnRH signaling pathway, Type II diabetes mellitus, Alzheimer's disease, Hypertrophic cardiomyopathy (HCM), Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC), Dilated cardiomyopathy,		
202769_at, 202770_s_at	cyclin G2	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	p53 signaling pathway,		
217127_at, 206085_s_at	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Glycine, serine and threonine metabolism, Cysteine and methionine metabolism, Selenoamino acid metabolism, Nitrogen metabolism,		
212816_s_at	cystathionine-beta-synthase	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Glycine, serine and threonine metabolism, Cysteine and methionine metabolism, Selenoamino acid metabolism,		
202481_at	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Retinol metabolism,		
219889_at	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Wnt signaling pathway,		
219764_at	frizzled homolog 10 (Drosophila)	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Wnt signaling pathway, Melanogenesis, Pathways in cancer, Colorectal cancer, Basal cell carcinoma,		
206109_at	fucosyltransferase 1 (galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase, H blood group)	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Glycosphingolipid biosynthesis, Glycosphingolipid biosynthesis,		
202722_s_at, 202721_s_at, 227027_at	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Alanine, aspartate and glutamate metabolism, Amino sugar and nucleotide sugar metabolism,		
204993_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Long-term depression,		
210587_at	inhibin, beta E	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Cytokine-cytokine receptor interaction, TGF-beta signaling pathway,		
221527_s_at	par-3 partitioning defective 3 homolog (C. elegans)	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Chemokine signaling pathway, Neuroactive ligand-receptor interaction, Endocytosis, Adherens junction, Tight junction,		
205251_at	period homolog 2 (Drosophila)	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Circadian rhythm,		
202847_at	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Glycolysis / Gluconeogenesis, Citrate cycle (TCA cycle), Pyruvate metabolism, PPAR signaling pathway, Insulin signaling pathway, Adipocytokine signaling pathway,		
226636_at	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Glycerophospholipid metabolism, Ether lipid metabolism, Endocytosis, Fc gamma R-mediated phagocytosis, GnRH signaling pathway, Pathways in cancer, Pancreatic cancer,		
228037_at	retinoic acid receptor, alpha	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Pathways in cancer, Acute myeloid leukemia,		
200802_at	seryl-tRNA synthetase	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Aminoacyl-tRNA biosynthesis,		
223196_s_at, 223195_s_at	sestrin 2	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	p53 signaling pathway,		
212870_at	son of sevenless homolog 2 (Drosophila)	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	MAPK signaling pathway, ErbB signaling pathway, Chemokine signaling pathway, Dorsal-ventral axis formation, Focal adhesion, Gap junction, Jak-STAT signaling pathway, Natural killer cell mediated cytotoxicity, T cell receptor signaling pathway, B cell receptor signaling pathway, Fc epsilon RI signaling pathway, Neurotrophin signaling pathway, Regulation of actin cytoskeleton, Insulin signaling pathway, GnRH signaling pathway, Pathways in cancer, Colorectal cancer, Renal cell carcinoma, Endometrial cancer, Glioma, Prostate cancer, Chronic myeloid leukemia, Acute myeloid leukemia, Non-small cell lung cancer,		
226899_at	unc-5 homolog B (C. elegans)	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Axon guidance,		
209375_at	xeroderma pigmentosum, complementation group C	Related Genes	Homo sapiens
KEGG_PATHWAY	Nucleotide excision repair,		