



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**

**TESIS**

**“EVALUACIÓN DEL ANTICANCERIGENO N-(2-HIDROXIFENIL)-2-  
PROPILPENTANAMIDA EN UN MODELO DE CÁNCER MAMARIO  
ALOTRANSPLANTADO A LA CÁPSULA RENAL DE ANIMALES  
RECEPTORES”**

**PRESENTA**

Q.F.B Cynthia Guadalupe Ramírez Farías

PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREA TOXICOLOGÍA

**TUTORES**

Dr. Andrés Quintanar Stephano

Dr. José Correa Basurto

**INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL**

Dr. Javier Ventura Juárez

AGUASCALIENTES, AGS., MÉXICO, NOVIEMBRE DEL 2018.



UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **CYNTHIA GUADALUPE RAMÍREZ FARÍAS** con ID 66576 quien realizó la tesis la tesis titulada: **EVALUACIÓN DEL ANTICANCERIGENO N-(2-HIDROXIFENIL)-2-PROPILPENTANAMIDA EN UN MODELO DE CÁNCER MAMARIO ALOTRANSPLANTADO A LA CÁPSULA RENAL DE ANIMALES RECEPTORES** y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 08 de noviembre de 2018.

Dr. Andrés Quintanar Stephano  
Tutor de tesis

Dr. José Correa Basurto  
Tutor de tesis

Dr. Javier Ventura Juárez  
Asesor de tesis

- c.c.p.- Interesado
- c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
- c.c.p.- Jefatura del Depto. de Fisiología y Farmacología
- c.c.p.- Consejero Académico
- c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE AGUASCALIENTES

CYNTHIA GUADALUPE RAMIREZ FARIAS  
MAESTRIA EN CIENCIAS, AREA TOXICOLOGIA  
P R E S E N T E.

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"EVALUACION DEL ANTICANCERIGENO N-(2-HIDROXIFENIL)-2-PROPILPENTANAMIDA EN UN MODELO DE CANCER MAMARIO ALOTRANSPLANTADO A LA CAPSULA RENAL DE ANIMALES RECEPTORES"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

**ATENTAMENTE**

Aguascalientes, Ags., a 08 de noviembre de 2018

*"Se lumen proferre"*

**EL DECANO**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Ruiz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.

## AGRADECIMIENTOS

Un largo camino llega a su fin, con momentos complicados y de mucho estrés pero de grandes enseñanzas. Tanto las altas como las bajas en este capítulo de mi vida, no podrían existir sin aquellas personas que contribuyeron de una forma u otra, a ellos rindo un pequeño “homenaje”.

Al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), gracias por el apoyo económico mediante el programa de becas nacionales (No. de apoyo 446361), proyectos CONACYT 254600 (reactivos), APN-782 (reactivos y beca agosto-octubre 2018) y proyecto INSIGNIA 2015-IPN (equipos HPLC). Al Consejo académico de la Maestría, Apoyo al posgrado, Decanato, Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes por su apoyo.

A mi comité tutorial: Dr Andrés Quintanar, Dr José Correa, Dr Javier Ventura, por su paciencia, apoyo, enseñanzas académicas y de vida. Por enseñarme que para ser un gran investigador se requiere de humildad, además de empeño e inteligencia. Al Dr. Daniel González Blas, Sr. Manuel Tinajero, Dr. Manuel Ávila por su apoyo en la parte histopatológica. Dra Eva María Salinas y Dr. Oscar Ortega del laboratorio de Inmunología (UAA) por la donación de la línea celular 4T1. La M en C. Adriana Cuellar por su apoyo en el uso del equipo de química húmeda.

A mi familia, mis papás, José Luis y Martha (Titos) por su inmenso e incondicional apoyo, porque cada logro alcanzado, no solo es mío, sino también de ellos, por todos sus sacrificios, por soportar mi humor, mis problemas, por guiarme a lo largo de mi vida. Hoy y siempre, eternamente agradecida a ellos, y en deuda. A mis hermanos, Carlos y Toño y sobrinos (Fer, Vane, Renata y Mateo), a mi cuñada Gris (Yiye), por esas esos domingos de tortas y estar ahí siempre que los necesito.

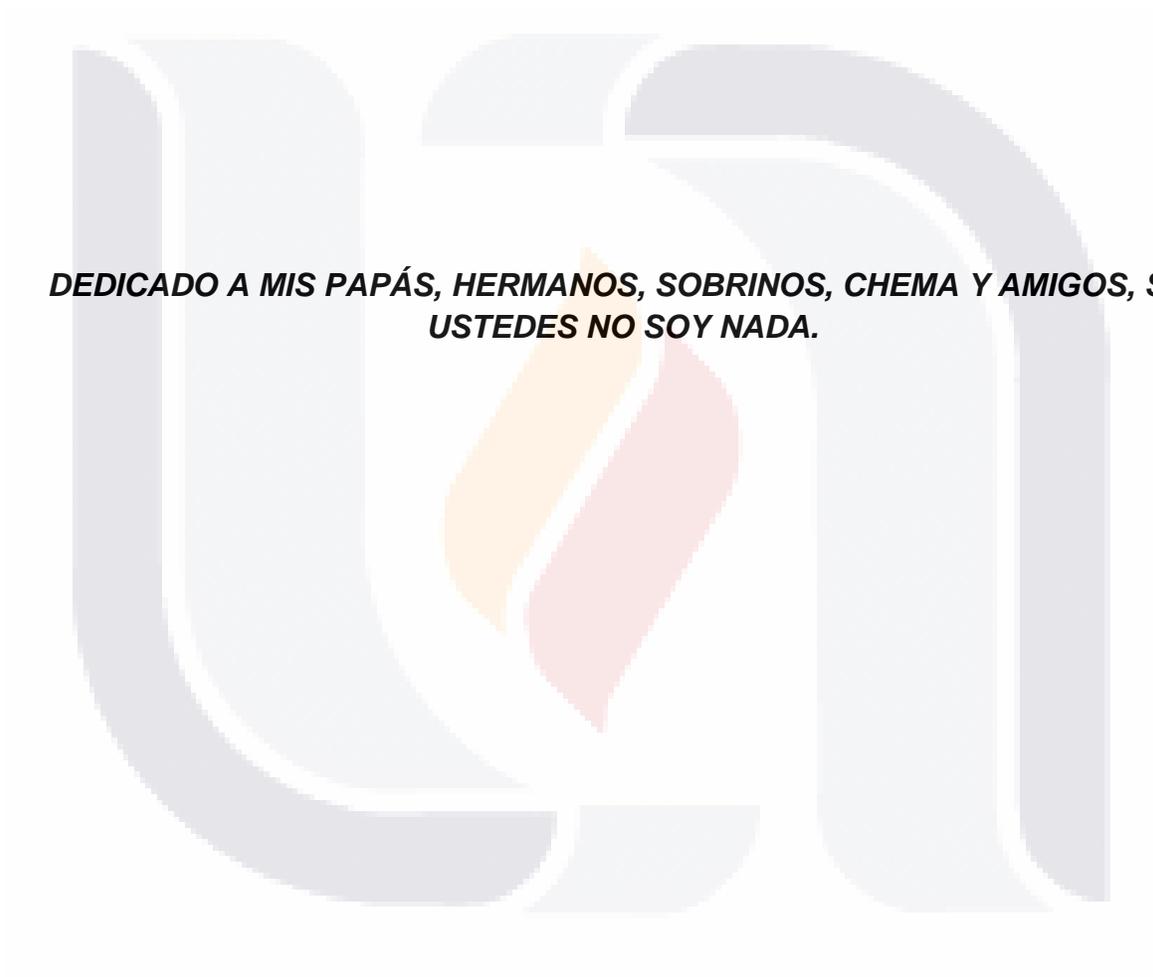
A mi pareja, José María (Chema), gracias por la comprensión, los regaños, por creer en mí, por las palabras de ánimo, por todos y cada uno de los días compartidos. TE AMO.

A mis amigas Armida, Jake, Zitlali y Viri, por esos momentos de ocio, risa y de estudio, por estar ahí en las buenas y las malas.

A mis compañeros del laboratorio 7 (NIE), Arge, Fer, Noé, Pau, Vero, Yesy (Danye), por sus bromas, pláticas, enseñanzas de vida y su apoyo en los momentos de duda, por su ayuda con los experimentos, por esos viernes sociales.

A mis grandes amigos, Diana, Vane y Hugo, que hicieron de mi estancia en CdMx algo maravilloso, prometo regresar, al personal del laboratorio de Síntesis molecular del IPN, Alan, Dr. Benjamín, Dr. Fragoso, Ana Correa, por su apoyo y sus enseñanzas.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



***DEDICADO A MIS PAPÁS, HERMANOS, SOBRINOS, CHEMA Y AMIGOS, SIN  
USTEDES NO SOY NADA.***

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

**ÍNDICE GENERAL**

1. INDICE DE FIGURAS .....	3
2. ÍNDICE DE TABLAS .....	4
3. RESUMEN .....	5
4. ABSTRACT.....	6
5. INTRODUCCIÓN.....	7
5.1. Cáncer .....	7
5.2. Cáncer de mama triple negativo (CMTN) .....	7
6. ANTECEDENTES .....	10
6.1. Epigenética .....	10
6.2. Histona desacetilasas (HDACs).....	13
6.2.1. <i>Histona desacetilasa 8 (HDAC8)</i> .....	15
6.3. Inhibidores de HDACs .....	18
6.3.1. <i>Ácido valproico</i> .....	22
6.3.2. <i>Ácido hidroxámico de suberoilánilida (SAHA)</i> .....	25
7. JUSTIFICACIÓN .....	30
7.1. Interacciones multidisciplinares .....	30
8. HIPOTESIS .....	32
9. OBJETIVO GENERAL .....	33
10. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	33
11. METODOLOGÍA .....	34
11.1. Síntesis del N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (SAHA-VPA) .....	34
11.2. Caracterización química .....	35
11.3. Estandarización del modelo de alotrasplante tumoral a la cápsula renal..	35
.....	35
11.4. Grupos de animales.....	37
11.5. Administración del compuesto SAHA-VPA.....	37
11.6. Histología.....	37
11.7. Análisis estadístico.....	38
12. RESULTADOS.....	38
12.1. Caracterización de la N-(2-hidroximetil)-2-propilpentanamida (SAHA-VPA)	38
.....	38
12.1.1. <i>Espectroscopía de infrarrojo (IR)</i> .....	39
12.1.2. <i>Resonancia magnética nuclear de protón (<sup>1</sup>H) y carbono 13 (<sup>13</sup>C)</i> ... 40	40

12.1.3. <i>Espectrometría de masas</i> .....	42
12.2. Estandarización de modelo de alotrasplante tumoral.....	43
12.3. Efectos antitumorales del compuesto SAHA-VPA sobre los tumores alotrasplantados a la cápsula renal (curva dosis-respuesta).....	44
13. DISCUSIÓN .....	55
13.1. Síntesis y Caracterización de N-(2-hidroximetil)-2-propilpentanamida (SAHA-VPA).....	55
13.2. Estandarización del modelo animal de alotrasplante tumoral a la cápsula renal.....	55
13.3. Efectos antitumorales del SAHA-VPA sobre los tumores alotrasplantado a la cápsula renal.....	55
13.4. Efectos hepatotóxicos y nefrotóxicos del SAHA-VPA. ....	56
13.5. Efecto del SAHA-VPA sobre la fibrosis tumoral. ....	59
14. CONCLUSIONES.....	60
15. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO .....	61
16. BIBLIOGRAFIA.....	62
ANEXOS .....	74

## 1. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. La estructura de la cromatina regula la actividad transcripcional.....	12
Figura 2. Clasificación de HDACs .....	14
Figura 3. Descripción general de los roles biológicos seleccionados de la histona desacetilasa 8 (HDAC8) .....	17
Figura 4. Clasificación general de inhibidores de la HDAC .....	19
Figura 5. Objetivos moleculares de las HDACs, las vías celulares descendentes y los resultados anticancerígenos de la inhibición de las HDACs .....	20
Figura 6. Estructura del ácido valproico (VPA).....	23
Figura 7. Representación esquemática de los blancos directos e indirectos del VPA .....	24
Figura 8. Estructura del ácido hidroxámico de suberoilánilida .....	26
Figura 9. Mecanismo de acción propuesto de la inducción del paro del ciclo celular y apoptosis por SAHA .....	26
Figura 10. Interacciones de diversos compuestos aril derivados de VPA, incluido el N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida.....	28
Figura 11. Efecto del VPA y la N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (2).....	29
Figura 12. Ruta sintética de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (SAHA-VPA). ...	34
Figura 13. Procedimiento para la estandarización del modelo de alotrasplante. ....	36
Figura 14. Análisis de espectroscopía de infrarrojo (IR) de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida .....	39
Figura 15. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida. ....	40
Figura 16. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida.....	41
Figura 17. Análisis de espectrometría de masas .....	42
Figura 18. Comparativa de estroma mamario sano vs carcinoma ductal de mama ..	44
Figura 20. Características macroscópicas y microscópicas del tejido tumoral .....	45
Figura 21. Porcentaje de área de fibrosis tumoral .....	46
Figura 22. Evaluación del porcentaje de colágena en los diferentes grupos experimentales .....	47
Figura 23. Curva de supervivencia de los grupos experimentales.....	48
Figura 24. Efectos de los diferentes tratamientos sobre el peso corporal .....	49
Figura 25. Evaluación histológica de la toxicidad hepática y renal del compuesto SAHA-VPA .....	50
Figura 26. Glucosa sérica .....	51
Figura 27. Proteínas séricas totales.....	52
Figura 28. Albúmina sérica.....	52
Figura 29. Aspartato aminotransferasa sérica .....	53
Figura 30. Alanino aminotransferasa sérica.....	53
Figura 31. Gráfica de creatinina en suero.....	54
Figura 32. Urea sérica .....	54

## 2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos biológicos múltiples de los inhibidores de histona desacetilasas.	21
Tabla 2. Se representan la potencia inhibidora relativa (HDAC1 a 11) de varios compuestos pan-, selectivos de clase I y clase II.....	27
Tabla 3. Registro semanal del peso corporal de los animales experimentales.....	74
Tabla 4. Resultados de las pruebas bioquímicas. ....	76
Tabla 5. Mediciones del porcentaje de fibrosis por campo.....	77



### 3. RESUMEN

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es una patología caracterizada por su difícil tratamiento, rápida recaída y alto índice de mortalidad. Actualmente se ha relacionado al CMTN con una sobreexpresión de la histona desacetilasa 8 (HDAC8), considerándose un promotor importante de la tumorigénesis. Los tratamientos con inhibidores de la enzima, como el ácido valproico, poseen elevada hepatotoxicidad. Por lo anterior, es importante encontrar nuevos tratamientos que satisfagan los criterios de efecto terapéutico y menores efectos secundarios. Prestegui-Martel y colaboradores (2016), diseñaron, sintetizaron y evaluaron el compuesto anticanceroso SAHA-VPA, el cual mostró un prometedor efecto antiproliferativo en la líneas celulares de cáncer de mama. Sin embargo, los efectos anticáncer y tóxicos del compuesto no han sido realizados “in vivo”, por lo que es importante determinar si el SAHA-VPA puede ser utilizado como una droga anticancerígena. Objetivos: 1) Estandarizar un modelo de CM inoculando células de la línea 4T1 a la cápsula renal de un ratón receptor. 2) Estudiar las características histopatológicas del tumor. 3) Sintetizar y purificar el compuesto SAHA-VPA. 4) Alotrasplantar fragmentos del tumor a la cápsula renal de ratones receptores y estudiar el efecto anticancerígeno y hepatotóxico y renal del compuesto SAHA-VPA por histopatología y pruebas de funcionamiento hepático y renal. Resultados y Conclusiones: 1) Se sintetizaron 1.5 g del compuesto SAHA-VPA, 2) se estandarizó el modelo de CMTN “in vivo”. 3) Los resultados de microscopía, mostraron que el SAHA-VPA tuvo un efecto antitumoral dependiente de la dosis, siendo la dosis de 30 mg/kg la más efectiva; los cambios histopatológicos más evidentes fueron la vacuolización citoplasmática de las células tumorales, apoptosis y necrosis tisular. La disminución de la fibrosis tumoral fue dependiente de dosis. Las pruebas del funcionamiento hepático y renal no mostraron diferencias significativas inherentes a los tratamientos sino al metabolismo tumoral.

#### 4. ABSTRACT

Triple negative breast cancer (CMTN) is a pathology characterized by its difficult treatment, rapid relapse and high mortality rate. Currently it has been related to CMTN with an overexpression of histone deacetylase 8 (HDAC8), considering an important promoter of tumorigenesis. Treatments with enzyme inhibitors, such as valproic acid, have elevated hepatotoxicity. Therefore, it is important to find new treatments that meet the criteria of the therapeutic effect and diminished side effects. Prestegui-Martel et al (2016), designed, synthesized and evaluated the anti-cancer compound SAHA-VPA, which was a promising antiproliferative effect in breast cancer cell lines. However, the effects against cancer and toxic compounds have not been made "in vivo", so it is important to determine if SAHA-VPA can be used as an anticancer drug. Objectives: 1) Standardize a BC model by inoculating cells from the 4T1 line to the renal capsule of a mouse receptor. 2) Study the histopathological characteristics of the tumor. 3) Synthesize and purify the SAHA-VPA compound. 4) Alotrasplantar tumor fragments to the renal capsule of recipient mice and study the anticancer and hepatotoxic and renal effect of the SAHA-VPA compound by histopathology and liver and renal function tests. Results and conclusions: 1) 1.5 g of the SAHA-VPA compound were synthesized, 2) the CMTN "in vivo" model was standardized. 3) The results of microscopy, show the SAHA-VPA had a dose-dependent antitumor effect, with the dose of 30 mg/kg being the most effective; the most obvious histopathological changes were cytoplasmic vacuolization of the tumor cells, apoptosis and tissue necrosis. The decrease in tumor fibrosis was dose dependent. The liver and kidney function tests do not have significant differences inherent to the treatments, but to the tumor metabolism.

## 5. INTRODUCCIÓN

### 5.1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad de las células en la cual desarrollan una capacidad proliferativa descontrolada con pérdida de los patrones normales del comportamiento celular. El cáncer surge de una serie de cambios genéticos (mutaciones) y epigenéticos, que usualmente involucra proteínas asociadas al ADN que influyen en la expresión génica y que dan como resultado la transformación maligna de las células cancerosas. Los cambios en los genes responsables de la carcinogénesis pueden ser heredados o ser adquiridos *de novo* (mutaciones somáticas), generalmente son producto de la exposición a sustancias del medio ambiente, como la radiación ultravioleta, o conductuales como el hábito de fumar en que los individuos se exponen a productos químicos del humo del tabaco, o bien a la exposición de agentes biológicos como algunos virus (Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva, 2017; Mitrus, Bryndza, Sochanik, & Szala, 2012; Weitzel, Blazer, MacDonald, Culver, & Offit, 2011).

### 5.2. Cáncer de mama triple negativo (CMTN)

El cáncer de mama (CM) es una enfermedad heterogénea en su desarrollo y progresión, debido a que el proceso invasivo está asociado a una variedad de alteraciones moleculares, dichas alteraciones conducen a diferentes subtipos de la enfermedad. Así, el cáncer de mama se clasifica en: 1) Tumores mamarios tipo Luminal A y Luminal B, los cuales están relacionados con un buen pronóstico ya que expresan receptores estrogénicos (ER). 2) Los cánceres de mama que expresan el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2<sup>+</sup>), los cuales no poseen receptores de estrógenos (ER negativos) y 3) Los tumores de mama triple negativo (CMTN), los cuales son ER y HER-2 negativos) están asociados a un mal pronóstico (Claude-Taupin, Boyer-Guittaut, Delage-Mourroux, & Hervouet, 2015; Holliday & Speirs, 2011; Neve et al., 2006; Ng, Ong, Jegadeesan, Deng, & Yap, 2017; Perou et al., 2000; Prat et al., 2010).

El CM sigue siendo el cáncer femenino diagnosticado más prevalente a nivel mundial con un estimado de 1´671,149 nuevos casos diagnosticados anualmente y con una prevalencia de 6´232,108, lo que representa el 36.3% de todos los cánceres. Los países desarrollados

presentan una mayor incidencia (Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva, 2017).

Entre los subtipos de cáncer más peligrosos destaca el cáncer de mama triple negativo (CMTN), por su complejidad y pobres resultados terapéuticos. Debido a esto, ha capturado la atención de investigadores básicos y clínicos. A la fecha, no parece haber aún un consenso en relación a la definición del término “triple negativo”. Una de las definiciones más apropiadas quizás es la señalada por Oakman y colaboradores (2010), quienes definen el CMTN como “un estado inmunohistoquímico para cánceres con biología y conducta clínica heterogénea” (Oakman, Viale, & Di Leo, 2010; Prat et al., 2010). El CMTN es un concepto dentro de la oncología que nace luego que se reconocieran los diferentes perfiles genéticos del cáncer de mama. Después de la identificación del subtipo basal del cáncer de mama, denominado así debido a que su perfil de expresión genético es similar al de células basales, se observó que durante la evaluación con estudios de inmunohistoquímica para antígenos específicos, un grupo de tumores cancerosos no expresaron RE, receptores de progesterona (RP) y de HER-2 (Livasy et al., 2006; Nielsen et al., 2004).

Dentro del grupo de CMTN, solo el 70% representa tumores basaloideos verdaderos (Dogu et al., 2010), los cuales presentan un perfil epidemiológico diferente, caracterizado por ser más frecuente en mujeres afroamericanas y latinas, que en caucásicas (Carey et al., 2006). En comparación con los otros subtipos de cáncer mamario (dependientes de hormonas), la conducta biológica del CMTN suele ser más agresiva y con una mayor tendencia a desarrollar metástasis, predominando las metástasis viscerales a hígado, pulmón y sistema nervioso central, asimismo, el curso clínico es más agresivo, con recurrencias tempranas y con mayor riesgo de muerte (Dent et al., 2007).

El CMTN ha desarrollado una conducta biológica diferente, su epidemiología no ha sido claramente precisada (National Comprehensive Cancer Network, 2018). Además, el diagnóstico, manejo y seguimiento del CMTN es un reto para el oncólogo clínico, ya que a pesar de las alta tasa de una buena respuesta a la quimioterapia, la respuesta no es permanente por lo que los resultados iniciales favorables son cortos ya que desarrollan mecanismos de resistencia en precoz, siendo esta una paradoja del CMTN (Carey et al., 2007). Por otro lado, estos tumores no responden a la terapia endocrina y no existe una terapia blanco eficaz disponible (Zaharia & Gomez, 2013).

En lo referente a la heterogeneidad del CMTN, concepto derivado del diferente resultado al mismo tratamiento anti-cáncer, el análisis molecular de los perfiles del RNA mensajero de este subtipo de cáncer ha permitido clasificar a estos tipos de cáncer en los siguientes subtipos: 1) Tipo basal con una mayor frecuencia que va del 71-91% de los casos de CMTN; 2) el segundo grupo con mayor frecuencia presenta una baja expresión de Claudina (*Low-Claudin*), con una frecuencia del 30%, 3) el HER-2 enriquecido, es menos frecuente, 4) el luminal A y luminal B, que son tumores con expresión normal de receptores, con un 9, 5, 6 y 1% de los casos de CMTN respectivamente (Oakman et al., 2010; Perou, 2010; Prat et al., 2013). Por otro lado, Lehman y colaboradores (2011) propusieron otra clasificación, basada en estudios con microarreglos, en el que describen 7 subtipos de CMTN, en los que además, difieren en su comportamiento clínico, sensibilidad a la quimioterapia y supervivencia (B. D. Lehmann et al., 2011; Vallejos et al., 2010).

En la población latina, CMTN presenta una alta incidencia; en México la frecuencia fue del 23,1% (Lara-Medina et al., 2011; Márquez, Lacruz, & Borges, 2012; Vallejos et al., 2010). Otros datos indican que las tasas más altas de CMTN ocurre en mujeres jóvenes y que podrían estar asociados con una mayor probabilidad de mutación en el gen BRCA1 (Foulkes et al., 2003). Asimismo, se ha descrito una mayor incidencia de CMTN en mujeres de grupos socioeconómicos bajos (Lara-Medina et al., 2011).

Aún no se precisan los factores de riesgo para el CMTN, lo que impide estrategias de intervención claras, sin embargo, se ha encontrado que a diferencia del cáncer de mama dependiente de hormonas, en el que la gestación juega un papel protector, en el CMTN, la gestación parece ser un factor de riesgo importante, tal como lo describieron Phipps y colaboradores (2011), ellos indican que las mujeres que tienen un mayor número de hijos (tres o más partos) tenían 1,4 veces mayor riesgo de desarrollar CMTN, sin embargo, aquellas mujeres multíparas (tres o más partos) tuvieron 22% menos riesgo de desarrollar tumores hormonales (Phipps et al., 2011). Se ha propuesto una relación entre la obesidad y el riesgo de desarrollar cáncer de mama dependiente de hormonas en las mujeres posmenopáusicas y se ha asociado a la conversión hormonal en los depósitos de grasa a estrógeno, síntesis mediada por la enzima aromatasa (Calle & Kaaks, 2004). Dado que el CMTN no es dependiente de hormonas, su relación con el sobrepeso no ha sido esclarecida. Pieboron y Frankenfeld (2013), realizaron una revisión sistemática de once estudios epidemiológicos que incluyeron a más de 24 mil pacientes con cáncer de mama.

Estos autores, encontraron que las mujeres premenopáusicas y obesas tienen 1,4 veces el riesgo de enfermar de un CMTN (Pierobon & Frankenfeld, 2013). Otro estudio realizado con más de 140 mil mujeres mostró que no existía asociación entre el fenotipo triple negativo con el consumo de alcohol o tabaco, pero sí una asociación sugerente entre el consumo de alcohol y tabaco con los tumores de mama dependientes de hormonas (Kabat et al., 2011).

Por lo anterior, es que en este proyecto se propone la estandarización de un modelo animal de alotrasplante de tumores para ser utilizado en la evaluación de nuevos compuestos para el tratamiento subtipos de esta patología, así como su toxicidad para órganos importantes.

## **6. ANTECEDENTES**

### **6.1. Epigenética**

La definición actual de epigenética es "el estudio de cambios hereditarios en la expresión génica que ocurren independientemente de los cambios en la secuencia de ADN primaria" (Sharma, Kelly, & Jones, 2010). La mayoría de estos cambios hereditarios se establecen durante la diferenciación y se mantienen de manera estable a través de múltiples ciclos de división celular, lo que permite que las células tengan identidades distintas al tiempo que contienen la misma información genética. Esta heredabilidad de los patrones de expresión génica está mediada por modificaciones epigenéticas. La falla en el mantenimiento apropiado de las marcas epigenéticas hereditarias puede resultar en una activación o inhibición inapropiada de varias vías de señalización y conducir a estados de enfermedad como el cáncer (Egger, Liang, Aparicio, & Jones, 2004; P. A. Jones & Baylin, 2002).

En adición de las alteraciones genéticas en la secuencia de ADN, los cánceres albergan numerosas alteraciones epigenéticas, que regulan la expresión génica y las vías de señalización en la célula maligna. Estas alteraciones además, pueden superar en número a las alteraciones genéticas y, por lo general, ocurren temprano en la carcinogénesis (Geutjes, Bajpe, & Bernards, 2012). Numerosos datos sugieren que la epigenética junto con la genética se cruzan para promover la carcinogénesis en todas las etapas del desarrollo del cáncer. Cada vez más, la secuenciación genómica de tumores humanos ha identificado mutaciones en genes que codifican proteínas que regulan el epigenoma. Las alteraciones

epigenéticas son en muchos casos dinámicas y reversibles, lo que representa objetivos interesantes para la terapia del cáncer (Bjornsson et al., 2008).

Los mecanismos epigenéticos de expresión génica implican diversas alteraciones reversibles en la estructura de la cromatina sin cambios en la secuencia de nucleótidos. La cromatina es el complejo macromolecular del ADN y las proteínas histonas que permite empaquetar todo el genoma en una sola célula. La unidad funcional básica de la cromatina es el nucleosoma, un octámero que contiene dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, alrededor de las cuales se envuelven 146 pb de ADN (Dawson, Kouzarides, & Huntly, 2012). Los nucleosomas consecutivos están separados por ADN enlazador, generalmente de 20 y 50 pb de longitud (Segal & Widom, 2009). Clásicamente, el ADN nucleosomal es menos accesible que el ADN del enlazador; el grado de compactación de nucleosomas influye fuertemente en la capacidad de las proteínas para dirigir secuencias dentro del ADN, modulando la transcripción, reparación y replicación de genes (Yang & Schwartz, 2011). La estructura de la cromatina define el estado en el cual la información genética en forma de ADN es organizada en el interior de la célula. Esta organización del genoma en una estructura precisa y compacta que influye enormemente la habilidad de los genes para ser activados o silenciados (Sharma et al., 2010).

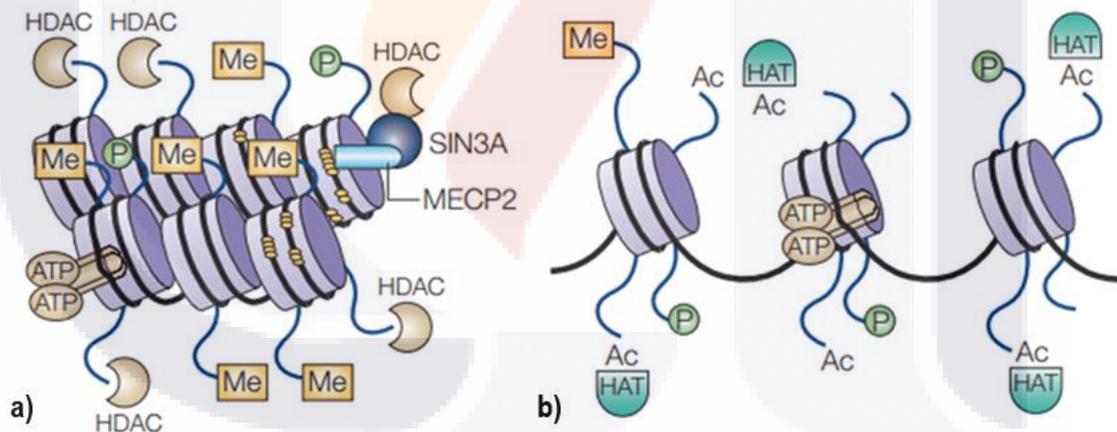
Los avances recientes en el campo de la epigenética han mostrado que las células cancerosas humanas albergan anomalías epigenéticas globales, además de numerosas alteraciones genéticas (P. A. Jones & Baylin, 2002; P. A. Jones & Martienssen, 2005). Estas alteraciones genéticas y epigenéticas interactúan en todas las etapas del desarrollo del cáncer, promoviendo simultáneamente la progresión del cáncer (P. L. Jones et al., 1998).

Existen tres tipos principales de mecanismos epigenéticos: la metilación del ADN, la modificación de la cola de las histonas y la regulación no-micro del ARN micro (Yang & Schwartz, 2011).

En las modificaciones de la cola de las histonas, las proteínas de histona, que comprenden el núcleo de nucleosoma, contienen un dominio C-terminal globular y una cola N-terminal no estructurada (Luger, Mäder, Richmond, Sargent, & Richmond, 1997). Las colas N-terminales de las histonas pueden experimentar una variedad de modificaciones covalentes postraduccionales que incluyen metilación, acetilación, ubiquitilación, sumoilación y

fosforilación en residuos específicos. Estas modificaciones regulan los procesos celulares clave, como la transcripción, la replicación y la reparación (Kouzarides, 2007). El complemento de modificación se propone para almacenar la memoria epigenética dentro de una célula en forma de un "código de histona" que determina la estructura y la actividad de diferentes regiones de cromatina (Jenuwein & Allis, 2001).

Las modificaciones de las histonas funcionan ya sea cambiando la accesibilidad de la cromatina o reclutando y/u ocluyendo proteínas efectoras no histonas, que decodifican el mensaje codificado por los patrones de modificación. El mecanismo de herencia de este código de histonas, sin embargo, todavía no se entiende completamente. A diferencia de la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas pueden conducir a la activación o represión dependiendo de qué residuos se modifican y el tipo de modificaciones presentes. Por ejemplo, la acetilación de lisina se correlaciona con la activación transcripcional (Hebbes, Thorne, & Cranerobinson, 1988; Johnstone, 2002; Kouzarides, 2007), mientras que la metilación de lisina conduce a la activación o represión transcripcional dependiendo de qué residuo se modifica y el grado de metilación (Kouzarides, 2007) (Fig. 1).



**Figura 1. La estructura de la cromatina regula la actividad transcripcional.** a) La metilación del ADN y la desacetilación de histonas inducen una configuración "cerrada" (condensada) de la cromatina y por ende la represión transcripcional; b) la acetilación de histonas y la desmetilación del ADN relaja la cromatina, permitiendo la activación de la transcripción. Modificado de Johnstone, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2002.

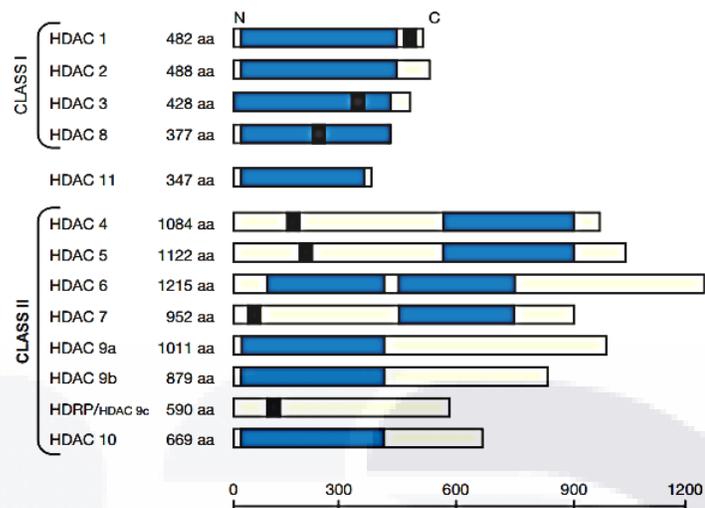
Se han identificado una amplia gama de modificaciones de histonas activas y represivas, que constituyen una compleja red reguladora de genes esenciales para las actividades fisiológicas de las células (Bernstein, Meissner, & Lander, 2007; Kouzarides, 2007). Los estudios genómicos que muestran una localización clara y patrones combinatorios de estas marcas de histonas en el genoma han aumentado significativamente nuestra comprensión

de cómo estas diversas modificaciones actúan de forma cooperativa para regular los patrones globales de expresión génica (Barski et al., 2007; Z. Wang et al., 2008). Los patrones específicos de las modificaciones de las histonas están presentes en distintos tipos de células y se propone que desempeñan un papel clave en la determinación de la identidad celular (Sharma et al., 2010).

Gracias a los recientes avances en la secuenciación de alto rendimiento, se ha logrado el mapeo del genoma y de los cambios de la cromatina que se producen durante la tumorigénesis. Estos estudios han revelado una pérdida global de H4-lisina 16 acetilada (H4K16ac) y trimetilación H4-lisina 20 (H4K20me3) (Weisenberger et al., 2006). Tal pérdida de acetilación de histonas, mediada por enzimas llamadas histona desacetilasas (HDACs), da como resultado la represión génica. Las HDACs a menudo se encuentran sobreexpresadas en varios tipos de cáncer convirtiéndose en un objetivo principal para la terapia epigenética (Fraga et al., 2005; Zhao et al., 2009). Las enzimas histona acetilasas (HATs), que funcionan conjuntamente con HDACs para mantener los niveles de acetilación de histonas, pueden regular la expresión de genes relevantes para el cáncer y luego desempeñar un papel positivo en la carcinogénesis y la progresión tumoral (Baylin & Ohm, 2006; De Souza & Chatterji, 2015).

## **6.2. Histona desacetilasas (HDACs)**

Hay dos familias de proteínas con actividad HDAC: la familia SIR2 dependientes de NAD<sup>+</sup> y la familia clásica HDAC. Los miembros de la familia clásica HDAC se dividen en dos clases filogenéticas diferentes, a saber, la clase I y la clase II (Fig. 2) (Bjerling et al., 2002; Fischle et al., 2002). Las HDAC de clase I (HDAC1, 2, 3 y 8) están más estrechamente relacionadas con el regulador transcripcional de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) RPD3. Las HDAC de clase II (HDAC4, 5, 6, 7, 9 y 10) comparten dominios con similitud con HDAC1, otra desacetilasa encontrada en levadura (Bjerling et al., 2002). Actualmente se piensa que las HDACs de clase I se expresan en la mayoría de los tipos celulares, mientras que el patrón de expresión de las HDACs de clase II es más restringido, lo que sugiere que podrían estar involucrados en la diferenciación celular y procesos del desarrollo (Buggy et al., 2000; de Ruijter, van Gennip, Caron, Kemp, & van Kuilenburg, 2003; Galasinski, Resing, Goodrich, & Ahn, 2002).



**Figura 2. Clasificación de HDACs.** Tomado de Ruijter et al., *Biochemical Journal*, 2003.

Para ejercer su función, las HDACs deben estar en el núcleo, lugar donde se encuentra su sustrato predominante. La localización nuclear de las HDACs se produce a través de una señal de localización nuclear (NLS) o mediante co-localización junto con otras proteínas HDACs. La mayoría de las HDACs contienen un NLS, pero algunas también pueden ser citosólicas; esto depende de otros dominios reguladores. Las HDACs de Clase I se encuentran casi exclusivamente en el núcleo. Debido a la sobreexpresión de la HDAC8 (necesaria debido a su baja abundancia), se pudo demostrar que esta proteína era localizada en el núcleo (Van den Wyngaert et al., 2000).

El mecanismo de acción de las enzimas HDACs implica la eliminación del grupo acetilo de las histonas que componen el nucleosoma. La hipoacetilación produce una disminución en el espacio entre el nucleosoma y el ADN que se envuelve alrededor de él. Una mayor envoltura del ADN disminuye la accesibilidad de los factores de transcripción, lo que lleva a la represión transcripcional (Strahl & Allis, 2000; Wade, 2001). El dominio catalítico de la HDAC está formado por un fragmento de aminoácidos C390 que consiste en un conjunto de aminoácidos conservados. El sitio activo consiste en un bolsillo tubular suavemente curvado con un fondo más ancho (Finnin et al., 1999). La eliminación de un grupo acetilo se produce a través de un sistema de carga-relevo que consiste en dos restos de histidina adyacentes, dos residuos aspárticos y un residuo de tirosina (Buggy et al., 2000; Finnin et al., 1999). Un componente esencial del sistema de relevo de carga es la presencia de un

ion  $Zn^{2+}$ , éste átomo está unido al sitio de unión de zinc en el fondo del bolsillo. Sin embargo, se requieren otros co-factores para la actividad de la HDAC. La función de los inhibidores de la HDAC es desplazar el ion de zinc y hace que el sistema de relevo de carga sea disfuncional (Finnin et al., 1999).

Se pueden esperar efectos tanto positivos como negativos de las HDACs en los mecanismos oncogénicos y oncosupresores. Debe existir un balance en dichos mecanismos, cualquier cambio en este balance puede tener consecuencias dramáticas en el fenotipo de la célula. Hay pocos estudios pero significativos del efecto de la disrupción del balance entre HAT y HDAC en tumores sólidos, en los que se han observado mutaciones e inactivaciones de HATs específicas en un número pequeño de pacientes de cáncer (Minucci, Nervi, Lo Coco, & Pelicci, 2001). Un análisis más exhaustivo de un panel de tejidos normales, líneas celulares de cáncer y tumores primarios ha mostrado una pérdida generalizada de formas de la histona H4 monoacetilada (en K16) y trimetilada (en K20) en un gran número de tumores. Esta pérdida ocurre en secuencias repetitivas de ADN y es paralela a la pérdida global de metilación del ADN en estas áreas, que también está asociada con la tumorigénesis (Fraga et al., 2005). Los bajos niveles de acetilación de histonas, que por sí solos no son suficientes para hacer predicciones estadísticamente significativas, se correlacionan con un peor resultado clínico. Además, la expresión de las enzimas HDAC en sí mismas puede estar regulada por incremento o disminución en varios tipos de cáncer. Sin embargo, la mayoría de los estudios muestran que existe una variación considerable en los niveles de expresión entre tumores de la misma entidad. En general, la expresión de las HDACs de clase I tiende a ser mayor en las muestras tumorales en comparación con el tejido normal correspondiente. Por el contrario, las HDACs de clase II parecen estar reguladas negativamente y la elevada expresión se correlacionó con un mejor pronóstico (Weichert, 2009). Hasta la fecha, sin embargo, la evidencia más convincente de que las HDACs se comportan de manera diferente en las células cancerosas que en las células normales se deriva de la manipulación farmacológica de las HDACs a través de HDACi (Minucci & Pelicci, 2006).

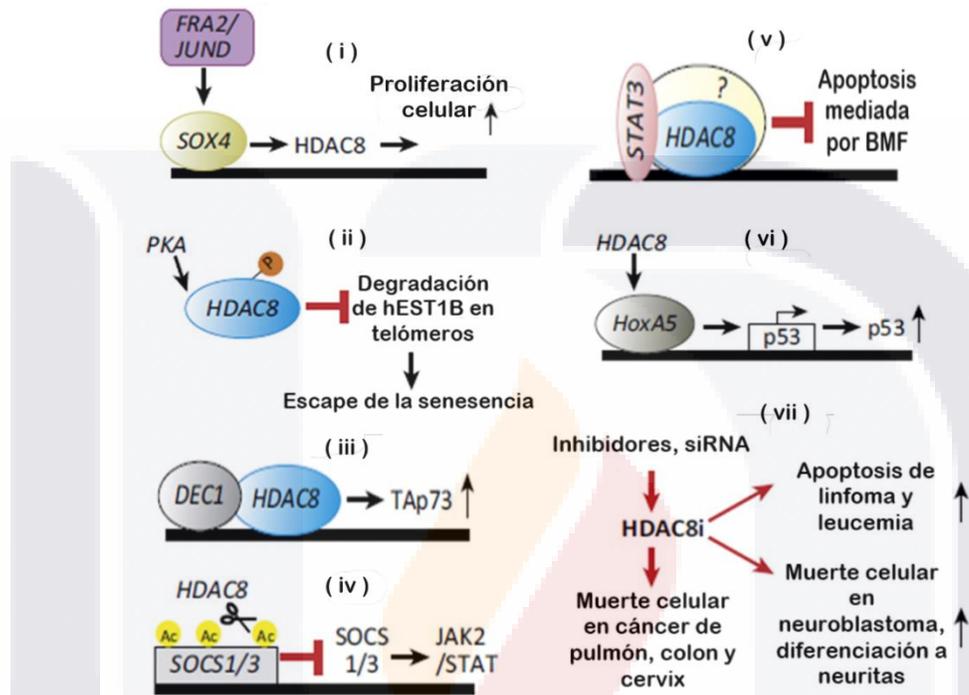
### **6.2.1. Histona desacetilasa 8 (HDAC8)**

La HDAC8 es una HDAC clase I dependiente de zinc que contiene 377 aminoácidos (42 kDa) que se expresa de forma ubicua y que puede localizarse en el núcleo (sitio primario)

o el citoplasma (Buggy et al., 2000; Hu et al., 2000; Li et al., 2014; Van den Wyngaert et al., 2000). La HDAC8 procede de otras enzimas de clase I al principio de la evolución, lo que indica una especialización funcional discreta (Gregoretti, Lee, & Goodson, 2004). Algunas proteínas únicas no histonas, como la cohesina, el receptor de estrógeno alfa (ER $\alpha$ ) o la proteína de unión a actina cortical (cortactina), se han relacionado con la HDAC8 (Deardorff et al., 2012; Olson et al., 2014; Wilson, Tremblay, Deblois, Sylvain-Drolet, & Giguere, 2010). Por lo tanto, controla diversos procesos, como la separación de cromátidas hermanas, la homeostasis energética, la integridad de los microtúbulos y la contracción muscular (Deardorff et al., 2012; Li et al., 2014; Wilson et al., 2010). En consecuencia, no es sorprendente que la HDAC8 tenga un papel multifacético en la fisiopatología humana. En el cáncer, la HDAC8 está desregulada, sobreexpresada o interactúa con factores de transcripción (M. Lehmann et al., 2014; Park et al., 2011; Qian, Zhang, Jung, & Chen, 2014; Yan et al., 2013).

Mecánicamente, la HDAC8 interacciona con diversas macromoléculas: (i) SOX4 induce la expresión de HDAC8, SOX4 es un gen objetivo directo de FRA2/JUND (Higuchi, Nakayama, Arao, Nishio, & Yoshie, 2013). (ii) Se ha demostrado que la HDAC8 afecta la actividad de la telomerasa al proteger la proteína de telómeros humanos cada vez más cortos 1B (hEST1B), la cual se acorta en los telómeros humanos frente a la degradación mediada por ubiquitina, una función dependiente del estado de fosforilación de la HDAC8. Como resultado, los telómeros escapan al acortamiento y, en consecuencia, las células escapan a la senescencia (Lee, Sengupta, Villagra, Rezai-Zadeh, & Seto, 2006). (iii) la HDAC8 se asocia con DEC1 para regular a la alza la expresión de Tap73 y controlar el equilibrio de este supresor tumoral (Qian et al., 2014). (iv) La HDAC8 reprime la expresión de SOCS1/3, que a su vez potencia la expresión de JAK2/STAT y el crecimiento celular (Gao et al., 2013). (v) La HDAC8 interactúa con STAT3 para reprimir la transcripción del factor modificador Bcl-2- (BMF). BMF tiene una función importante en la ejecución de la apoptosis desencadenada por el metabolito metilselenopiruvato, que es un inhibidor de la HDAC8 (Nian, Bisson, Dashwood, Pinto, & Dashwood, 2009). (vi) El agotamiento de la HDAC8 disminuye la expresión de homeobox A5 (HoxA5) dependiente de tipo salvaje (WT) y p53 mutante (mtp53) (Yan et al., 2013). La HDAC8 es necesaria para la expresión de p53, independientemente de si es WT o está mutado. Sin embargo, la depleción o inhibición de la HDAC8 solo afecta la proliferación de aquellas células que albergan una mutación de

p53. Esto sugiere que los inhibidores de la HDAC8 pueden actuar como un adyuvante para tumores que portan un p53 mutante (Oehme, Deubzer, Lodrini, Milde, & Witt, 2009). (vii) La inhibición de la HDAC8 por siARN u otros inhibidores conduce a la muerte celular, apoptosis y diferenciación celular (Chakrabarti et al., 2015) (Fig. 3).



**Figura 3. Descripción general de los roles biológicos seleccionados de la histona desacetilasa 8 (HDAC8).** Interacciones moleculares representativas de HDAC8 con proteínas cruciales en el cáncer. Modificado de Chakrabarti et al., *Trends in Pharmacological Science*, 2015.

Como se comentó previamente, una de las alteraciones epigenéticas más comunes en cáncer es la expresión alterada de la HDACs, tanto en tumores hematológicos como en sólidos. A su vez, se ha demostrado que la proteína HDAC8 se sobreexpresa como un mecanismo de resistencia a la terapia antineoplásica, favoreciendo los procesos metastásicos, mediante la represión de la transcripción génica. El silenciamiento de genes supresores tumorales (ej, p21) a través de la hipoacetilación, es una característica distintiva de muchos tipos de cáncer, y gira a través de la inhibición de la HDAC, mediante dicha inhibición se han demostrado beneficios clínicos (Hyun-Jung & Suk-Chul, 2011).

La invasión del cáncer y la metástasis son las principales causas de mortalidad en pacientes con cáncer de mama. La metástasis tumoral consiste en adhesión celular, invasión y

angiogénesis. Se ha reconocido a las metaloproteinasas de la matriz (MMP) como importantes mediadores de la degradación de la matriz extracelular (ECECM). Park y colaboradores (2011), determinaron que la sobreexpresión de las HDAC8, 4 y 6, están involucradas en el aumento de la capacidad invasiva de líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), así como aumento en la expresión de ARNm de la MMP-9 y (Cavallaro & Christofori, 2001; Eiseler et al., 2009; Park et al., 2011).

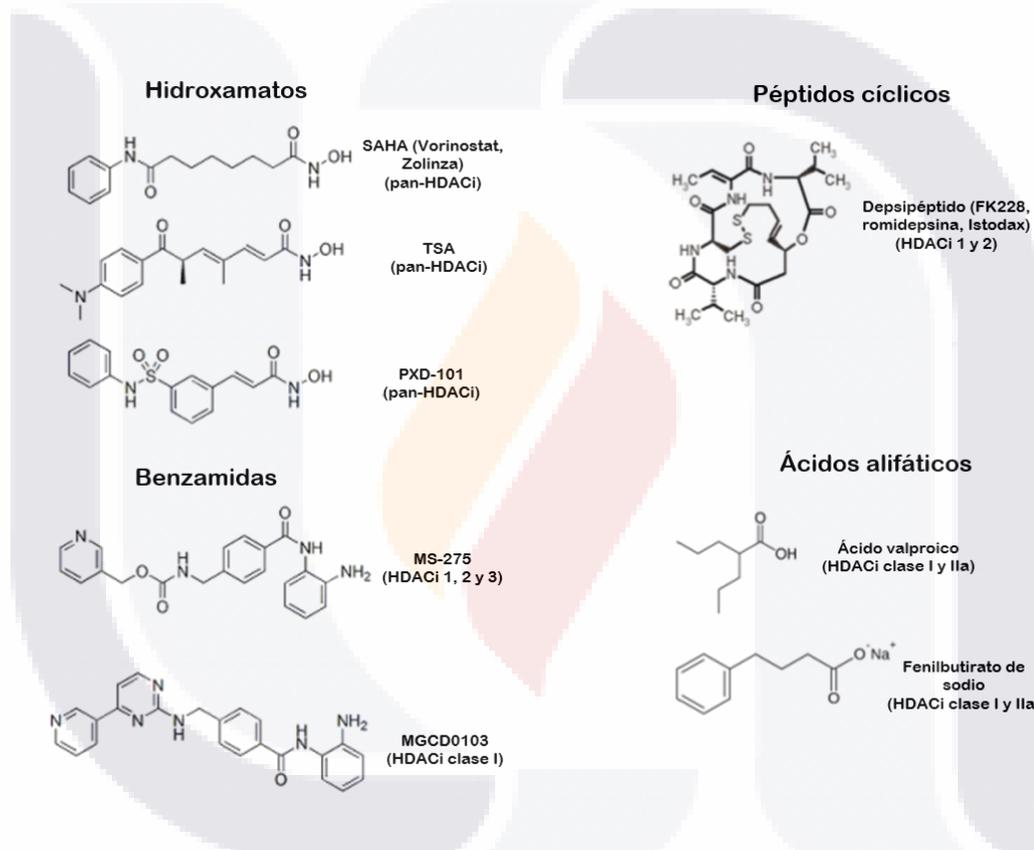
A pesar de contar con diversos estudios sobre el efecto de la HDAC8 en cáncer, los estudios sobre la participación de ésta enzima en el cáncer de mama triple negativo (CMTN) son escasos. De acuerdo con Freed-Pastor y Prives (2012), la mutación del gen p53 es la más frecuente en los carcinomas mamarios (Freed-Pastor & Prives, 2012). Dicha mutación confiere a la proteína p53 funciones oncogénicas, mediante su interacción con otros factores de transcripción, lo que posteriormente conduce a que p53 tenga un papel oncogénico en la tumorigénesis y metástasis (Walerych, Napoli, Collavin, & Del Sal, 2012; Xu et al., 2011).

Actualmente, las evidencias apuntan a que la proteína del gen mtp53 se encuentra sobreexpresada en las células de CMTN y está involucrada en su resistencia a la apoptosis e inhibición a la autofagia (Braicu et al., 2015). Se ha establecido que pacientes con CMTN y una mutación en p53 presentan una mala respuesta a la quimio y radioterapia y un pronóstico desfavorable con una reducción en el tiempo de supervivencia. Por lo anterior, la supresión de la expresión del mtp53, puede ser un enfoque potencial para suprimir la progresión y aumentar la sensibilidad a la apoptosis de las células de CMTN (Liu et al., 2014; Turner et al., 2013).

### **6.3. Inhibidores de HDACs**

El potencial anticancerígeno de los inhibidores de la HDAC (HDACi) proviene de su capacidad de afectar varios procesos celulares que están desregulados en células neoplásicas. En su mayor parte, la activación de los programas de diferenciación, la inhibición del ciclo celular y la inducción de apoptosis son las principales actividades antitumorales de estos compuestos. Además, la activación de la respuesta inmune del huésped y la inhibición de la angiogénesis también podrían tener un papel importante en la regresión tumoral mediada por los inhibidores de HDAC “in vivo” (Johnstone, 2002).

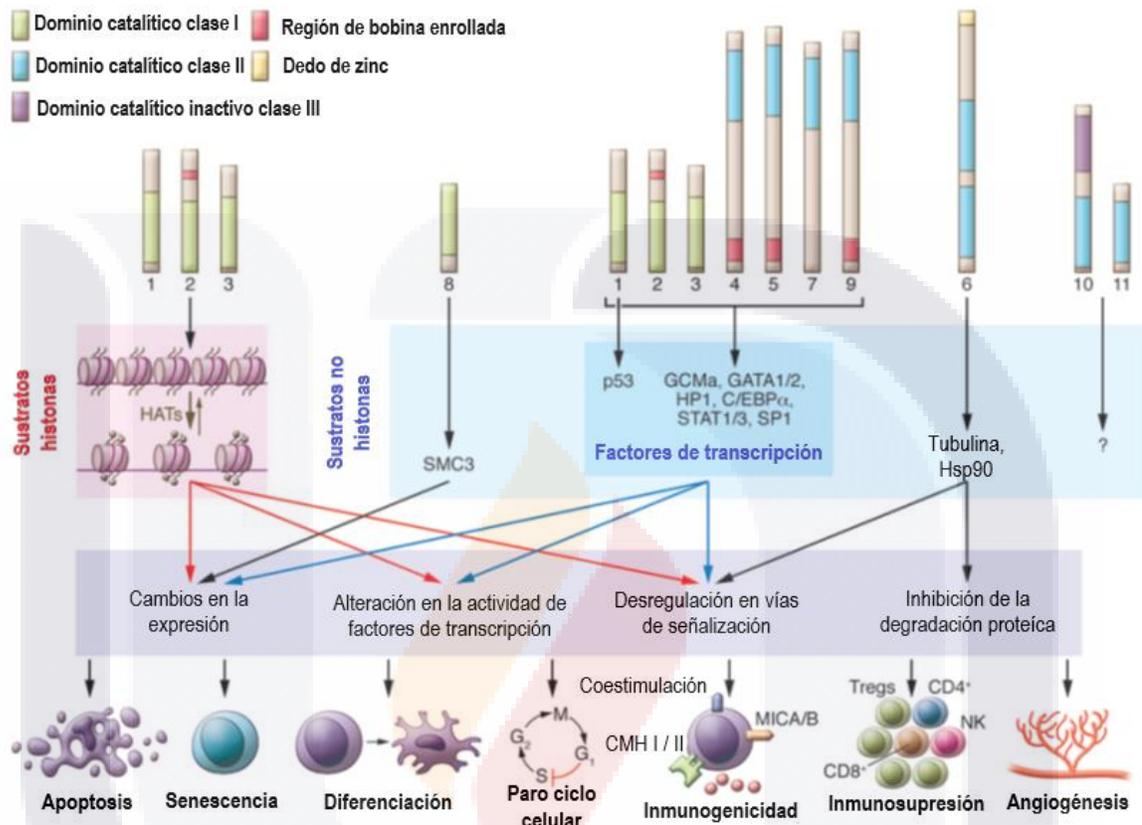
Los HDACi pueden ser agrupados estructuralmente en al menos cuatro clases: hidroxamatos, péptidos cíclicos, ácidos alifáticos y benzamidas. El Tricostatin A (TSA) fue el primer hidroxamato natural con actividad inhibitoria sobre las HDACs. Vorinostat (SAHA), el primer inhibidor de la HDAC aprobado por la FDA, el cual es estructuralmente similar al TSA, actualmente se utiliza para el tratamiento refractario y recaída del linfoma cutáneo de células T. Otros inhibidores de la HDAC tales como los ácidos alifáticos (butirato, fenilbutirato, y ácido valproico) son relativamente débiles, con actividad a concentraciones milimolares (Mm) (Hyun-Jung & Suk-Chul, 2011) (Fig. 4).



**Figura 4. Clasificación general de inhibidores de la HDAC.** El ácido hidroxámico de suberoilánilida (SAHA) muestra actividad a concentraciones  $\mu\text{M}$ . El ácido valproico presenta actividad a concentraciones  $\text{mM}$  y es específico de HDAC clase I y clase IIa. Modificado de Hyun- Jung & Suk-Chul, *American Journal Of Translational Research*, 2011.

Los HDACi tienen múltiples efectos biológicos como consecuencia de la alteración en los patrones de acetilación de las histonas y muchas proteínas no histonas, dichos efectos van desde la regulación de la expresión génica, apoptosis (vías intrínseca y extrínseca), paro del ciclo celular, diferenciación e inhibición de la angiogénesis, así como actividad inmunomoduladora que puede contribuir a mediar en sus efectos anticancerígenos.

Además, a diferencia de la mayoría de los agentes anticancerígenos, los HDACi pueden inducir la muerte en células transformadas tanto en fase proliferativa como no proliferativa del ciclo celular (Fig.5) (West & Johnstone, 2014).



**Figura 5. Objetivos moleculares de las HDACs, las vías celulares descendentes y los resultados anticancerígenos de la inhibición de las HDACs.** Los sustratos incluyen histonas y proteínas no histonas. Las histonas son los sustratos principales para HDAC -1, -2 y -3, mientras que otras proteínas celulares son blanco de una o más de las HDACs de las clases I y II. Se muestran algunos sustratos conocidos para las HDACs, cambios moleculares de regulación a la baja que ocurren después de la inhibición de las HDACs, y vías biológicas asociadas que median las respuestas antitumorales. Las consecuencias biológicas mejor caracterizadas del tratamiento con los HDACi de las células tumorales se muestran en el nivel más bajo del diagrama. SMC3 (mantenimiento estructural de los cromosomas 3); GCMa (células gliales que carecen del homólogo 1); HAT (histona acetiltransferasa); HP1 (proteína heterocromatina 1). Modificado de West and Johnstone, *The Journal of Clinical Investigation*, 2014.

Los HDACi aumentan la expresión de casi todos los genes que se suprimen en el cáncer. El número y tipo de genes cuya transcripción está alterada por los HDACi está determinado, en parte, por la duración de la exposición de las células al inhibidor, el HDACi al que están expuestas las células y el tipo de célula transformada estudiada (Ungerstedt et al., 2005). Algunos cambios en la expresión génica parecen ser un efecto directo de los HDACi sobre el promotor del gen y el complejo del factor de transcripción, mientras que otros cambios

en la expresión génica son efectos posteriores. Si bien los patrones de alteración de la expresión génica son similares para diferentes inhibidores de las HDACs, existen diferencias inducidas por diferentes inhibidores (Peart et al., 2005).

Los HDACi han demostrado tener múltiples efectos en líneas celulares de cáncer. Estos efectos incluyen la alteración en la expresión de genes y diferenciación, inducción de la muerte celular, reducción en la proliferación y/o arresto del ciclo celular, dichos efectos se llevan a cabo por la disminución o aumento en la expresión de macromoléculas involucradas en dichos mecanismos, como son la disminución en la expresión de la proteína inhibidora de FLICE (FLIP) o la proteína inhibidora de la apoptosis, ambas participan en la evasión de apoptosis, la disminución del factor de crecimiento epitelial vascular (VEGF), el cual promueve la formación de vasos sanguíneos, contribuyendo al crecimiento tumoral (Stearns, Zhou, & Davidson, 2007) (Tabla 1).

**Tabla 1. Efectos biológicos múltiples de los inhibidores de las histona desacetilasas.** Modificado de Stearns, Zhou & Davidson, *Cancer Investigation*, 2007.

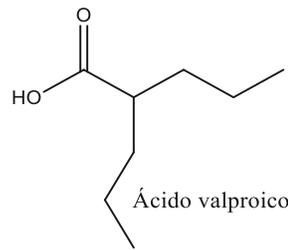
VÍA DE SEÑALIZACIÓN	EFECTO
Inducción de apoptosis	↑p53
	↑DR4
	↑Bax, Bak
	↓FLIP
	↓IAPs
	↓ Bcl-2, Bcl-xl
Inducción de arresto celular	↑p21
	↑p27
	↓Ciclina D
	↓CDK4
	↓Timidilato sintasa
Desestabilización de oncogenes	↓BCR/abl
	↓HER2/neu
	↓EGFR
	↓FLT-3
	↓pAKT
	↓E $\alpha$
Antiangiogénesis	↓VEGF
	↓Ang2
	↓Tie2
	↓HIF1- $\alpha$

En relación con los inhibidores de la HDAC8 específicamente, se ha encontrado que el compuesto SB-379278A, PCI-34051 y Cpd2 no alteran la acetilación de histonas en

contraste con los inhibidores selectivos de las HDACs de clase I. Esto concuerda con la observación de que la depleción de la HDAC8 no aumenta la acetilación de histonas en contraste con la depleción de la HDAC2. A pesar de no afectar la acetilación de histonas, los inhibidores selectivos de la HDAC8 pueden inducir fenotipos particulares en células tumorales tales como apoptosis, bloqueo del ciclo celular y diferenciación. Esto sugiere que los inhibidores selectivos de la HDAC8 no actúan a través de la inducción de la acetilación de histonas en ciertos sitios promotores, sino que pueden actuar cambiando el nivel de acetilación de las proteínas diana que no son histonas (Balasubramanian et al., 2008; Hu et al., 2003; Krennhrubec, Marshall, Hedglin, Verdin, & Ulrich, 2007; Oehme et al., 2009). Por lo tanto, la inhibición selectiva de la HDAC8 puede activar la apoptosis o los programas de diferenciación en células cancerosas independientemente de la acetilación de las histonas en general (tabla 1) (Witt, Deubzer, Milde, & Oehme, 2009).

### **6.3.1. Ácido valproico**

El valproato o ácido valproico (VPA) es un ácido graso de cadena de 8 carbonos ramificada, sintetizado por Burton en 1882 (Fig. 6). En la actualidad, el VPA es el fármaco más utilizado para tratar la epilepsia generalizada y también es eficaz en la epilepsia parcial. Además, el VPA es utilizado con mayor frecuencia para tratar los trastornos bipolares, la migraña y el dolor neuropático. Aunque originalmente se consideró de baja toxicidad, desafortunadamente se demostró que VPA tiene un potencial teratogénico considerable en humanos, lo que lleva a espina bífida en 1-2% de los fetos humanos expuestos al compuesto durante las etapas tempranas del embarazo. Durante los últimos años, se ha hecho evidente que las malformaciones producidas por VPA están relacionadas con distintas propiedades antitumorales de este compuesto. Esta propiedad antitumoral ha abierto la posibilidad de utilizar el VPA en el tratamiento del cáncer (Blaheta, Nau, Michaelis, & Cinatl, 2002).



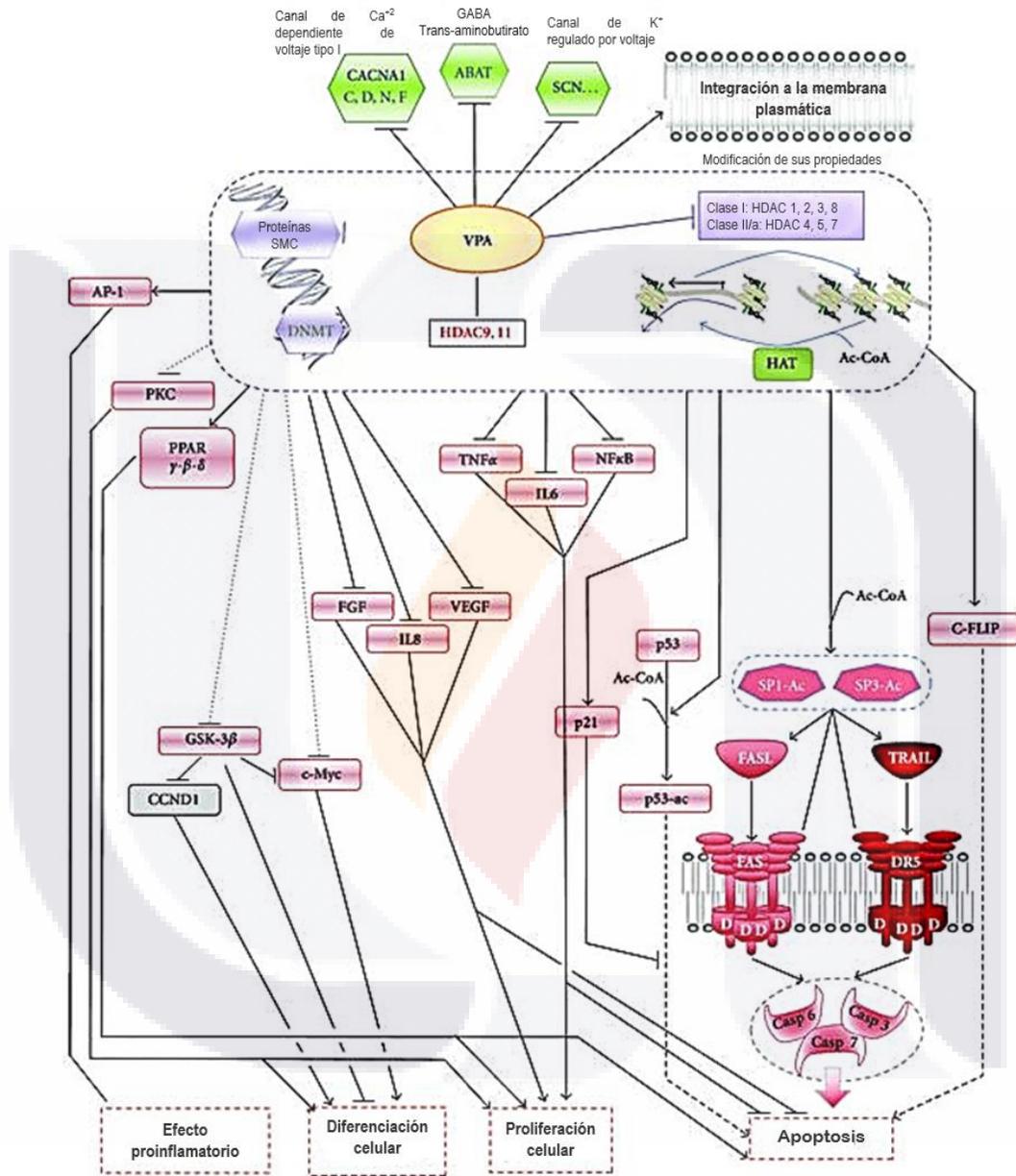
**Figura 6. Estructura del ácido valproico (VPA).** Modificado de Hyun- Jung & Suk-Chul, *American Journal Of Translational Research*, 2011.

El VPA modula la expresión de las moléculas p21WAF1 / CDKN1A (Cheng et al., 2007), una ciclina dependiente de quinasa (CDK) generalmente asociada con el paro del ciclo celular en la fase G1/S. La apoptosis inducida por VPA, a través de la ruta extrínseca que implica la participación de la cascada dependiente de caspasa-8, sensibiliza las células a desarrollar apoptosis mediada por TRAIL / Apo2L aumentando la expresión de DR4 y DR5 en 3 y 14 veces, respectivamente. En ausencia de TRAIL/Apo2L, el VPA puede reducir la expresión de factores antiapoptóticos que actúan sobre las vías apoptóticas tanto intrínsecas como extrínsecas, incluidas las c-FLIP, proteínas asociadas con DISC y Bcl-2/Bcl-xL. Cuando se aplica con TRAIL/Apo2L, el VPA aumenta la muerte celular y la actividad de caspasa-3. Estos resultados se reprodujeron en leucemias (mieloides aguda y linfática crónica), cánceres torácicos y carcinoma hepatocelular (Fig.7) (Chateauvieux, Morceau, Dicato, & Diederich, 2010; Iacomino, Medici, & Russo, 2008; Lagneaux et al., 2007; Schuchmann et al., 2006; Ziauddin et al., 2006).

VPA induce la caspasa-11 y FAS-L a nivel transcripcional, y caspasa-3 a nivel proteómico durante la exposición (Phillips, Bullock, & Plant, 2003). Los largos periodos de tratamiento dan como resultado la potenciación de la apoptosis dependiente de Fas asociada con una sobreexpresión de Fas y Fas ligando y un papel central en la inhibición de Bcl-2 (Fig 7) (Angelucci et al., 2006).

En el cáncer de mama, el VPA inhibe el crecimiento de líneas celulares independientes de los receptores de estrógenos (Mongan & Gudas, 2005; Olsen, Meussen-Elholm, Roste, & Tauboll, 2004), potencia la acción del tamoxifeno, el raloxifeno, el fulvestran y el letrozol, e induce la regresión del tumor en xenoinjertos. Sorprendentemente, el tratamiento combinado con VPA y tamoxifeno inhibe las células de adenocarcinoma de Ishikawa, que

normalmente proliferan en respuesta al tamoxifeno (Hodges-Gallagher, Valentine, Bader, & Kushner, 2007).



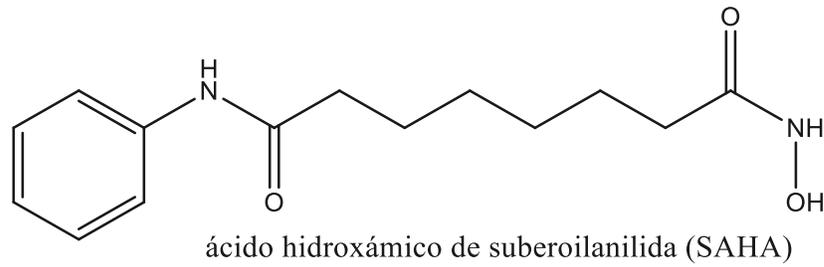
**Figura 7. Representación esquemática de los blancos directos e indirectos del VPA.** Los principales objetivos directos conocidos para VPA son canales iónicos y ABAT (en verde). Acción epigenética de VPA (en violeta) como actividad de HDACi: el VPA se dirige al sistema transcripcional y principalmente inhibe directamente las HDACs clase I (subcategorías 1, 2 y 3) y menos fuertemente a las de clase II/a (subcategorías 4, 5 y 7), pero induce a la actividad de las HDACs 9 y 11, e indirectamente inhibe la función de SMC y DNMT. Probablemente debido a sus propiedades epigenéticas, o interacciones aún no establecidas, el VPA altera, directa o indirectamente, la expresión de muchas moléculas involucradas en las vías moleculares, como la apoptosis, la inflamación, la diferenciación y la proliferación (en rojo). Modificado de Chateauvieux et al., *J Biomed Biotechnol*, 2010.

Además, se ha observado que otras moléculas blanco como la activación del receptor activado por el proliferador de peroxisoma  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) y la modulación de la vía de señalización de Wnt, pueden estar implicados tanto en la actividad antitumoral del VPA como en su teratogenicidad. Tanto los efectos antitumorales como los teratogénicos del VPA así como su interacción con algunas de las moléculas blanco antes mencionados también se han asociado con su actividad como inhibidores de las HDACs (Gottlicher et al., 2001; Phiel et al., 2001) específicamente, inhibe las HDACs 1, 2, 3 y 8 en el rango milimolar, pero es ineficaz contra las HDACs de clase II. Actualmente, el ácido valproico está siendo ensayado en varios tipos de cáncer en los que se ha observado una elevada hepatotoxicidad y baja potencia como agente antiproliferativo (tabla 2) (Khan et al., 2008; Miller, Witter, & Belvedere, 2003).

Ma y colaboradores (2017), demostraron el efecto del VPA en células MCF-7, determinando que le VPA inhibe el crecimiento, induce apoptosis (caspasa-3 y 9), arresto del ciclo celular (G1) posiblemente por el aumento de p21 y disminución de la ciclina D1 de manera dependiente de la concentración y tiempo de exposición (Ma, Wang, Gu, & Zhao, 2017).

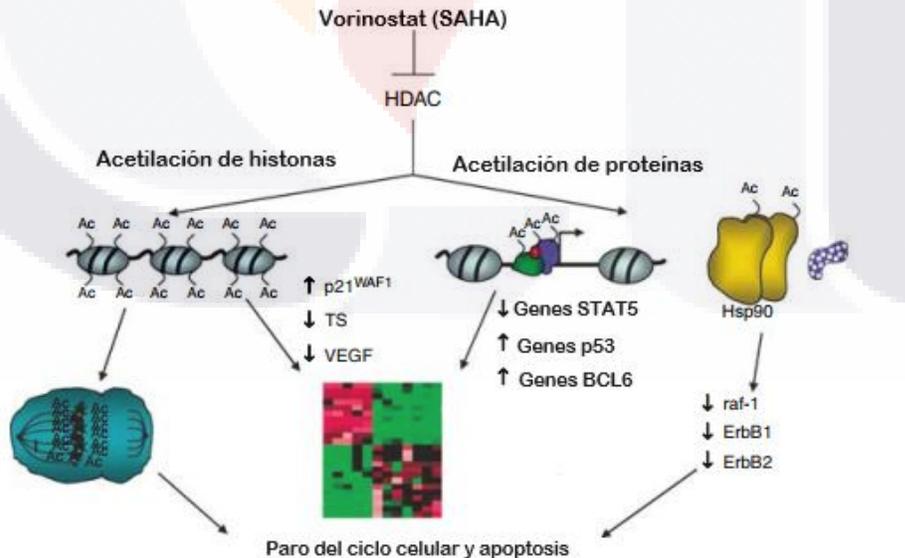
### **6.3.2. Ácido hidroxámico de suberoilánilida (SAHA)**

El ácido hidroxámico de suberoilánilida (SAHA), fue el primer inhibidor de las HDACs aprobado por la FDA como terapia anticancerígena en linfoma cutáneo de células T avanzado, pertenece a una generación de compuestos llamados compuestos híbridos polares (CHP), su nombre proviene de su estructura, la cual tiene en común dos grupos polares separados por una cadena apolar metilada de 5-6 carbonos, los cuales tiene como estructura prototipo a la hexametilbisacetamida (HMBA) (Richon et al., 1998). SAHA fue sintetizado con el fin de probar si un grupo hidrofóbico fenilo terminal podría incrementar su actividad con una menor toxicidad que HMBA. La estructura de SAHA está relacionada con la del tricostatin A (Fig.8).



**Figura 8. Estructura del ácido hidroxámico de suberoilánilida.** Modificado de Richon et al., *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 1998.

El SAHA es capaz de inducir la diferenciación y/o la muerte celular por apoptosis en células transformadas *in vitro* e *in vivo* (De Souza & Chatterji, 2015). Se cree que el mecanismo de acción del SAHA es resultado de la inhibición de la actividad de las HDACs (Tabla 2), resultando en la acumulación de proteínas acetiladas, incluyendo histonas. Esta inhibición tiene múltiples efectos celulares, entre los que se incluyen alteración de la transcripción de infinidad de genes, vía acetilación de histonas y factores de transcripción, así como efectos no transcripcionales como, paro del ciclo celular por inhibición de la mitosis (Marks, 2007). Se ha observado que SAHA afecta la inducción de la expresión de varios genes (p21, TBP-2, metalotioneina II, histona H2B), mientras que otros son reprimidos (Ciclina D, ErbB2, timidilato sintasa, importina β) (Richon, 2006) (Fig. 9).



**Figura 9. Mecanismo de acción propuesto de la inducción del paro del ciclo celular y apoptosis por SAHA.** Modificado de Richon, *British Journal of Cancer*, 2006.

Tabla 2. Representación de la potencia inhibidora relativa de varios compuestos pan y selectivos de clase I y clase II. Modificada de Witt et al., *Cancer Letters*, 2009.

INHIBIDOR	Clase I				Clase IIA			Clase IIB		Clase IV	
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC8	HDAC4	HDAC5	HDAC7	HDAC9	HDAC6	HDAC10	HDAC11
Pan-inhibidores	TSA					nd				nd	nd
	Yorinostat (SAHA)					nd				nd	nd
	NVP-LAQ824					nd				nd	nd
	Panbinostat					nd				nd	nd
	Belinostat					nd				nd	nd
	PCI-24781					nd	nd	nd	nd		
Inhibidores clase I	MS-275					nd				nd	nd
	MGCD0103									nd	nd
	Depsipeptido			nd	nd		nd	nd	nd		nd
	Apididina						nd				nd
	Ácido valproico					nd	nd				nd
	Trapoxin		nd	nd	nd		nd	nd	nd		nd
	SB-429201		nd			nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Bispiridinudieno				nd		nd	nd	nd	nd	nd
	SHI-1:2								nd		nd
	R306465		nd	nd		nd	nd	nd	nd		nd
	SB-379278A		nd			nd	nd	nd	nd	nd	nd
	PCI-34051					nd	nd	nd	nd		nd
	Cpd2		nd	nd		nd	nd	nd	nd		nd
Inhibidores clase II	Derivados de APHA		nd	nd	nd		nd	nd	nd	nd	nd
	Tubacina		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		nd
	Mercaptoacetamida					nd	nd	nd	nd		nd
	NCT-10a/f14a		nd	nd	nd		nd	nd	nd		nd

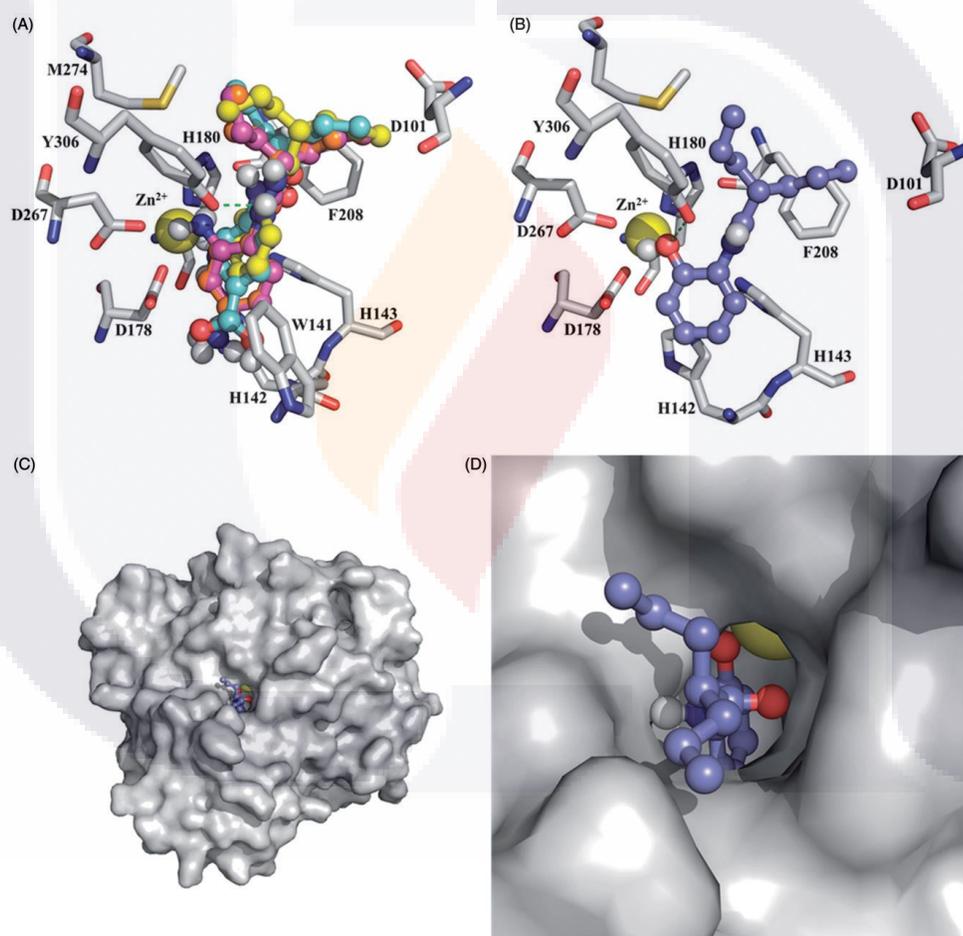
  

	Inhibición fuerte (CE50 < 5 veces x CE50 en relación con la isoforma HDAC más sensible)
	Inhibición débil (CE50 > 5 veces x CE50 en relación con la isoforma HDAC más sensible)
	No inhibición (CE50 > 100 veces x CE50 en relación con la isoforma HDAC más sensible)
	nd
	No hay datos publicados

Basados en el conocimiento químico de los ligandos y/o sus blancos terapéuticos, es posible diseñar moléculas al combinar diferentes farmacóforos capaces de alcanzar diferentes sitios blanco en una misma proteína o diferentes proteínas (compuestos bi-target o multi-target), los cuales podrían mejorar el efecto antiproliferativo y por consecuencia la eficiencia del tratamiento anticancerígeno (Achenbach, 2013).

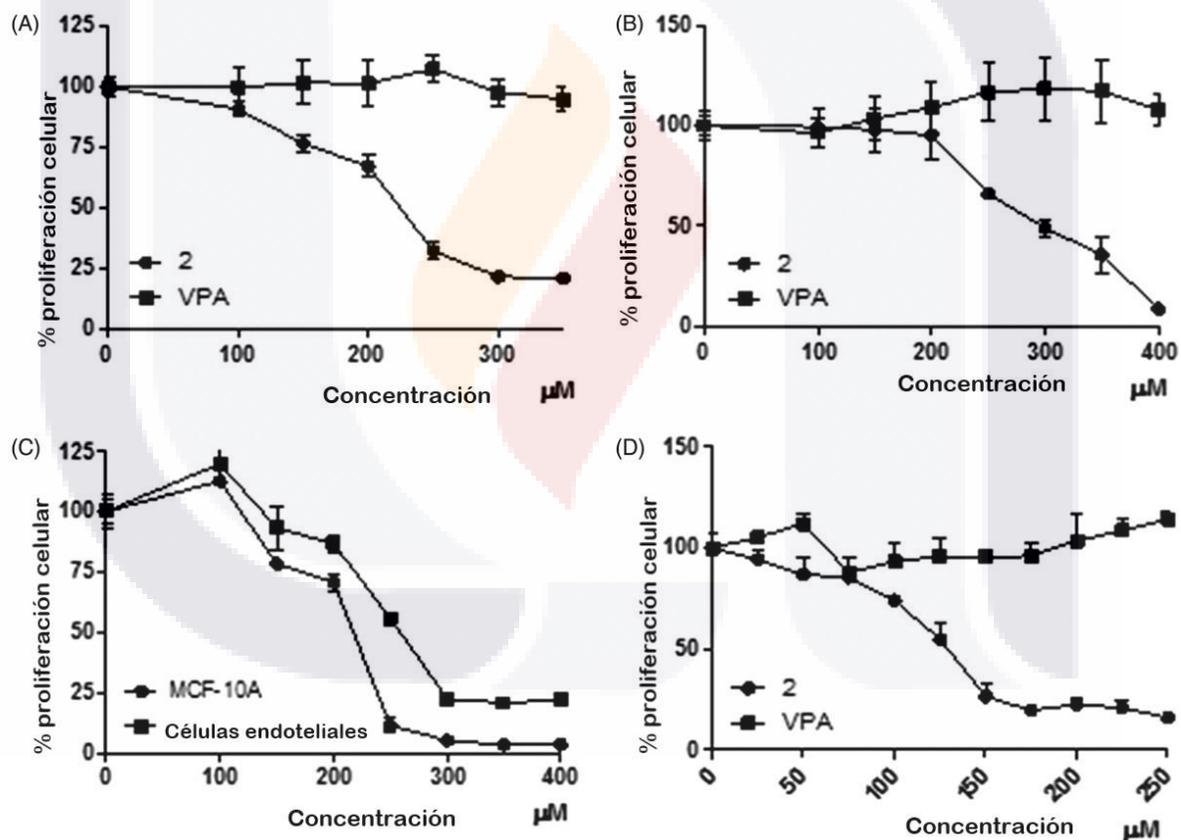
Considerando que los HDACi tienen probada actividad antitumoral al inducir cambios epigenéticos en la expresión de genes, así como la hepatotoxicidad del ácido valproico, Prestegui-Martel y colaboradores (2016), realizaron el diseño *in silico* de una molécula aril derivada del ácido valproico (SAHA-VPA), la cual conserva el núcleo arilamida del SAHA con diversos sustituyentes en el grupo carboxilo, esperando con esto aumentar el efecto inhibitorio del VPA con una menor toxicidad en células no tumorales, conservando así las propiedades de unión del VPA con una región de la proteína de las HDACs, que Vannini y colaboradores describieron en 2007, como el sitio de lanzadera de acetilo (ASL) el cual es removido durante la catálisis, dicho sitio se encuentra cercana al sitio estérico, y el cual se encontró que aumenta la afinidad del VPA a la HDAC8 (citado por Prestegui-Martel et al.,

2016 y Bermudez-Lugo et al 2012). Además se observó que la diferencia en la afinidad depende del tipo y cantidad de interacciones débiles causadas por el grupo químico sustituido, que interactúa electrostáticamente con el átomo de zinc en la HDAC8, proporcionando a esta enzima una carga negativa parcial. La contribución de los derivados de arilo de VPA muestra una postura de unión diferente al observado para el compuesto líder. Esto significa que la adición de arilo induce un reconocimiento del sitio de unión del SAHA, lo que explica las mejores afinidades para los derivados en comparación con el observado para el VPA solo (Bermudez-Lugo et al., 2012; Prestegui-Martel et al., 2016) (Fig. 10).



**Figura 10. Interacciones de diversos compuestos aril derivados de VPA, incluido el N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida.** (A) Los ligandos son capaces de adoptar la misma posición de unión. (B) N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida se coordina con el átomo de  $Zn^{+3}$ . (C) y (D) se muestra la cavidad en la HDAC8 alcanzado por los ligandos. Prestegui-Martel et al., *Journal of enzyme inhibition and medical chemistry*, 2016.

De los estudios *in silico* se obtuvo el compuesto más prometedor, llamado N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (SAHA-VPA), cuyo efecto inhibitorio fue probado *in vitro* en diversas líneas celulares de cáncer de mama, mostrando que el compuesto SAHA-VPA es capaz de inhibir el crecimiento celular de células sensibles a estrógeno, actuando de forma dependiente de la concentración, en especial las líneas celulares SKBr3 con una  $IC_{50}=142.0 \mu M$ , en comparación con las células MCF7 con una  $IC_{50}=192.4 \mu M$ , la línea MDA-MB-231,  $IC_{50}=283 \mu M$ , y el control (línea MCF-10 A) (benigna),  $IC_{50}=213.7 \mu M$ , estos resultados sugieren que el compuesto SAHA-VPA tiene un mayor efecto en comparación con el VPA solo, debido a su capacidad de alcanzar el sitio de SAHA en la HDAC8, o por la actividad del metabolito dihidroxilado (si el SAHA-VPA fuera metabolizado por el CYP450) sobre GPER (Pretegui-Martel et al., 2016) (Fig. 11).



**Figura 11. Efecto del VPA y la N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (2).** (A) Células MCF7. (B) Células MDA-MB-231. (C) efecto de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida en MCF-10 A y células endoteliales. (D) Células SKBr3. Todos los datos se expresan en porcentaje de crecimiento celular de las células tratadas vs las no tratadas, obtenido por ensayo de MTT. Los resultados expresan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes (n=4). Modificado de Pretegui-Martel et al., *Journal of enzyme inhibition and medical chemistry*, 2016.

## 7. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad de gran prevalencia en mujeres mayores de 20 años, con graves repercusiones médicas y económicas y abarca todos los niveles sociales. A nivel latinoamericano, se estima que el 29% de casos de cáncer corresponden a cáncer de mama. El subtipo de CMTN se caracteriza por no tener blancos terapéuticos específicos (como aquellos que dependen de hormonas), lo que genera una problemática para los oncólogos clínicos, ya que inicialmente el CMTN responde favorablemente a los tratamientos, sin embargo, en un corto tiempo, se genera resistencia a los tratamientos y con ello la reaparición del cáncer con desarrollo de metástasis. Más recientemente se ha incorporado el uso de compuestos sintéticos ácido valproico y SAHA, inhibidores de las HDACs, enzimas que se sobreexpresan en las células tumorales y que se relacionan directamente con la capacidad de invasión tumoral, en el tratamiento contra cáncer. Sin embargo, los HDACi, específicamente el ácido valproico utilizado de manera individual, aunque ha mostrado tener un elevado efecto antitumoral también muestra una elevada hepatotoxicidad. El estudio de los cambios epigenéticos en el cáncer, específicamente la sobreexpresión de la HDAC8, ha permitido dilucidar los mecanismos de señalización involucrados en la proliferación, diseminación y resistencia a los tratamientos del CMTN, lo que ha permitido generar compuestos dirigidos específicamente a dicha enzima. Esto abre la posibilidad de que el compuesto SAHA-VPA pueda ser utilizado como una droga anticancerígena con una mayor potencia antitumoral y menor toxicidad para las células no tumorales. Sin embargo, el efecto anticancerígeno del SAHA-VPA, solo ha sido estudiado en líneas celulares de cánceres mamarios en cultivo (Prestegui-Martel et al., 2016). A la fecha, el efecto anticancerígeno del SAHA-VPA así como su hepatotoxicidad y nefrotoxicidad, no han sido estudiados *in vivo*, por lo que es necesario realizar dicho estudio.

### 7.1. Interacciones multidisciplinarias

La colaboración de grupos interdisciplinarios en proyectos de investigación es relevante porque favorece el desarrollo integral del conocimiento en un área. Con esta idea en mente, se pretende dar seguimiento a los resultados obtenidos por el grupo de investigadores encabezados por el Dr. José Correa Basurto del Laboratorio de Modelaje Molecular de la Escuela Superior de Medicina del IPN.CDMX, quienes realizaron la síntesis, caracterización

y evaluación *in silico* e *in vitro* del derivado aril de ácido valproico, el N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (SAHA-VPA), caracterizado por poseer actividad inhibitoria sobre la proliferación de células cancerosas de diversas líneas celulares de cáncer de mama. Por lo anterior, resulta relevante para el desarrollo de nuevos tratamientos anticancerígenos evaluar en modelos animales si este compuesto es capaz de inhibir el desarrollo del cáncer mamario, mismo que pretendemos completar en nuestro laboratorio y que es parte fundamental de los objetivos del presente proyecto. De esta manera, la preparación del estudiante abarca el aprendizaje de procedimientos de síntesis química y su evaluación farmacológica y toxicológica en modelos biológicos.

Para cumplir con los objetivos, realicé una estancia de 3 meses (agosto-octubre del 2017) en el laboratorio del Dr. José Correa Basurto, para la síntesis, purificación y caracterización del compuesto SAHA-VPA, y su posterior evaluación biológica y toxicológica en el Laboratorio de Neuroinmunoendocrinología del Centro de Ciencias Básicas de la UAA.

## 8. HIPOTESIS

El compuesto SAHA-VPA, al ser anticancerígeno específico con actividad inhibitoria de la HDAC8, deberá disminuir el crecimiento y proliferación de los tumores mamarios alotrasplantados a la cápsula renal de ratones receptores, así como un menor efecto hepatotóxico y nefrotóxico.



## 9. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar, purificar y caracterizar el compuesto SAHA-VPA (inhibidor de la HDAC8) y evaluar sus efectos antitumorales y toxicológicos en un modelo de alotrasplante de tumor mamario a la cápsula renal de animales receptores.

## 10. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- I. Sintetizar, purificar y caracterizar el compuesto antineoplásico SAHA-VPA.
- II. Estandarización del modelo de cáncer mamario inducido por:
  - a) 7,12-Dimetilbenz [ $\alpha$ ] antraceno (DMBA)
  - b) Implante subcutáneo de capsulas de 17- $\beta$ -estradiol.
  - c) N-metil nitrosourea (MNU).
  - d) Inoculación de la línea celular cancerosa 4T1 en cápsula renal y mama.
  - e) Alotrasplante de fragmentos de tumor 4T1 a la cápsula renal de ratones receptores.
- III. Estudiar el efecto antitumoral del compuesto SAHA-VPA en grupos de animales con alotrasplante de cáncer mamario utilizando una curva dosis respuesta y evaluando la evolución de los tumores en base a su tamaño e histopatología.
- IV. Evaluar los efectos tóxicos de SAHA-VPA utilizando pruebas de funcionamiento hepático y renal, así como estudios histopatológicos de hígado y riñón.

## 11. METODOLOGÍA

### 11.1. Síntesis del N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (SAHA-VPA)

Por goteo, se añadió cloruro de oxalilo (3,71 ml, 43.11 mmol) gota a gota a ácido valproico (6.2 g, 43.11 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 8 h a la misma temperatura; luego, se dejó calentar a temperatura ambiente bajo atmosfera de nitrógeno para obtener el cloruro de 2-propilpentanoilo (A) (Esquema 2). El flujo de nitrógeno se continuó durante 24 h, seguido de enfriamiento a 5°C. Se añadieron hexano (3 mL) y orto hidroxianilina (3,74 g) y la mezcla se agitó durante 12 h antes de añadir hexano (10 mL) y bicarbonato de sodio (3 g); posteriormente, la mezcla se agitó durante 3 h. El compuesto se obtuvo por extracción con diclorometano destilado y el sólido formado se filtró y se lavó con hexano. La síntesis del compuesto se controló mediante cromatografía en capa fina usando una mezcla de hexano / AcOEt (9:1) como eluyente (Fig. 12).

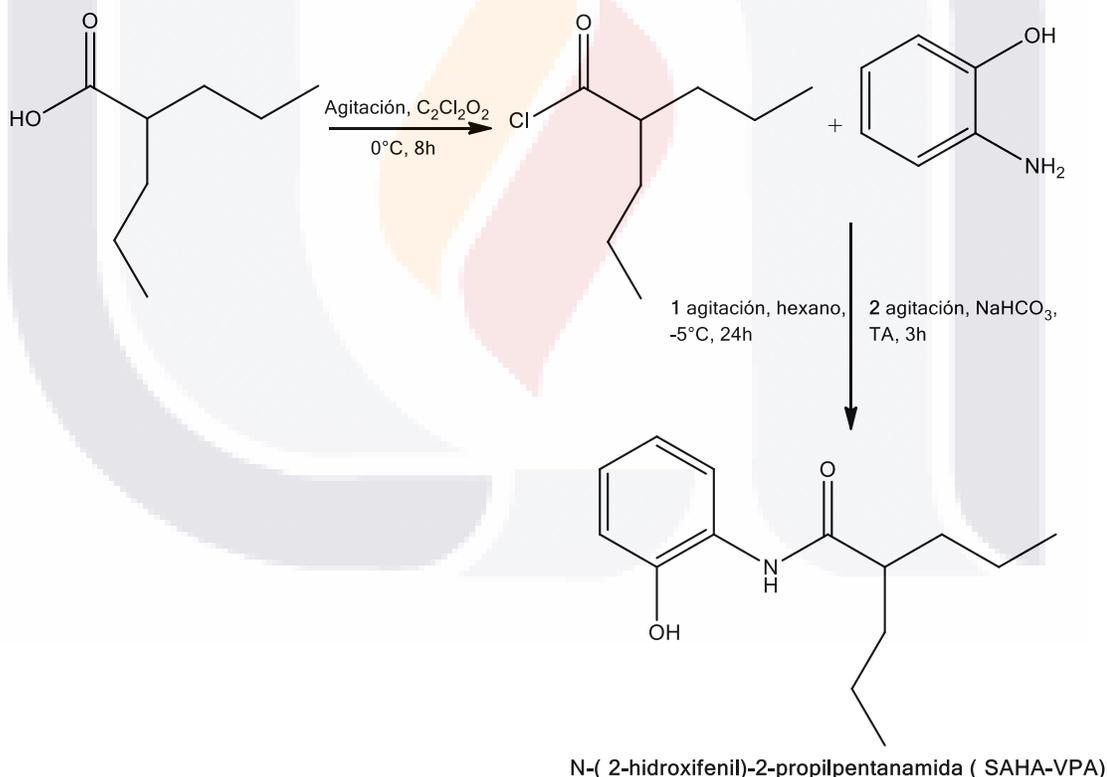


Figura 12. Ruta sintética de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (SAHA-VPA).

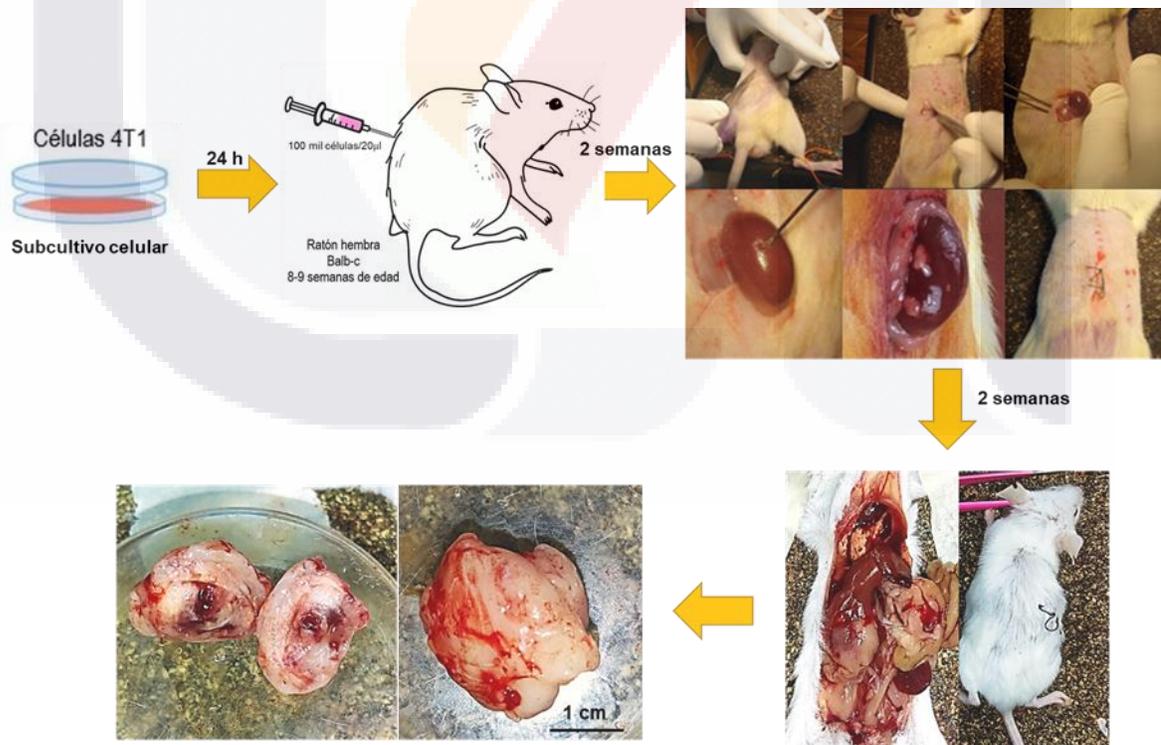
## 11.2. Caracterización química

Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (México) y se usaron sin purificación adicional. Las reacciones se controlaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) sobre láminas de aluminio con gel de sílice 60 GF<sub>254</sub> y un indicador fluorescente (visualizado con luz UV de 254 nm). La cromatografía Flash se realizó usando gel de sílice 60 (malla 230-400). Los puntos de fusión se determinaron en tubos capilares abiertos con el fusiometro análogo Stuart SMP11. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se registraron en un espectrómetro Bruker Ascend 750 usando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*<sub>6</sub>) como disolvente y TMS como patrón interno. Para asignaciones completas de datos, se usaron espectros 2D HSQC y HMBC. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se informan en ppm campo abajo del estándar interno (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si y las constantes de acoplamiento en hercios (Hz). Los espectros de IR se obtuvieron en un espectrómetro FT IR Perkin-Elmer (Spectrum GX). Solo se muestran bandas de absorción significativas, con valores de absorción expresados como números de onda (cm<sup>-1</sup>). La espectrometría de masas de alta resolución de ionización por electrospray se realizó con un instrumento Bruker micrOTOF-Q II y Agilent 6545 Q-TOF LC / MS.

## 11.3. Estandarización del modelo de alotrasplante tumoral a la cápsula renal

Se realizó el subcultivo de la línea celular 4T1, de acuerdo a las especificaciones del American Type Cell Culture (ATCC ®), en medio RPMI 1640 enriquecido al 10% con suero fetal bovino (GIBCO®), una vez alcanzada la confluencia del 70-80%, se cosecharon las células con EDTA (Sigma-Aldrich ®) en PBS 1x, se realizó el conteo de las células viables y se re-suspendió el pellet en 1 mL de medio RPMI. Con una jeringa de insulina se inocularon 100 mil células/20 $\mu$ L de medio RPMI en el tejido mamario de la penúltima mama derecha de ratones Balb-C hembras de 8-9 semanas de edad. A las 2 semanas post inoculación, se observó el desarrollo del tumor mamario. Previa anestesia con pentobarbital sódico, estos animales fueron utilizados como donadores de tejido tumoral de donde se tomaron 2 fragmentos del tumor de 1-2 mm<sup>3</sup> y se alotrasplantaron a la cápsula renal derecha de ratones hembra receptores de la misma cepa y de 8-9 semanas de edad. A los 15 días del alotrasplante se repitió el procedimiento de alotrasplante de fragmentos tumorales pero ahora provenientes de la cápsula renal de los donadores. Los alotrasplantes se repitieron en nuevos individuos receptores para un total de 4 re-trasplantes. La confirmación del tipo celular de los tumores de cada re-trasplante tumoral se realizó por histopatología.

El procedimiento quirúrgico para realizar los alotrasplantes fue el siguiente. Una vez anestesiados los animales con vapores de Sevorane, se rasuró la piel del dorso y se colocó en decúbito ventral sobre la mesa de cirugía. Se fijaron las patas a la mesa con cinta adhesiva para facilitar su manipulación. Manteniendo la anestesia quirúrgica, se limpió la piel con un antiséptico. Tomando como referencia las últimas costillas flotantes se hizo una incisión de aproximadamente 2 cm en la línea media de la piel, y con ayuda de unas tijeras se perforó la pared dorsal del abdomen, por un lado de los tendones de los músculos de la masa común. Una vez localizado el riñón, se exteriorizó. Con ayuda del microscopio estereoscópico, con una aguja fina, se realizó una pequeña incisión en la cápsula renal, evitando dañar el parénquima. Con la ayuda de disectores metálicos se separó la cápsula del parénquima renal para formar una oquedad en dirección al hilio del riñón (en donde se alojaron los trasplantes). Se tomaron 2 fragmentos de tejido tumoral del animal donador de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> y se introducen subcapsularmente hasta el fondo de la oquedad. Se regresó el riñón a su lugar cuidando que el fragmento trasplantado no se saliera de la cápsula. Se cerró la piel con sujete continuo. Los experimentos se realizaron en animales alotrasplantados de la quinta repetición (Fig. 13).



**Figura 13. Procedimiento para la estandarización del modelo de alotrasplante.**

#### 11.4. Grupos de animales

Ratones hembra de la cepa Balb-c de 8-12 semanas de edad se dividieron en los siguientes grupos de 7 animales cada uno: 1) Control intacto, 2) Alotrasplante, 3) 10 mg/kg, 4) 30 mg/kg, 5) 50 mg/kg y 6) Control 50 mg/kg. Los animales fueron colocados en sus respectivas jaulas en el bioterio con ciclos de luz-oscuridad de 12 X 12 horas (encendido a las 7 hs), con alimento y agua *ad libitum*. El tratamiento de los animales se hizo siguiendo el código de ética de tratamiento humanitario de los animales de laboratorio del Comité de Ética de la UAA que es consistente con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

#### 11.5. Administración del compuesto SAHA-VPA

A los ocho días post alotrasplante, los animales se dividieron en grupos de 7 c/u y se inició el tratamiento con el compuesto SAHA-VPA a dosis de 10, 30 y 50 mg de peso respectivamente. Cada dosis de SAHA-VPA se disolvió en el vehículo (alcohol etílico al 100%) y se inyectaron/subcutánea/15 días. Al día 16 los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico, se colocaron en decúbito dorsal sobre la mesa de operaciones, se fijaron por las patas. Se abrió la cavidad toraco-abdominal, se localizó el corazón y con una jeringa de insulina, se extrajo la sangre del ventrículo derecho (1 a 2 ml de sangre). Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas, los sueros separados y alicuotados y congelados a -20° C hasta la determinación de las pruebas de funcionamiento hepático y renal (ALT, AST, albúmina, proteínas totales, glucosa y creatinina) y procesados en el equipo de química húmeda SpinLab, de acuerdo a la casa comercial. Se tomaron fragmentos de hígado, riñón sano y tejido tumoral y fijaron en formol neutro, se procesaron para estudio histopatológico.

Los animales fueron pesados semanalmente: Antes del alotrasplante y cada 8 días hasta la terminación del experimento.

#### 11.6. Histología

Una vez fijadas las muestras tisulares de hígado, riñón y tumor, los tejidos fueron incluidos en parafina, se cortaron, se montaron en lamillas histológicas, se tiñeron con las técnicas de hematoxilina y eosina (H-E) y rojo Sirio y se procedió a estudiar la histopatología utilizando el microscopio de luz (modelo Optiphot-2 de la marca Nikon), tomándose fotografías representativas de cada condición experimental. Además, las laminillas teñidas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con rojo Sirio fueron estudiadas bajo luz polarizada para cuantificar la cantidad de colágena de los tumores por unidad de área. Para esto, se fotografiaron 7 campos por laminilla excluyendo las zonas con tejido renal remanente. Posteriormente, las imágenes fueron analizadas con el programa Fiji versión 1.0.

### 11.7. Análisis estadístico

Para cada uno de los grupos de estudio se determinó la distribución de los datos haciendo uso de la prueba D'Agostinos y así determinar si los datos tienen distribución normal o no. Una vez determinada la normalidad el análisis de los datos se llevó a cabo haciendo uso de un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de 2 vías) en el que se evaluaron el peso corporal y los días de tratamiento entre los diferentes grupos experimentales. Para las comparaciones entre los diferentes grupos experimentales y una sola variable se realizaron las pruebas de Kruskal-Wallis (para datos no paramétricos) o ANOVA de una vía (para datos paramétricos) y sus correspondientes pruebas pos-hoc (Dunn o Tukey relativamente). Las pruebas estadísticas se llevaron a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 6.0. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre los grupos. La P menor a 0.05 fue considerada como significativa en todos los casos.

## 12. RESULTADOS

### 12.1. Caracterización de la N-(2-hidroximetil)-2-propilpentanamida (SAHA-VPA)

Después de la re-cristalización del compuesto, se obtuvieron 1.35 g (17% de rendimiento) de la N-(2-hidroximetil)-2-propilpentanamida como un sólido blanco, con un  $R_f=0.56$  (Hex/AcOEt 7:3),  $PF=54\pm 2^\circ C$ . FT IR (ATR)  $U_{max}$  3309, 2958, 2932, 2872, 1606, 1549, 1447, 775, 687  $cm^{-1}$  (Fig. 14).  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.73 (s, 1H, OH), 9.36 (s, 1H, NH), 7.60 (dd,  $J = 8.0, 1.6$  Hz, 1H, H-6'), 6.97 (ddd,  $J = 8.0, 7.3, 1.7$  Hz, 1H, H-5'), 6.86 (dd,  $J = 8.1, 1.4$  Hz, 1H, H-3'), 6.77 (ddd,  $J = 7.9, 7.3, 1.5$  Hz, 1H, H-4'), 2.58 (m, 1H, H-2), 1.54 (m, 1H, H-3), 0.7 (t,  $J=3$  Hz, 6H, 2H-5) (Fig.15).  $^{13}C$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  175.5 (CO), 148.7 (C-2'), 126.8 (C-1'), 125.4 (C-4'), 123.1 (C-6'), 119.5 (C-5'), 116.7 (C-3'), 46.0 (C-2), 35.5 (2C-3), 20.7 (2C-4), 14.5 (2C-5) (Fig. 16). ESI-MS calculado para  $C_{14}H_{21}NO_2$ :  $[M+H]^+236.1482$  Obtenido: 236.168 (Fig. 17).

12.1.1. Espectroscopia de infrarrojo (IR)

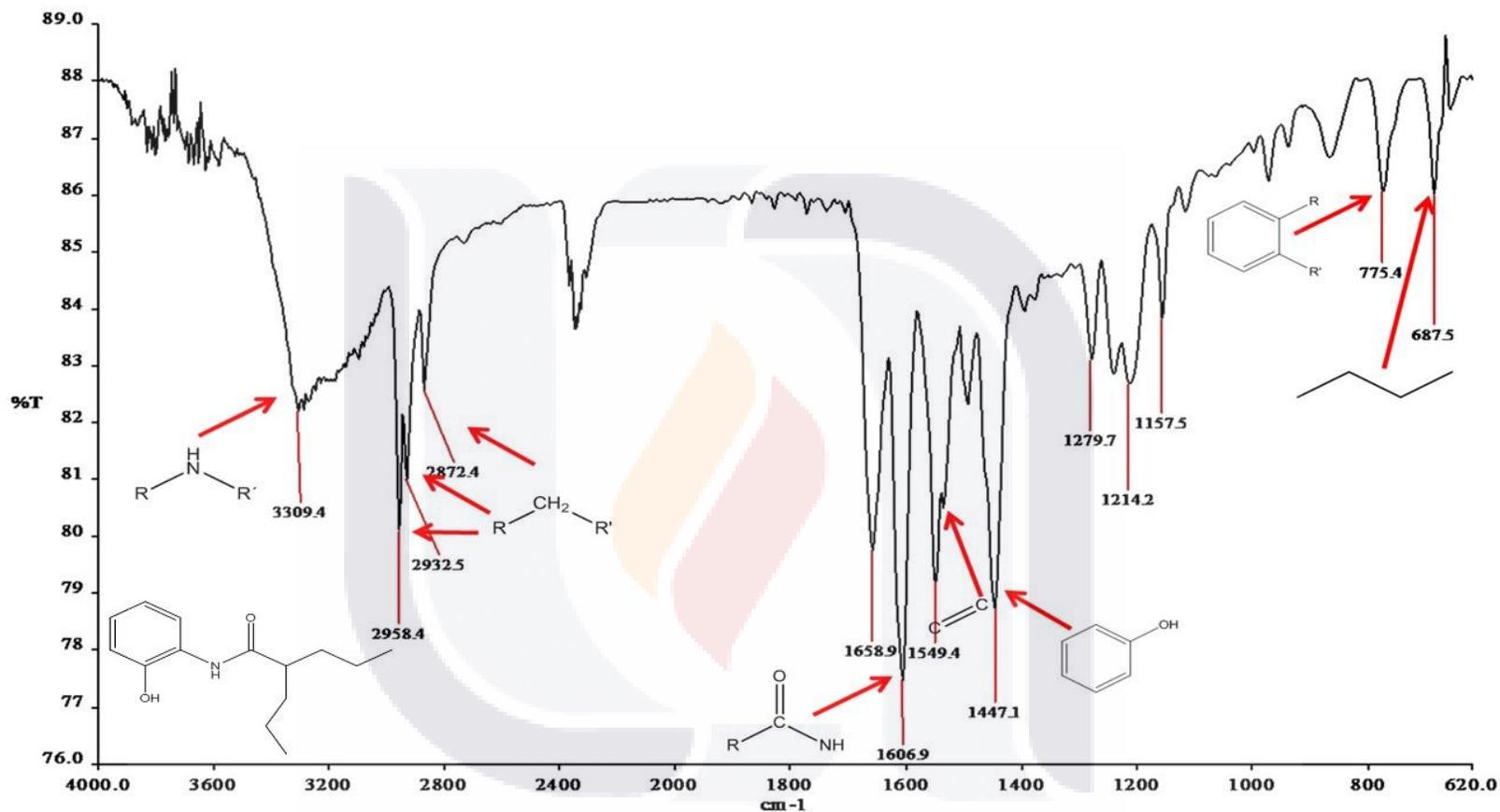


Figura 14. Análisis de espectroscopia de infrarrojo (IR) de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida.

12.1.2. Resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ ) y carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ )

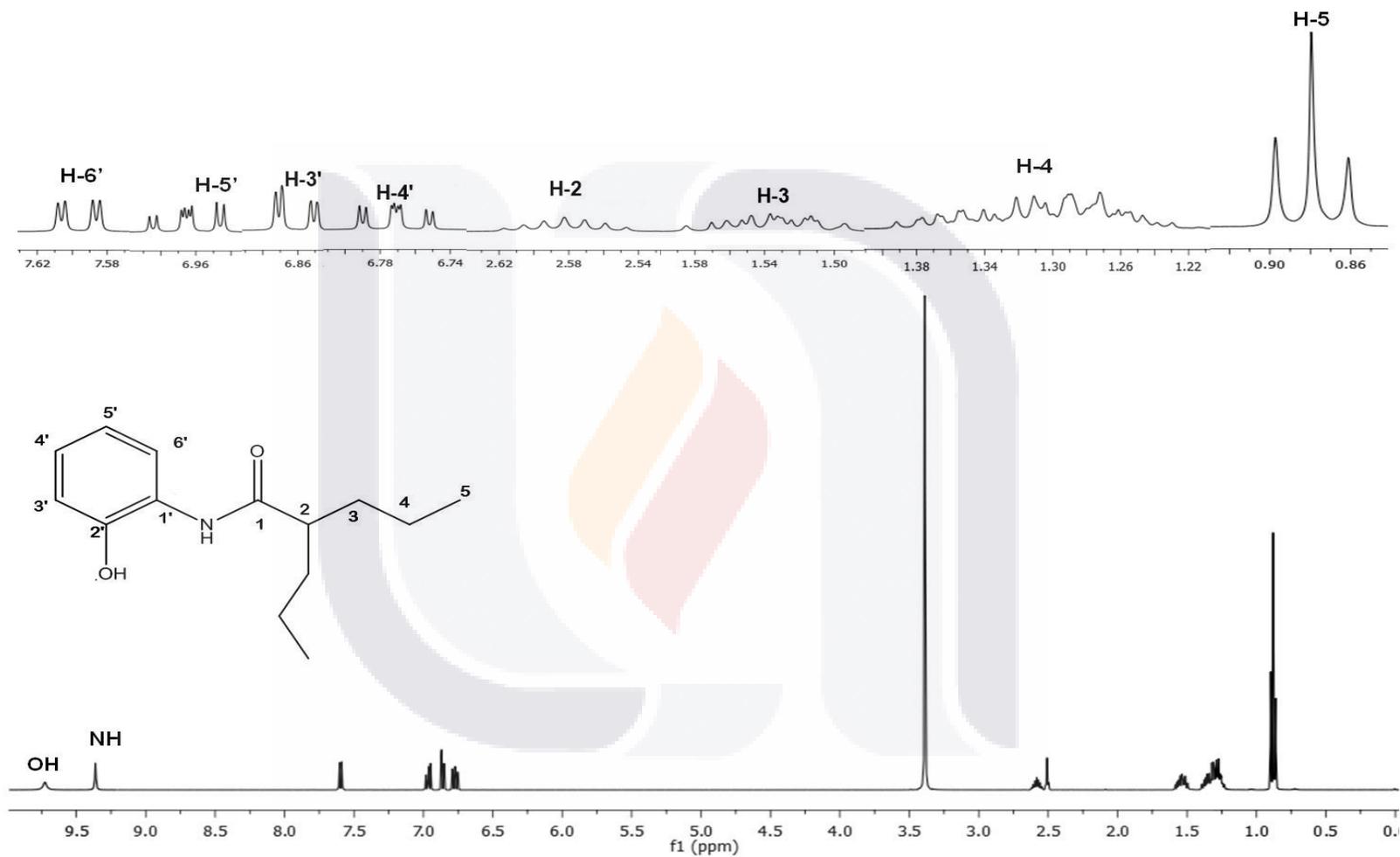


Figura 15. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida.

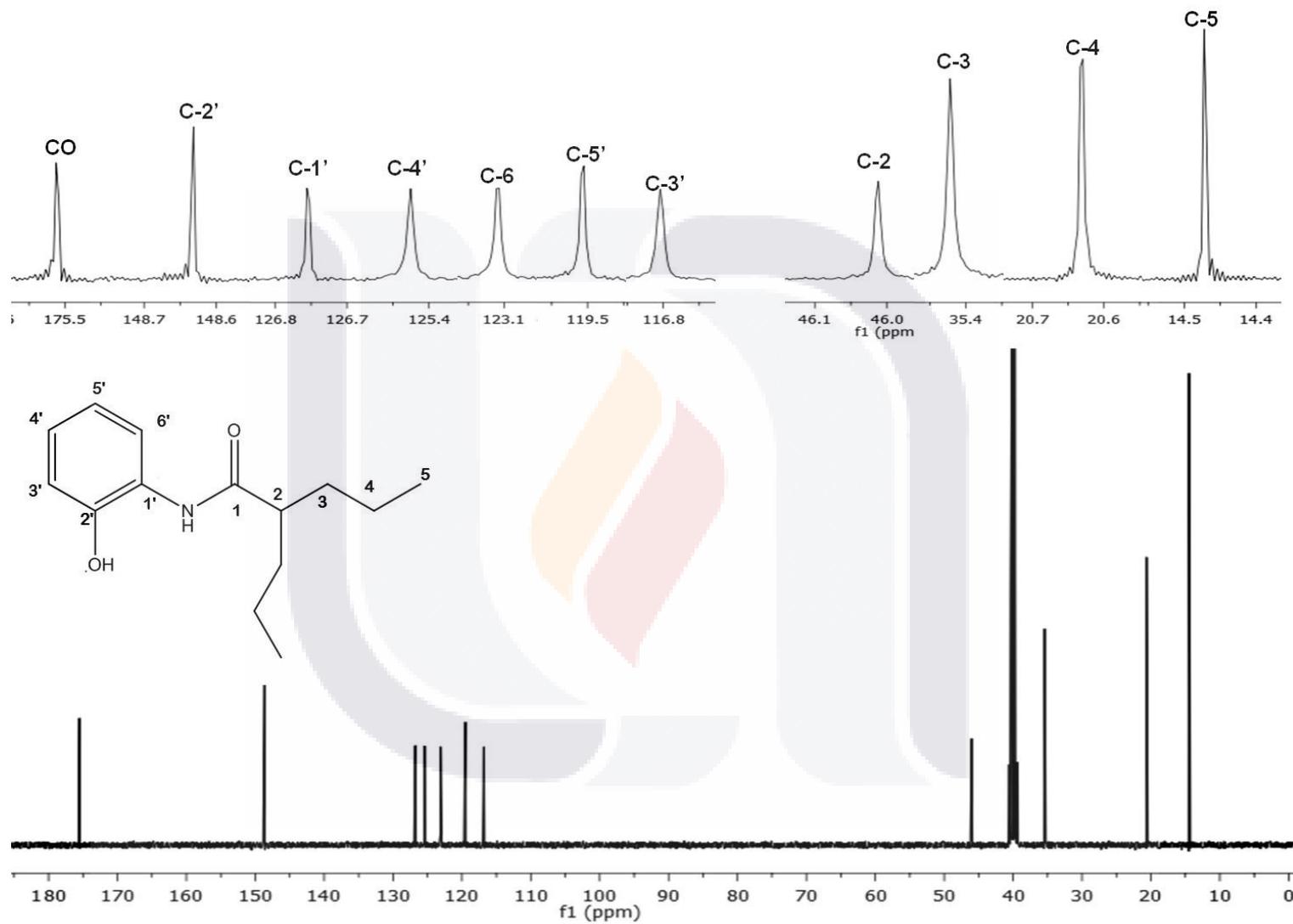


Figura 16. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida.

12.1.3. Espectrometría de masas

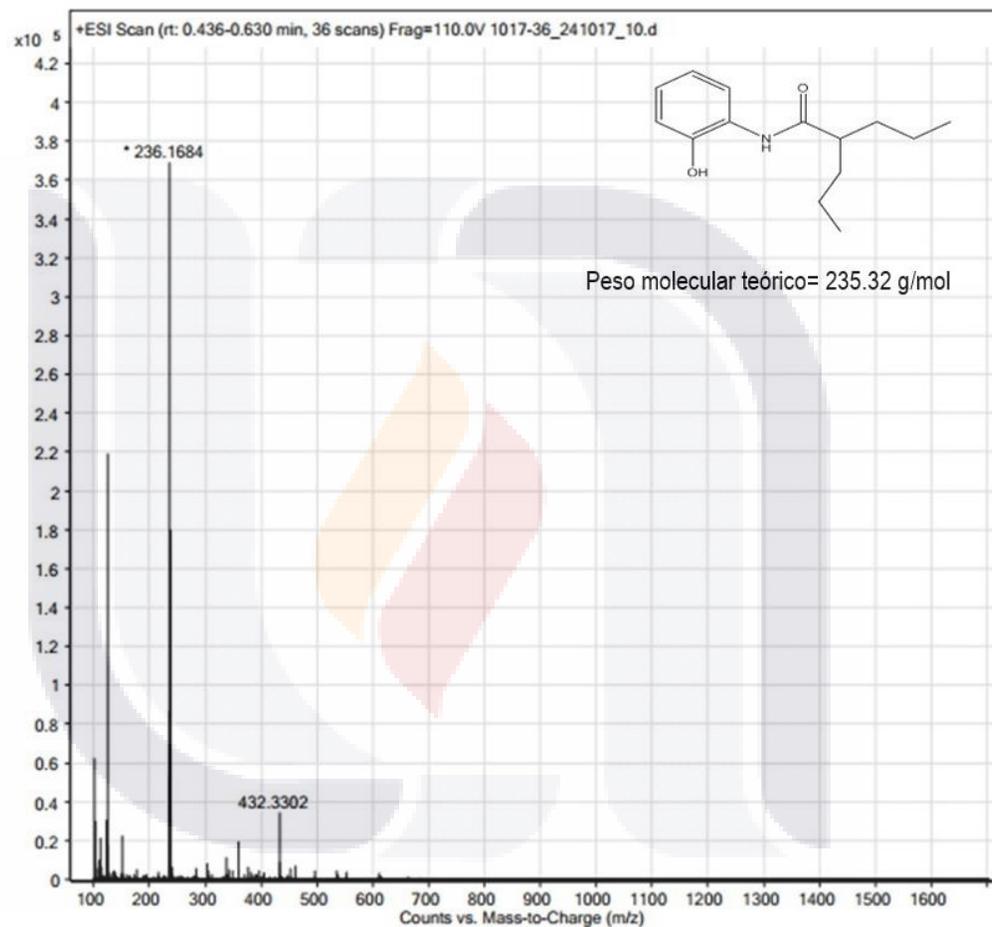
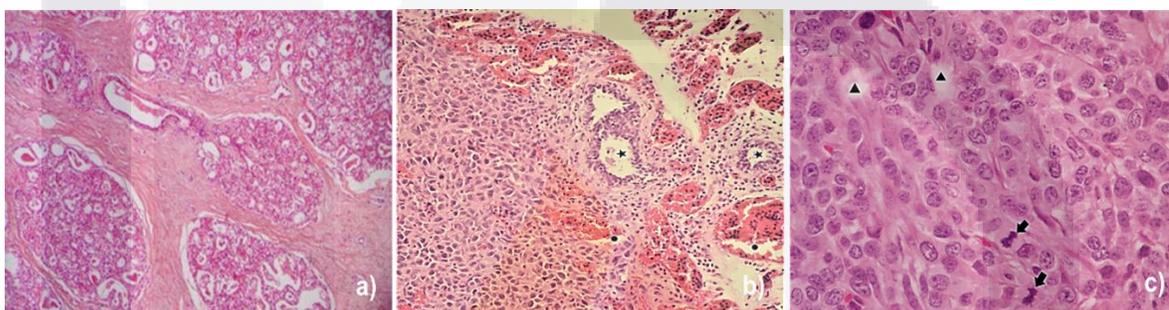


Figura 17. Análisis de espectrometría de masas. Peso molecular experimental= 236.1684.

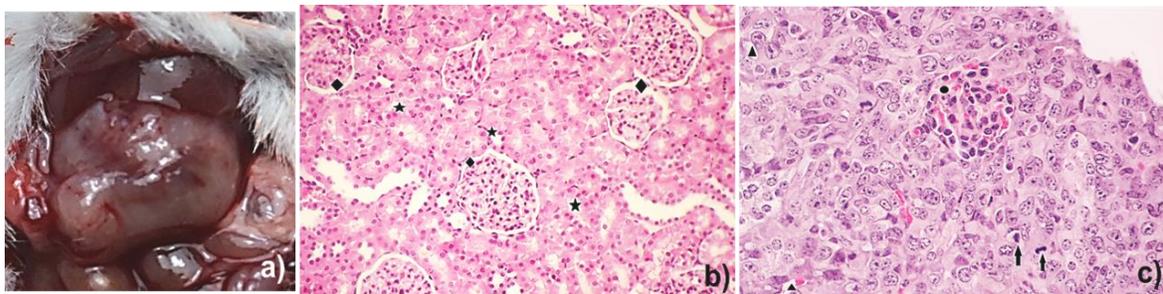
## 12.2. Estandarización de modelo de alotrasplante tumoral

La imagen 18a, muestra el estroma mamario normal; elevada presencia de tejido conjuntivo y ductos y lóbulos activos, en contraste, observe en la Fig. 18b, como el tejido tumoral inducido por la inoculación de la línea celular 4T1, infiltra el tejido mamario en donde se reconocen algunos lóbulos mamarios remanentes (Fig. 18b), un acercamiento al tejido mamario infiltrado permite determinar un tumor de alto grado de malignidad (escala de Bloom-Richardson) caracterizado por: elevado número de mitosis atípicas por campo, baja presencia de ductos neoplásicos, marcado pleiomorfismo nuclear (Fig. 18c).



**Figura 18. Comparativa de estroma mamario sano vs carcinoma ductal de mama.** a) Microfotografía panorámica de estroma mamario, se observan zonas de tejido conjuntivo y conductos, varios lóbulos activos como corresponde a este estadio funcional (20x); b) tejido tumoral en mama con patrón sólido (izq), se visualizan túbulos secretores (★) y vasos sanguíneos (●) de tejido mamario residual (20x); c) tejido tumoral de patrón sólido de alto grado, se observan mitosis atípicas (↘), así como ductos neoplásicos (▲) (40x).

El estudio histopatológico de todas las muestras de tejido tumoral alotrasplantado a la cápsula renal, se comparó con la escala de malignidad de los tumores de Bloom-Richardson, observándose siempre las mismas características histopatológicas de un carcinoma de alto grado de malignidad, similar al tumor encontrado en la mama, caracterizado por: elevado número de mitosis atípicas por campo, baja presencia de ductos neoplásicos, marcado pleiomorfismo nuclear, infiltración del tejido renal con algunos glomérulos esclerosados (Fig. 19c).



**Figura 19. Tejido tumoral sin tratamiento.** a) Fotografía del crecimiento de tejido tumoral alotrasplantado a la cápsula renal de ratón hembra (cepa Balb-C); b) microfotografía parénquima renal sano, se observan túbulos (★) y glomérulos (◆) bien definidos en correcta proporción (40x); c) glomérulos residuales (●), rodeados por carcinoma mamario de alto grado (mitosis atípicas †, ductos neoplásicos ▲) (40x).

### 12.3. Efectos antitumorales del compuesto SAHA-VPA sobre los tumores alotrasplantados a la cápsula renal (curva dosis-respuesta)

Las imágenes macroscópicas 1a y 1b corresponden al grupo control alotrasplantado, en donde se observa el tumor de color blanco, altamente vascularizado que recubre completamente al riñón. En comparación, los tumores de los grupos tratados con SAHA-VPA a las dosis de 10 mg de peso (Fig. 20-1c y 1d), 30 (Fig. 20-1e y 1f) y 50 (Fig.20-1g y 1h) respectivamente, mostraron que en comparación con los tumores del grupo control, los tumores de los grupos tratados con el anticancerígeno fueron de menor tamaño y adheridos al riñón, el cual aunque con infiltrados tumorales pudo ser fácilmente reconocido. El efecto inhibitor más importante sobre la masa tumoral, se observó con la dosis de 30 mg de peso (Fig. 20).

En base a la escala de malignidad de los tumores de Bloom-Richardson, la histopatología de los alotrasplantes del grupo control mostró el mayor grado de malignidad (Amat et al., 2002); marcado pleiomorfismo nuclear, baja cantidad de ductos neoplásicos y un elevado número de mitosis atípicas (Figs. 20 -2a y 2b). Cabe hacer notar, que en el grupo control alotrasplante, se encontraron zonas dispersas de necrosis, suponemos que este fenómeno es debido al acelerado desarrollo del tumor y a que la angiogénesis fue insuficiente para irrigar adecuadamente al tumor. Por otro lado, la histopatología de los tumores tratados con las diferentes dosis de SAHA-VPA, mostraron cambios celulares indicativos de muerte celular, como: vacuolización citoplasmática y nuclear (espacios en blanco citoplasmáticos y nucleares), picnosis (núcleos condensados y altamente basófilos), cariorrexis/cariolisis (núcleos fragmentados), así como amplias bandas de tejido con células necrosadas y en apoptosis, las cuales se observan como zonas de coloración rosácea con células fantasma

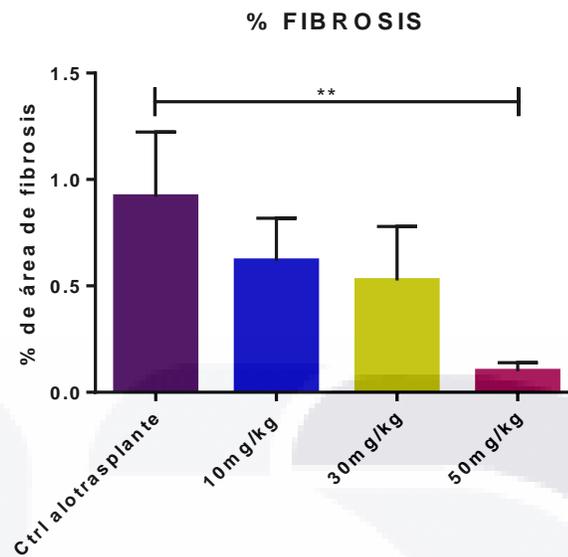
(contorno de las células anucleares), todo ello sugiere fuertemente el efecto anticancerígeno del SAHA-VPA (Fig. 20-2c a 2h).

GRUPOS EXPERIMENTALES	MACROSCOPIA TUMORAL <sup>(1)</sup>		HISTOLOGÍA TUMORAL <sup>(2)</sup>	
Control alotrasplante				
Tratamiento 10mg/Kg/día				
Tratamiento 30mg/Kg/día				
Tratamiento 50mg/Kg/día				

**Figura 20. Características macroscópicas y microscópicas del tejido tumoral. 1a-1b) macroscopía del tumor en riñón del grupo control alotrasplante.** No se observa tejido renal remanente. **1c-1g) macroscopía tumoral de los grupos con tratamiento con el antineoplásico SAHA-VPA.** Se observa una menor cantidad de tejido tumoral que rodea tejido renal sano (■). **2a-2b). Microscopía tumoral del grupo control alotrasplante.** Elevado número de células tumorales viables, marcado pleiomorfismo nuclear, mitosis atípicas (▲) y pocos ductos neoplásicos (●). **2c-2g) Microscopía tumoral de grupos con tratamiento antineoplásico.** Amplias bandas de respuesta al tratamiento, con cambios celulares como picnosis (★), cariólisis/cariórrexis (◆) y vacuolización citoplasmática y nuclear (↑) (2a, 2c, 2e, 2g con un aumento de 40x) (2b, 2d, 2f, 2h con un aumento de 100x).

#### 12.4. Efecto del SAHA-VPA sobre la cantidad de colágena tumoral

La fibrosis tumoral (expresada como el porcentaje de colágena por campo a 20X), inducida por el tratamiento con las diferentes dosis del anticancerígeno mostró una disminución significativa de fibrosis tumoral en los animales que recibieron la mayor dosis de SAHA-VPA (50mg/kg de peso) ( $p < 0.01$  versus el grupo control alotrasplante) (Fig. 21).



**Figura 21. Porcentaje de área de fibrosis tumoral.** Se encontraron diferencias significativas entre el control alotrasplante y la dosis de 50 mg/kg (\*\*p<0.01).

La figura 22 muestra los resultados de la determinación la fibrosis (% colágena) con la tinción rojo sirio bajo luz no polarizada (coloración roja), bajo luz polarizada (campo oscuro, coloración rojo-amarillo) y la imagen procesada en el programa Fiji para determinar el porcentaje de colágena(blanco) por área, en los resultados del grupo control alotrasplante, se observan las fibras de colágena dispuestas en forma de cúmulos de coloración roja rodeadas de tejido tumoral (Fig. 22-1a), bajo la luz polarizada (Fig. 22-2a), las fibras se observan nuevamente en forma de cúmulos en diversas tonalidades (rojo-amarillo) en un área extensa, representando un 2.27% del área total del campo (Fig. 22-3a) en comparación con los animales tratados con el compuesto, la dosis con una disminución de la fibrosis más evidente es la de 50mg, la cual muestra una coloración roja en la imagen bajo luz no polarizada muy tenue (Fig. 22-1d), evidenciando una baja presencia de colágena dispuesta en forma punteada, en la imagen bajo luz polarizada (Fig. 22-2d) representando un 0.08% del área total del campo, el segundo grupo con una mayor disminución es el de 30mg/kg (Fig. 22-1c-3c), el cual representa sólo el 0.54% del área en forma de colágena dispuesta en una franja puntiforme. La dosis de 10mg muestra una disminución en la colágena mostrando una coloración roja intensa en forma de hilos largos (Fig. 22-1b), bajo la luz polarizada, se muestra una mayor área en coloración roja en su mayoría (Fig. 22-2b) representando el 0.89% del área (Fig. 22).

GRUPOS EXPERIMENTALES	ROJO SIRIO BAJO LUZ NO POLARIZADA(1)	ROJO SIRIO BAJO LUZ POLARIZADA(2)	MEDICIÓN DE COLÁGENA TOTAL(3)
Control alostrasplante	a)	a)	b)
Tratamiento 10mg/Kg/día	b)	b)	b)
Tratamiento 30mg/Kg/día	c)	c)	c)
Tratamiento 50mg/Kg/día	d)	d)	d)

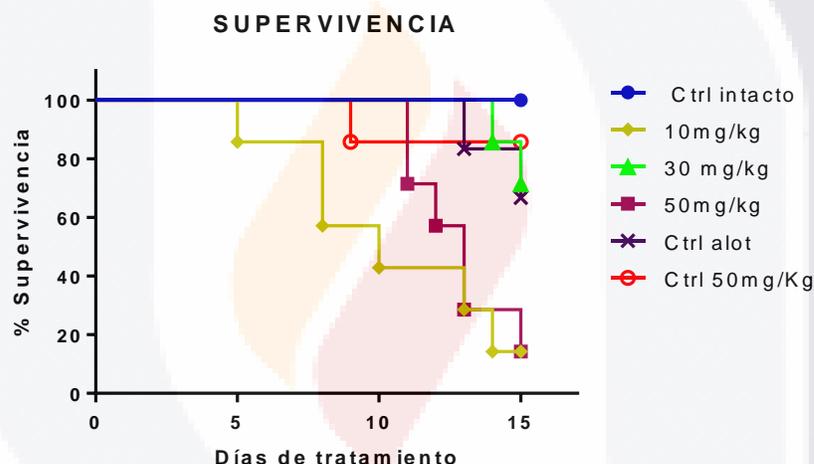
**Figura 22. Evaluación del porcentaje de colágena en los diferentes grupos experimentales.** Tinción con rojo sirio para determinar la cantidad de colágena total (%) en el tejido tumoral de animales experimentales. Las fotografías 1a-1d muestran al tejido tumoral con fibras de colágena en tono rojo bajo luz no polarizada, siendo menos evidente la coloración roja en la dosis de 50mg. Las fotografías 2a-2d tomadas con luz polarizada, muestran una mayor presencia de depósitos de colágena dispuesta en forma de cúmulos en los grupos alostrasplante y SAHA-VPA10mg en comparación el menor porcentaje de colágena observado en los grupos de 30 y 50mg (fotografías 3a-3d). Las imágenes fueron procesadas con el programa Fiji para determinar el porcentaje de fibrosis (blanco). Magnificación 10x.



## 12.5. Curva de supervivencia

En la figura 23 se muestra la tasa de supervivencia de los diferentes grupos. Observe que la menor supervivencia ocurrió en los grupos de 10 mg/kg con una mortalidad del 85% en ambos grupos antes del día 14 del tratamiento. Observe también en la figura 23, que la mayor supervivencia ocurrió en el grupo de 30mg con una tasa de supervivencia del 71%. Es importante señalar que las pruebas bioquímicas e histopatológicas solo se realizaron en los animales sobrevivientes.

Es posible que la muerte de los animales se haya relacionado más con el rápido desarrollo y severidad del cáncer y no al tratamiento, ya que solo los animales del grupo de 50 mg tuvieron una supervivencia mayor al 71%.



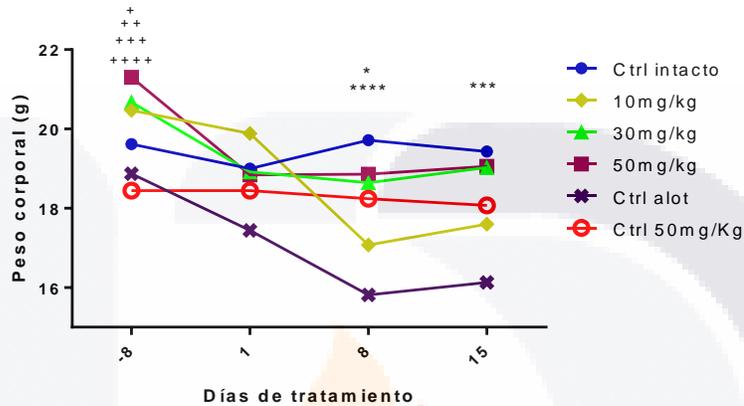
**Figura 23. Curva de supervivencia de los grupos experimentales.** En el grupo de 10mg la muerte de los animales inició a los 5 días de tratamiento, mientras que para el grupo de 50 mg/kg, las muertes se presentaron después del día 10 de tratamiento, así, al final del experimento solo sobrevivieron 1 animal de los grupos de 30 y 50 mg.

## 12.6. Evaluación del peso corporal.

La comparación de los pesos corporales de los diferentes grupos a lo largo del experimento (Fig. 24), muestra que el grupo alotrasplantados experimentó una pérdida significativa de peso ( $p < 0.001$  vs los demás grupos). Note sin embargo, que a pesar de la pérdida de peso, 4 de 7 animales terminaron el estudio (Fig. 23). Una disminución significativa del peso corporal también ocurrió en los grupos tratados con SAHA-VPA, sobre todo en 10 mg y 50 mg, sin embargo, en ambos grupos solo 1 de 7 animales sobrevivieron al experimento, mientras que en el grupo Control 50 mg, sobrevivieron 6 de 7 animales. La Fig. 24, también

muestra que el tratamiento con 30 mg, indujo disminución (en comparación con el peso inicial y con el grupo control), del peso corporal menos severa que la observada en los grupos anteriores, además, en este grupo 5 de 7 animales terminaron el experimento.

EVALUACIÓN DEL PESO CORPORAL



**Figura 24. Efectos de los diferentes tratamientos sobre el peso corporal.** Se muestran las diferencias significativas entre los grupos 10mg/kg y control alotrasplante (++++p<0.0001 y +++p<0.001 al día 8 y +++p<0.001 y ++p<0.005 al día 15), ambas diferencias con respecto al día -8. El grupo de 30mg/kg muestra una disminución significativa para el día 8 con respecto al día -8 (+p<0.05). La prueba de Dunnett's muestra diferencias significativas entre grupos experimentales a los diferentes tiempos, para el día 8 del tratamiento, los grupos 10 mg/kg y control alotrasplante muestran diferencias significativas con respecto al control intacto (\*\*p<0.005 y \*\*\*\*p<0.0001 respectivamente), mientras que en el día 15, diferencias significativas se encontraron solo entre el grupo control alotrasplante y el grupo control intacto (\*\*p<0.0005).

**12.7. Efectos de las diferentes dosis de SAHA-VPA sobre la histología hepática y renal.**

El estudio macroscópico del hígado y riñón de todos los grupos experimentales sacrificados al final del experimento, no mostraron cambios evidentes sugerentes de algún efecto sobre la anatomía macroscópica. Las figuras 25- 1a a 1l, muestran imágenes macroscópicas representativas del hígado y riñón (contralateral al alotrasplante) de los diferentes grupos experimentales. Sin importar el tratamiento, todos los hígados y riñones mostraron una superficie lisa de color rojizo, sin lesiones evidentes (tejidos sanos).

La histopatología de los grupos control intacto (Fig. 25-2a), control alotrasplante (Fig. 25-2c), 10 (Fig. 25-2e), 30 (Fig. 25-2 g), y 50 mg (Fig. 25-2i) muestra acinos hepáticos sanos sin cambios en la arquitectura de los sinusoides, los hepatocitos de estos grupos mantienen su morfología normal (formas hexagonales o redondos) con citoplasma uniforme y núcleos

centrales. En comparación, la histopatología de los hígado del grupo Control 50 mg presentaron vacuolización citoplasmática (Fig. 25-2k).

La histología renal de los diferentes grupos experimentales, no mostró cambios importantes en la arquitectura del parénquima, solo leve inflamación en los túbulos de los grupos 30 (Fig. 25-2h), 50 (Fig. 25-2j) y control 50 mg/kg (Fig. 25-2l), mientras que en los grupos control intacto (Fig. 25-2b), control alostrasplante (Fig. 25-2d) y 10 mg (Fig. 25-2f) se observan túbulos con su luz bien definida, sin cambios estructurales de los glomérulos (capilares glomerulares y cápsula de Bowman) (Fig. 25-2b,d, f, h, j, l).

GRUPOS EXPERIMENTALES	MACROSCOPIA HEPÁTICA Y RENAL (1)		HISTOLOGÍA HEPÁTICA Y RENAL (2)	
Control intacto	a)	b)	a)	b)
Control alostrasplante	c)	d)	c)	d)
Tratamiento 10mg/Kg/día	e)	f)	e)	f)
Tratamiento 30mg/Kg/día	g)	h)	g)	h)
Tratamiento 50mg/Kg/día	i)	j)	i)	j)
Control tratamiento 50 mg/kg	k)	l)	k)	l)

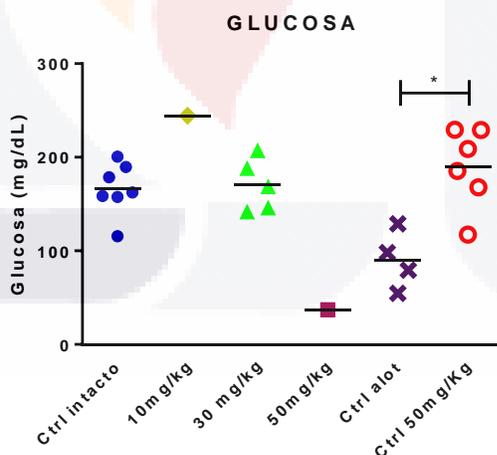
**Figura 25. Evaluación histológica de la toxicidad hepática y renal del compuesto SAHA-VPA. 1a-1l) Macroscopía hepática y renal.** No se observan cambios significativos, ambos órganos muestran una superficie lisa con coloración parda, característica de un tejido sano. **2a, c, e, g, i) Histología hepática.** Se observa la vena centro-lobulillar del acino hepático (■), así como los sinusoides (↓) sin alteraciones en su arquitectura, los hepatocitos mantienen su morfología normal. **2k) Histología del hígado del grupo control 50mg/kg.** No se

muestran cambios evidentes en la arquitectura del acino hepático, sin embargo, la morfología del hepatocito se encuentra alterada con presencia de vacuolas citoplasmáticas. **2b, d, f) Histología renal.** Los grupos control intacto, alotrasplante y 10mg/kg no muestran modificaciones en la arquitectura del parénquima renal, se observan los glomérulos renales (●) bien definidos y los túbulos con su luz intacta (▲). **2h, j, l)** Los grupos con tratamientos de la dosis intermedia a la más alta (30 y 50 mg/kg, respectivamente), así como el control 50mg/kg, muestran una leve inflamación en los túbulos (40x).

**12.8. Efectos de las diferentes dosis de SAHA-VPA sobre las pruebas de funcionamiento hepático y renal.**

Las pruebas del funcionamiento hepático y renal se muestran la tabla 4 del anexo 2: glucosa, proteínas totales, albúmina, alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), creatinina y urea de los diferentes grupos experimentales. Debido a que en los grupos de 10 y 50 mg de SAHA-VPA solo tuvieron un solo animal, los datos de estos animales no se consideraron para el análisis estadístico. Debido al poco volumen de suero de algunos animales no se pudo cubrir la totalidad de algunas variables. Los resultados de los diferentes grupos se expresaron como la media y valores individuales.

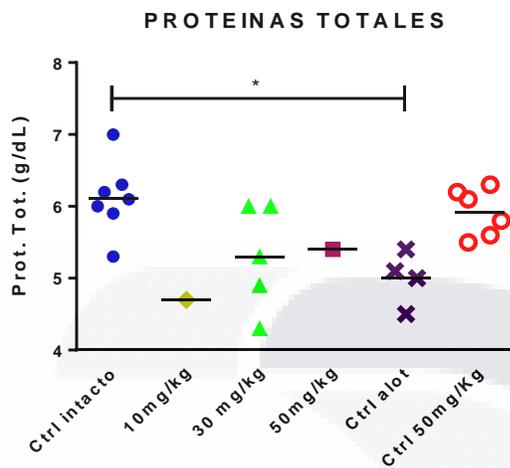
*Glucosa sérica.* En el grupo 10 mg (un solo animal), los resultados muestran una hiperglucemia de 1.4 veces la concentración del grupo control intacto (Fig. 26). Por otro lado, la dosis de 50 mg y el control alotrasplante, mostraron una hipoglucemia severa (4.4 y 1.8 menores a las del grupo control intacto) ( $p < 0.05$  Control alotrasplante vs Control 50 mg) (Fig. 26).



**Figura 26. Glucosa sérica.** Se observan diferencias entre los diferentes grupos. Diferencias significativas ocurrieron solo entre los grupos Control alotrasplante y grupo Control 50 mg \* $p < 0.05$ .

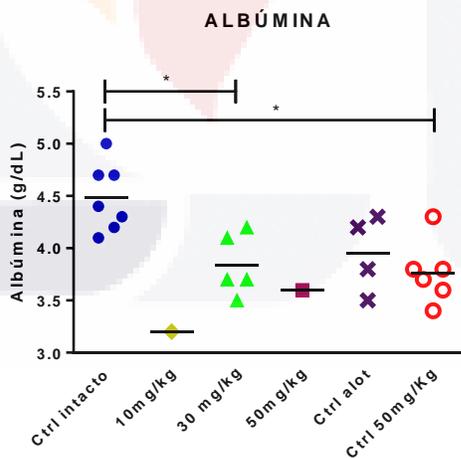
*Proteínas totales.* Los resultados no muestran variación significativa entre los grupos experimentales, con valores de media de 6.1, 5.3, 5.4 y 5.9 g/dL para los grupos control intacto, 30, 50 mg y control 50 mg respectivamente, excepto los grupos entre el grupo

Control alotrasplante con 5.1 veces menos concentración con respecto al grupo Control Intacto ( $p < 0.05$ ) (Fig. 27).



**Figura 27. Proteínas séricas totales.** Diferencias significativas se observaron entre los grupos Control alotrasplante y Control intacto ( $*p < 0.05$ ).

*Albúmina sérica.* Los niveles séricos de la albúmina fueron semejantes en los grupos 30 mg, control alotrasplante y control 50 mg con valores de 3.8, 3.9, y 3.8 g/dL, sin diferencias significativas con respecto al grupo control intacto, encontrándose diferencias significativas entre los grupos 30 mg y control 50 mg con respecto al grupo control intacto ( $*p < 0.05$ ) (Fig.28).

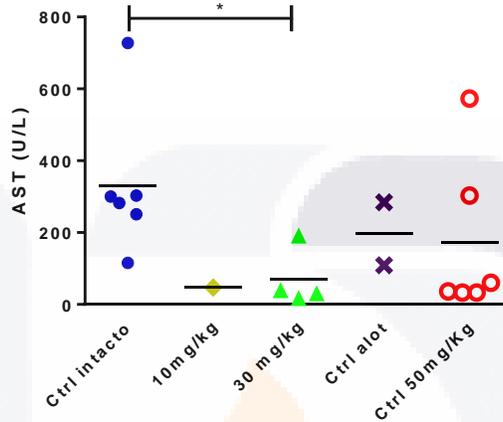


**Figura 28. Albúmina sérica.** Con respecto al grupo Control intacto, los grupos 30 mg y Control 50 mg mostraron una disminución significativa ( $*p < 0.05$ ).

*Aspartato aminotransferasa sérica.* La comparación estadística de esta enzima (AST), muestra valores discordantes entre los grupos experimentales, con una media de 329.9 U/L

para el control intacto, mientras que para el grupo 30 mg, control alotrasplante y control 50 mg, la disminución es de 5.2, 1.6 y 1.9 veces respectivamente, encontrándose diferencias significativas entre el grupo 30 mg respecto al control intacto (\*p<0.05) (Fig. 29).

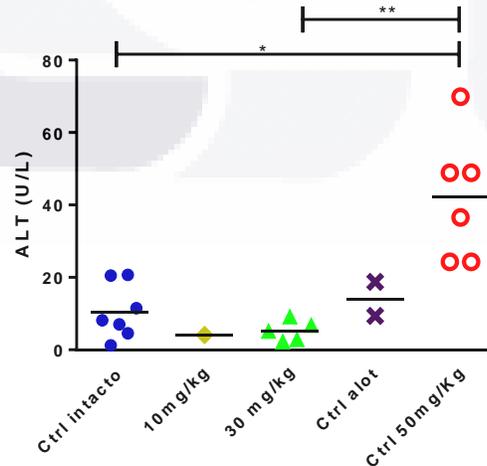
ASPARTATO AMINOTRASNFERASA (AST)



**Figura 29. Aspartato aminotransferasa sérica.** Con respecto del Control Intacto, el grupo 30 mg, mostró una disminución significativa (\*p<0.05).

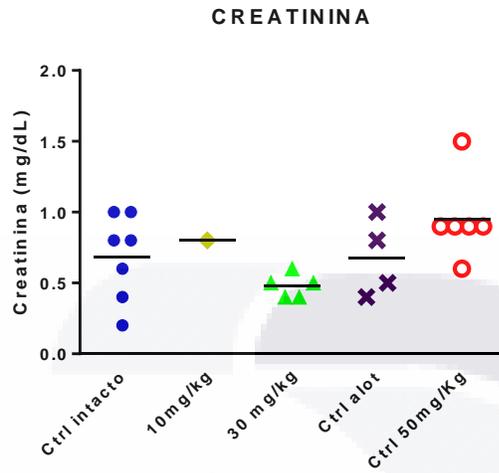
*Alanino aminotransferasa.* La comparación estadística entre los diferentes grupos mostró diferencias significativas entre los grupos Control intacto y 30 mg con 4 y 10.2 veces menores con respecto al grupo Control 50 mg con una media de 42 U/L (\*p< 0.05 y \*\*p < 0.001, respectivamente) (Fig. 30).

ALANINO AMINOTRANSFERASA (ALT)



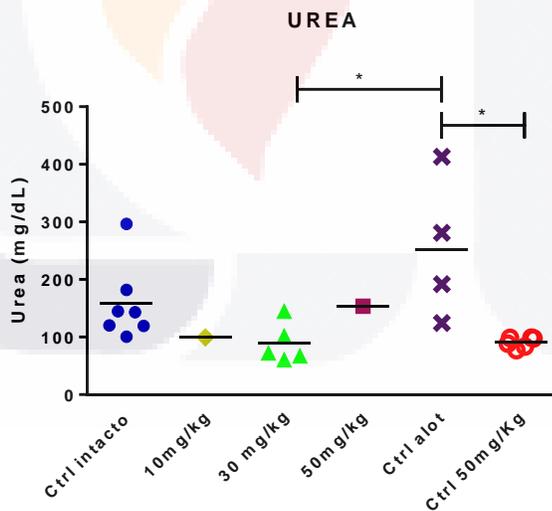
**Figura 30. Alanino aminotransferasa sérica.** Se muestran diferencias significativas entre el grupo control 50mg con respecto a los grupos 30mg Control intacto, con valores de \*\*p < 0.001 y \*p < 0.05, respectivamente.

*Creatinina sérica.* Este parámetro de funcionamiento renal no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos (Fig. 31).



**Figura 31. Gráfica de creatinina en suero.** No se encontraron diferencias significativas entre los grupos analizados.

*Urea sérica.* El análisis estadístico de este parámetro, muestra el incremento significativo de la urea en el grupo Control alotrasplante con una concentración 2.8 veces mayor con respecto a los grupos 30 mg y Control 50 mg (\* $p < 0.05$ ).



**Figura 32. Urea sérica.** Observe el incremento significativo de la urea en el grupo Control alotrasplante con respecto a los grupos 30 mg y control 50 mg (\* $p < 0.05$ ).

## 13. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo demostraron que: 1) Se reprodujo la síntesis y caracterización química del SAHA-VPA, 2) Que el modelo de alotrasplantes de tumores a la cápsula renal es útil para la reproducción de un mismo subtipo de tumor a gran escala y bajo costo, 3) El compuesto SAHA-VPA tuvo un efecto antitumoral significativo con una mayor supervivencia con la dosis de 30 mg/kg, 4) El compuesto SAHA-VPA no mostró efectos hepatotóxicos y nefrotóxicos significativos, 5) El SAHA-VPA inhibe significativamente la fibrosis tumoral.

### 13.1. Síntesis y Caracterización de N-(2-hidroxiacetil)-2-propilpentanamida (SAHA-VPA)

En nuestras manos, la síntesis y caracterización química del SAHA-VPA (Prestegui-Martel et al., 2016) fueron reproducidas fielmente que dio como resultado un compuesto cristalizado en forma de agujas opacas y delgadas, cuya identidad fue avalada por la replicación de los resultados de la espectrometría de masas (HPLC-MS), la espectroscopia de infrarrojo (IR) y la resonancia magnética nuclear (RMN) y biológicamente por los resultados obtenidos en el presente proyecto (Fig. 12).

### 13.2. Estandarización del modelo animal de alotrasplante tumoral a la cápsula renal.

El contar con un modelo animal de cáncer que sea de fácil reproducción, que conserve las características histopatológicas es importante para la evaluación de tratamientos anticancerígenos a bajo costo (Holen, Speirs, Morrissey, & Blyth, 2017). Estas características deseables se cumplen en este proyecto al lograr la estandarización del modelo de alotrasplante de tumores a la cápsula renal. La declaración anterior es avalada por los presentes resultados (Figs. 18 y 19), en donde demostramos que a partir de un animal donador de tejido tumoral, se pueden reproducir los tumores de manera indefinida, mediante la técnica de alotrasplante, conservando sus características histopatológicas.

### 13.3. Efectos antitumorales del SAHA-VPA sobre los tumores alotrasplantado a la cápsula renal.

El compuesto fue utilizado como un inhibidor de la HDAC8, enzima encargada de retirar grupos acetilos de los residuos 170-200 del represor transcripcional Ying-Yang 1 (YY1),

dicha desacetilación está relacionada con la sobreexpresión del mtp53 en CMTN, promoviendo la apoptosis en las células de cáncer triple negativo (Z. T. Wang et al., 2016)

La terapia neoadyuvante (TNA) tiene como objetivo utilizar drogas anticancerosas para disminuir el tamaño de los tumores, y constituye el paso previo a la extirpación quirúrgica del tumor (National Institutes of Health, 2016). Los presentes resultados mostraron que SAHA-VPA indujo: menor masa tumoral (Fig. 20 -1), cambios necróticos y apoptóticos, como vacuolación de núcleos y citoplasmas, cariorrexis, picnosis y cariólisis; disminución de la fibrosis y bajo infiltrado linfocitario del estroma tumoral. Estos cambios celulares y estromales, entre otros constituyen los criterios de evaluación de la respuesta del huésped a la terapia neoadyuvante (Sethi et al., 2013). Dado que los efectos del SAHA-VPA incluyen a la mayoría de los criterios para evaluar la respuesta al tratamiento anticanceroso, nuestros resultados sugieren que el SAHA-VPA podría ser un buen candidato para ser utilizado como terapia neoadyuvante.

#### **13.4. Efectos hepatotóxicos y nefrotóxicos del SAHA-VPA.**

En base a los cambios observados en algunas de las pruebas de funcionamiento hepático y renal, sugerimos que bien pudieron haberse debido a la presencia del tumor *per se* y no a los efectos tóxicos del compuesto. Esto es sugerido por los hallazgos descritos a continuación.

La histología hepática no mostro alteraciones en la arquitectura del tejido de los grupos control, 10, 30 y 50 mg respetivamente, mientras que en el grupo control 50 mg, se observó una vacuolización de los hepatocitos sugerentes de depósitos de glucógeno. Es posible que este fenómeno sea secundario a la acumulación de glucógeno como resultado de la inhibición de la HDAC8. Esta suposición es congruente con los hallazgos de Tian y colaboradores (2015), quienes relacionaron la actividad de la HDAC8 con un aumento en la resistencia a la insulina (Tian et al., 2015). En nuestro caso, sugerimos que al inhibirse la HADC8 por el SAHA-VPA, se promovió un aumento de la gluconeogénesis y por lo tanto la vacuolización en los hepatocitos del grupo control 50 mg (fig. 25-2k). Sin embargo, es necesario realizar estudios para determinar si las vacuolas contienen glucógeno.

Los resultados de la histopatología hepática y renal con los bajos niveles de glucosa sérica observada en el grupo control alotrasplante (Fig. 26) sugiere una glucolisis elevada,

posiblemente para cubrir los requerimientos energéticos para la replicación de las células tumorales como lo sugieren Vander Heiden y colaboradores (2009) quienes describen que mecanismos moleculares, intrínsecos y extrínsecos, convergen para incrementar el metabolismo celular y así cubrir tres necesidades básicas de la célula en división (generación rápida de ATP, aumento de la síntesis de macromoléculas y mantenimiento adecuado del estado redox). Estas alteraciones y otras similares se han observado tanto en células normales de rápida proliferación como en células tumorales, en estas últimas, dichas alteraciones se implementan en un microambiente estresante en el que la concentración de nutrientes como glucosa, glutamina y oxígeno son heterogéneas espacial y temporalmente. Debido a esto, hay un cambio en el fenotipo metabólico de la célula cancerosa, que pasan de obtener ATP mediante la fosforilación oxidativa a obtenerla mediante la glucólisis anaerobia (efecto Warburg), la cual es más rápida pero menos eficiente (Vander Heiden, Cantley, & Thompson, 2009).

Se observó además que los animales del grupo control alotrasplante presentaron una disminución significativa en la concentración de proteínas totales (Fig. 27), esto podría explicarse por la caquexia neoplásica, definida como una importante y progresiva pérdida de peso corporal, anorexia, astenia, adinamia, anemia, náuseas crónicas e inmunosupresión, que lleva a falla orgánica progresiva. Otra característica importante de la caquexia cancerosa es el desgaste tisular que sufre el paciente, afectando particularmente al músculo esquelético y al tejido adiposo. Argilés y colaboradores definen a la caquexia como un síndrome complejo que está presente en más de dos tercios de pacientes de cáncer en fase terminal, y sugieren que puede ser la causa directa de la cuarta parte de los fallecimientos por esta enfermedad (Argilés, Busquets, López-Soriano, & Figueras, 2006).

La ALT sérica es una enzima considerada un biomarcador altamente sensible y específico de hepatotoxicidad, se localiza principalmente en el hígado, con actividades enzimáticas más bajas en el músculo esquelético y el tejido cardíaco. La aspartato aminotransferasa (AST) se localiza en el corazón, cerebro, músculo esquelético y tejido hepático (Ozer, Ratner, Shaw, Bailey, & Schomaker, 2008). En nuestros resultados, la elevación en la actividad de la AST (Fig. 29) y la ALT (Fig. 30), pueden deberse al estrés inducido a los animales, así como al trauma tisular durante la toma de las muestras, esto, aunado a la enorme cantidad de factores que interfieren con los valores de dichos parámetros, como

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

elevados valores de bilirrubinas, hemoglobina y hemolisis (Young, 1997), este último fenómeno se presenta en muchas de las muestras analizadas debido a la dificultad en la toma de muestra y al pequeño volumen sanguíneo que se obtiene de los ratones.

Para evaluar el efecto tóxico a largo plazo del SAHA-VPA, consideramos que se requiere administrar el compuesto durante tiempos más prolongados y dosis mayores a 30 mg pero menores a 50 mg, ya que a dosis elevadas los animales mostraron una elevada tasa de mortalidad y un crecimiento mayor de la masa tumoral. Es posible que el menor efecto antitumoral de la dosis de 50 mg sea resultado de la farmacodinamia del compuesto, como lo sugieren Correa-Basurto y colaboradores (2019), quienes han observado que el N-(2-hidroxifenil)-2-propilpentanamida (SAHA-VPA), se distribuye ampliamente en los tejidos, en especial en hígado, sugiriendo además la posibilidad de que también atraviese la barrera hematoencefálica (Correa-Basurto et al., 2019). La disminución de la albúmina (Fig. 28) en los grupos 30 mg y control 50 mg, podría explicarse por la afinidad del compuesto a la albúmina, como lo sugiere Correa Basurto y colaboradores (2019). Sin embargo, para contestar esta interrogante, es necesario realizar más experimentos.

La creatinina y la urea al ser compuestos de desecho, se filtran libremente por el glomérulo y no son reabsorbidos ni metabolizados por el riñón. Estos indicadores son utilizados como parámetros de evaluación de la función renal (Bagshaw & Gibney, 2008). En nuestros resultados, la creatinina (Fig. 31) no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos, mientras que la urea (Fig. 32) del grupo alotrasplante se encontró elevada. Es posible que esto se haya debido al incremento en el catabolismo proteico corporal secundario al desarrollo tumoral. Es necesario realizar más experimentos para avalar esta suposición.

Se pretende también en un futuro, realizar pruebas más específicas para evaluar el efecto antitumoral del compuesto SAHA-VPA, mediante pruebas moleculares como western blot para detectar proteínas involucradas en la apoptosis (anexina V, Bcl2 o caspasas) y en la proliferación celular (ki67, ciclina D1), tanto la apoptosis como la proliferación son utilizados actualmente como parámetros de pronóstico (Goodwin, Rossanese, Olejniczak, & Fesik, 2015; Yerushalmi, Woods, Ravdin, Hayes, & Gelmon, 2010), además de un panel bioquímico más amplio tanto en sangre como en orina, en el que se incluyan biomarcadores más específicos de daño hepático (bilirrubinas, ALT, glucógeno, fosfatasa alcalina,

proteínas totales, albúmina, entre otras por determinar) (Ozer et al., 2008) y daño renal en etapas tempranas (cistatina C, microalbumina, depuración de creatinina, entre otras) (Uchino, 2010).

### **13.5. Efecto del SAHA-VPA sobre la fibrosis tumoral.**

La disminución en la fibrosis y colagenización tumoral observada en los animales tratados con el anticancerígeno dependiente de la dosis (Fig. 22), coincide con los resultados descritos por Lou y colaboradores (2015), quienes describen que tanto la actividad de las HDACs y las HATs se relacionan con la formación de fibrosis cardíaca (Luo, Chen, & Wang, 2015). Además, Schuetze y colaboradores (2017) describen que los inhibidores de HDAC poseen una capacidad común para mejorar la acetilación de las histonas, así como para bloquear el ciclo celular de los fibroblastos cardíacos (Schuetze et al., 2017), mientras que Choi y colaboradores (2018) demostraron que el compuesto CG200745, inhibidor de HDACs no específicas, atenúa la fibrosis en la enfermedad renal obstructiva (Choi et al., 2018). En base a nuestros resultados, podemos sugerir que la disminución en la cantidad de colágena de los tumores pudo deberse al efecto del inhibidor de SAHA-VPA sobre la HDAC8.

## 14. CONCLUSIONES

Con base a nuestros resultados podemos concluir que:

- 1) Que el SAHA-VPA puede ser sintetizado y purificado siguiendo el método de Prestegui-Martel y colaboradores.
- 2) El modelo de cáncer alotrasplantado a la cápsula renal es reproducible, sin pérdida de las características histopatológicas del tumor, con excelentes resultados y de bajo costo.
- 3) El SAHA posee un importante efecto anticanceroso sobre el CMTN en función de la dosis.
- 4) A dosis elevada, el compuesto no muestra efectos hepatotóxicos y nefrotóxicos elevados, sin embargo es necesario realizar pruebas más específicas para evaluar estos parámetros.
- 5) El compuesto posee un importante efecto inhibidor de la fibrogénesis.
- 6) Por todo lo anterior, pensamos que el SAHA-VPA puede ser utilizado una droga anticancerosa y antifibrogénica. Sin embargo es necesario hacer más experimentos para avalar esta alentadora.

## 15. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

Implementar un modelo de cáncer en rata, con el fin de facilitar el manejo de los animales durante la cirugía y el tratamiento, así como en la toma de muestras, ya que el volumen obtenido por animal (ratón) fue muy bajo y no se alcanzó a cubrir el panel bioquímico, además se podría realizar un sangrado de los animales al inicio, durante y al final del tratamiento para así observar la evolución y los cambios inducidos por el tratamiento con respecto a la dosis y tiempo.

Realizar pruebas más específicas para evaluar el efecto antitumoral del compuesto SAHA-VPA, mediante pruebas moleculares como western blot para detectar proteínas involucradas en la apoptosis (anexina V, Bcl2 o caspasas) y en la proliferación celular (ki67, ciclina D1), tanto la apoptosis como la proliferación son utilizados actualmente como parámetros de pronóstico (Goodwin, Rossanese, Olejniczak, & Fesik, 2015; Yerushalmi, Woods, Ravdin, Hayes, & Gelmon, 2010), además de un panel bioquímico más amplio tanto en sangre como en orina, en el que se incluyan biomarcadores más específicos de daño hepático (bilirrubinas, ALT, glucógeno, fosfatasa alcalina, proteínas totales, albúmina, entre otras por determinar) (Ozer, Ratner, Shaw, Bailey, & Schomaker, 2008) y daño renal en etapas tempranas (cistatina C, microalbumina, depuración de creatinina, entre otras) (Uchino, 2010).

## 16. BIBLIOGRAFIA

17. Achenbach, J., Klingler, F., Blöcher, R., Moser, D., Häfner, A., & Rödl, C. (2013). Exploring the Chemical Space of Multitarget Ligands Using Aligned Self-Organizing Maps. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 4(12), 1169-1172.
18. Amat, S., Penault-Llorca, F., Cure, H., Le Bouedec, G., Achard, J. L., Van Praagh, I., . . . Chollet, P. (2002). Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading: a pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy. *International Journal of Oncology*. doi: 10.3892/ijo.20.4.791
19. Angelucci, A., Valentini, A., Millimaggi, D., Gravina, G. L., Miano, R., Dolo, V., . . . Bernardini, S. (2006). Valproic acid induces apoptosis in prostate carcinoma cell lines by activation of multiple death pathways. *Anticancer Drugs*, 17(10), 1141-1150. doi: 10.1097/01.cad.0000236302.89843.fc
20. Argilés, J. M., Busquets, S., López-Soriano, F. J., & Figueras, M. (2006). Fisiopatología de la caquexia neoplásica. *Nutr. Hosp.*, 21, 4-9.
21. Balasubramanian, S., Ramos, J., Luo, W., Sirisawad, M., Verner, E., & Buggy, J. J. (2008). A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas. *Leukemia*, 22(5), 1026-1034. doi: 10.1038/leu.2008.9
22. Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., . . . Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4), 823-837. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.009
23. Baylin, S. B., & Ohm, J. E. (2006). Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev cancer*, 6(2), 107-116. doi: 10.1038/nrc1799
24. Bermudez-Lugo, J. A., Perez-Gonzalez, O., Rosales-Hernandez, M. C., Ilizaliturri-Flores, I., Trujillo-Ferrara, J., & Correa-Basurto, J. (2012). Exploration of the valproic acid binding site on histone deacetylase 8 using docking and molecular dynamic simulations. *J Mol Model*, 18(6), 2301-2310. doi: 10.1007/s00894-011-1240-z
25. Bernstein, B. E., Meissner, A., & Lander, E. S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell*, 128(4), 669-681. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.033
26. Bjerling, P., Silverstein, R. A., Thon, G., Caudy, A., Grewal, S., & Ekwall, K. (2002). Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and in vivo specificity (vol 22, pg 2170, 2002). *Molecular and Cellular Biology*, 22(14), 5257-5258. doi: 10.1128/Mcb.22.14.5257-5258.2002
27. Bjornsson, H. T., Sigurdsson, M. I., Fallin, M. D., Irizarry, R. A., Aspelund, T., Cui, H., . . . Feinberg, A. P. (2008). Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA*, 299(24), 2877-2883. doi: 10.1001/jama.299.24.2877

28. Blaheta, R. A., Nau, H., Michaelis, M., & Cinatl, J., Jr. (2002). Valproate and valproate-analogues: potent tools to fight against cancer. *Curr Med Chem*, 9(15), 1417-1433.
29. Braicu, C., Pileczki, V., Pop, L., Petric, R. C., Chira, S., Pointiere, E., . . . Berindan-Neagoe, I. (2015). Dual targeted therapy with p53 siRNA and Epigallocatechingallate in a triple negative breast cancer cell model. *Plos ONE*, 10(4), e0120936. doi: 10.1371/journal.pone.0120936
30. Buggy, J. J., Sideris, M. L., Mak, P., Lorimer, D. D., McIntosh, B., & Clark, J. M. (2000). Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochemical Journal*, 350, 199-205. doi: Doi 10.1042/0264-6021:3500199
31. Calle, E. E., & Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev cancer*, 4(8), 579-591. doi: 10.1038/nrc1408
32. Carey, L. A., Dees, E. C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D. T., Collichio, F., . . . Perou, C. M. (2007). The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clinical Cancer Research*, 13(8), 2329-2334. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1109
33. Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., . . . Millikan, R. C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 295(21), 2492-2502. doi: 10.1001/jama.295.21.2492
34. Cavallaro, U., & Christofori, G. (2001). Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1552(1), 39-45. doi: 10.1016/s0304-419x(01)00038-5
35. Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva, C. (2017). Información estadística. Retrieved 14 November 2017, from [http://cneqsr.salud.gob.mx/contenidos/Programas\\_de\\_Accion/CancerdeLaMujer/InfEstad.html](http://cneqsr.salud.gob.mx/contenidos/Programas_de_Accion/CancerdeLaMujer/InfEstad.html)
36. Claude-Taupin, A., Boyer-Guittaut, M., Delage-Mourroux, R., & Hervouet, E. (2015). Use of epigenetic modulators as a powerful adjuvant for breast cancer therapies. *Methods Mol Biol*, 1238, 487-509. doi: 10.1007/978-1-4939-1804-1\_25
37. Correa-Basurto, A. M., Romero-Castro, A., Correa-Basurto, J., Hernandez-Rodriguez, M., Soriano-Ursua, M. A., Garcia-Machorro, J., . . . Mendieta-Wejebe, J. E. (2019). Pharmacokinetics and tissue distribution of N-(2-hydroxyphenyl)-2-propylpentanamide in Wistar Rats and its binding properties to human serum albumin. *J Pharm Biomed Anal*, 162, 130-139. doi: 10.1016/j.jpba.2018.09.010
38. Chakrabarti, A., Oehme, I., Witt, O., Oliveira, G., Sippl, W., Romier, C., . . . Jung, M. (2015). HDAC8: a multifaceted target for therapeutic interventions. *Trends Pharmacol Sci*, 36(7), 481-492. doi: 10.1016/j.tips.2015.04.013
39. Chateauvieux, S., Morceau, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2010). Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol*, 2010. doi: 10.1155/2010/479364

40. Cheng, Y. C., Lin, H., Huang, M. J., Chow, J. M., Lin, S., & Liu, H. E. (2007). Downregulation of c-Myc is critical for valproic acid-induced growth arrest and myeloid differentiation of acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 31(10), 1403-1411. doi: 10.1016/j.leukres.2007.03.012
41. Choi, H. S., Song, J. H., Kim, I. J., Joo, S. Y., Eom, G. H., Kim, I., . . . Bae, E. H. (2018). Histone deacetylase inhibitor, CG200745 attenuates renal fibrosis in obstructive kidney disease. *Sci Rep*, 8(1), 11546. doi: 10.1038/s41598-018-30008-5
42. Dawson, M. A., Kouzarides, T., & Huntly, B. J. (2012). Targeting epigenetic readers in cancer. *N Engl J Med*, 367(7), 647-657. doi: 10.1056/NEJMra1112635
43. de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., & van Kuilenburg, A. B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal*, 370(Pt 3), 737-749. doi: 10.1042/BJ20021321
44. De Souza, C., & Chatterji, B. P. (2015). HDAC Inhibitors as Novel Anti-Cancer Therapeutics. *Recent Patents On Anti-Cancer Drug Discovery*, 10(2), 145-162.
45. Deardorff, M. A., Bando, M., Nakato, R., Watrin, E., Itoh, T., Minamino, M., . . . Shirahige, K. (2012). HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. *Nature*, 489(7415), 313-317. doi: 10.1038/nature11316
46. Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., . . . Narod, S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13(15 Pt 1), 4429-4434. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-3045
47. Dogu, G. G., Ozkan, M., Ozturk, F., Dikilitas, M., Er, O., & Ozturk, A. (2010). Triple-negative breast cancer: immunohistochemical correlation with basaloid markers and prognostic value of survivin. *Med Oncol*, 27(1), 34-39. doi: 10.1007/s12032-009-9166-3
48. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., & Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990), 457-463. doi: 10.1038/nature02625
49. Eiseler, T., Doppler, H., Yan, I. K., Kitatani, K., Mizuno, K., & Storz, P. (2009). Protein kinase D1 regulates cofilin-mediated F-actin reorganization and cell motility through slingshot. *Nat Cell Biol*, 11(5), 545-556. doi: 10.1038/ncb1861
50. Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., . . . Pavletich, N. P. (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*, 401(6749), 188-193.
51. Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M. J., Guenther, M. G., Lazar, M. A., Voelter, W., & Verdin, E. (2002). Enzymatic Activity Associated with Class II HDACs Is Dependent on a Multiprotein Complex Containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Molecular Cell*, 9(1), 45-57. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00429-4

52. Foulkes, W. D., Stefansson, I. M., Chappuis, P. O., Begin, L. R., Goffin, J. R., Wong, N., . . . Akslen, L. A. (2003). Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, *95*(19), 1482-1485.
53. Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., . . . Esteller, M. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics*, *37*(4), 391-400. doi: 10.1038/ng1531
54. Freed-Pastor, W. A., & Prives, C. (2012). Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev*, *26*(12), 1268-1286. doi: 10.1101/gad.190678.112
55. Galasinski, S. C., Resing, K. A., Goodrich, J. A., & Ahn, N. G. (2002). Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(22), 19618-19626. doi: 10.1074/jbc.M201174200
56. Gao, S. M., Chen, C. Q., Wang, L. Y., Hong, L. L., Wu, J. B., Dong, P. H., & Yu, F. J. (2013). Histone deacetylases inhibitor sodium butyrate inhibits JAK2/STAT signaling through upregulation of SOCS1 and SOCS3 mediated by HDAC8 inhibition in myeloproliferative neoplasms. *Experimental Hematology*, *41*(3), 261-270. doi: 10.1016/j.exphem.2012.10.012
57. Geutjes, E. J., Bajpe, P. K., & Bernards, R. (2012). Targeting the epigenome for treatment of cancer. *Oncogene*, *31*(34), 3827-3844. doi: 10.1038/onc.2011.552
58. Goodwin, C. M., Rossanese, O. W., Olejniczak, E. T., & Fesik, S. W. (2015). Myeloid cell leukemia-1 is an important apoptotic survival factor in triple-negative breast cancer. *Cell Death Differ*, *22*(12), 2098-2106. doi: 10.1038/cdd.2015.73
59. Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., . . . Heinzl, T. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo Journal*, *20*(24), 6969-6978. doi: 10.1093/emboj/20.24.6969
60. Gregoret, I. V., Lee, Y. M., & Goodson, H. V. (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: Functional implications of phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Biology*, *338*(1), 17-31. doi: 10.1016/j.jmb.2004.02.006
61. Hebbes, T. R., Thorne, A. W., & Cranerobinson, C. (1988). A Direct Link between Core Histone Acetylation and Transcriptionally Active Chromatin. *Embo Journal*, *7*(5), 1395-1402.
62. Higuchi, T., Nakayama, T., Arai, T., Nishio, K., & Yoshie, O. (2013). SOX4 is a direct target gene of FRA-2 and induces expression of HDAC8 in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, *121*(18), 3640-3649. doi: 10.1182/blood-2012-07-441022
63. Hodges-Gallagher, L., Valentine, C. D., Bader, S. E., & Kushner, P. J. (2007). Inhibition of histone deacetylase enhances the anti-proliferative action of antiestrogens on breast cancer cells and blocks tamoxifen-induced proliferation of uterine cells. *Breast cancer res treat*, *105*(3), 297-309. doi: 10.1007/s10549-006-9459-6

64. Holen, I., Speirs, V., Morrissey, B., & Blyth, K. (2017). In vivo models in breast cancer research: progress, challenges and future directions. *Dis Model Mech*, 10(4), 359-371. doi: 10.1242/dmm.028274
65. Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, 13(4), 215. doi: 10.1186/bcr2889
66. Hu, E., Chen, Z. X., Fredrickson, T., Zhu, Y., Kirkpatrick, R., Zhang, G. F., . . . Winkler, J. (2000). Cloning and characterization of a novel human. Class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(20), 15254-15264. doi: DOI 10.1074/jbc.M908988199
67. Hu, E., Dul, E., Sung, C. M., Chen, Z., Kirkpatrick, R., Zhang, G. F., . . . Jaye, M. (2003). Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J Pharmacol Exp Ther*, 307(2), 720-728. doi: 10.1124/jpet.103.055541
68. Hyun-Jung, K., & Suk-Chul, B. (2011). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *American Journal Of Translational Research*, 3(2), 166-179.
69. Iacomino, G., Medici, M. C., & Russo, G. L. (2008). Valproic acid sensitizes K562 erythroleukemia cells to TRAIL/Apo2L-induced apoptosis. *Anticancer Res*, 28(2A), 855-864.
70. Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293(5532), 1074-1080. doi: DOI 10.1126/science.1063127
71. Johnstone, R. W. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 1(4), 287-299. doi: 10.1038/nrd772
72. Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics*, 3(6), 415-428. doi: 10.1038/nrg816
73. Jones, P. A., & Martienssen, R. (2005). A blueprint for a human epigenome project: the AACR human epigenome workshop. *Cancer Research*, 65(24), 11241-11246. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3865
74. Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., . . . Wolffe, A. P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics*, 19(2), 187-191. doi: 10.1038/561
75. Kabat, G. C., Kim, M., Phipps, A. I., Li, C. I., Messina, C. R., Wactawski-Wende, J., . . . Rohan, T. E. (2011). Smoking and alcohol consumption in relation to risk of triple-negative breast cancer in a cohort of postmenopausal women. *Cancer Causes control*, 22(5), 775-783. doi: 10.1007/s10552-011-9750-7
76. Khan, N., Jeffers, M., Kumar, S., Hackett, C., Boldog, F., Khramtsov, N., . . . Sehested, M. (2008). Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochemical Journal*, 409(2), 581-589. doi: 10.1042/BJ20070779

77. Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693-705. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005
78. Krennhrubec, K., Marshall, B. L., Hedglin, M., Verdin, E., & Ulrich, S. M. (2007). Design and evaluation of 'Linkerless' hydroxamic acids as selective HDAC8 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 17(10), 2874-2878. doi: 10.1016/j.bmcl.2007.02.064
79. Lagneaux, L., Gillet, N., Stamatopoulos, B., Delforge, A., Dejeneffe, M., Massy, M., . . . Bron, D. (2007). Valproic acid induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells through activation of the death receptor pathway and potentiates TRAIL response. *Experimental Hematology*, 35(10), 1527-1537. doi: 10.1016/j.exphem.2007.06.014
80. Lara-Medina, F., Perez-Sanchez, V., Saavedra-Perez, D., Blake-Cerda, M., Arce, C., Motola-Kuba, D., . . . Arrieta, O. (2011). Triple-negative breast cancer in Hispanic patients: high prevalence, poor prognosis, and association with menopausal status, body mass index, and parity. *Cancer*, 117(16), 3658-3669. doi: 10.1002/cncr.25961
81. Lee, H., Sengupta, N., Villagra, A., Rezai-Zadeh, N., & Seto, E. (2006). Histone deacetylase 8 safeguards the human ever-shorter telomeres 1B (hEST1B) protein from ubiquitin-mediated degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 26(14), 5259-5269. doi: 10.1128/Mcb.01971-05
82. Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*, 121(7), 2750-2767. doi: 10.1172/JCI45014
83. Lehmann, M., Hoffmann, M. J., Koch, A., Ulrich, S. M., Schulz, W. A., & Niegisch, G. (2014). Histone deacetylase 8 is deregulated in urothelial cancer but not a target for efficient treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, 33(1), 59. doi: 10.1186/s13046-014-0059-8
84. Li, J., Chen, S., Cleary, R. A., Wang, R. P., Gannon, O. J., Seto, E., & Tang, D. D. (2014). Histone deacetylase 8 regulates cortactin deacetylation and contraction in smooth muscle tissues. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 307(3), C288-C295. doi: 10.1152/ajpcell.00102.2014
85. Liu, J. C., Voisin, V., Wang, S., Wang, D. Y., Jones, R. A., Datti, A., . . . Zacksenhaus, E. (2014). Combined deletion of Pten and p53 in mammary epithelium accelerates triple-negative breast cancer with dependency on eEF2K. *EMBO Mol Med*, 6(12), 1542-1560. doi: 10.15252/emmm.201404402
86. Livasy, C. A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M. S., Olopade, O. I., Moore, D. T., & Perou, C. M. (2006). Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*, 19(2), 264-271. doi: 10.1038/modpathol.3800528
87. Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389, 251-260. doi: 10.1038/38444

- 88.** Luo, T., Chen, B., & Wang, X. (2015). 4-PBA prevents pressure overload-induced myocardial hypertrophy and interstitial fibrosis by attenuating endoplasmic reticulum stress. *Chem Biol Interact*, *242*, 99-106. doi: 10.1016/j.cbi.2015.09.025
- 89.** Ma, X.-j., Wang, Y.-s., Gu, W.-p., & Zhao, X. (2017). The role and possible molecular mechanism of valproic acid in the growth of MCF-7 breast cancer cells. *Croatian Medical Journal*, *58*(5), 349-357. doi: 10.3325/cmj.2017.58.349
- 90.** Marks, P. A. (2007). Discovery and development of SAHA as an anticancer agent. *Oncogene*, *26*(9), 1351-1356. doi: 10.1038/sj.onc.1210204
- 91.** Márquez, M., Lacruz, J. C., & Borges, L. F. (2012). Sobrevida en pacientes con cáncer de mama triple negativo. *Rev Obstet Ginecol Venez*, *72*(3), 152-160.
- 92.** Miller, T. A., Witter, D. J., & Belvedere, S. (2003). Histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem*, *46*(24), 5097-5116. doi: 10.1021/jm0303094
- 93.** Minucci, S., Nervi, C., Lo Coco, F., & Pelicci, P. G. (2001). Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? *Oncogene*, *20*(24), 3110-3115. doi: 10.1038/sj.onc.1204336
- 94.** Minucci, S., & Pelicci, P. G. (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev cancer*, *6*(1), 38-51. doi: 10.1038/nrc1779
- 95.** Mitrus, I., Bryndza, E., Sochanik, A., & Szala, S. (2012). Evolving models of tumor origin and progression. *Tumor Biol*, *33*(4), 911-917. doi: 10.1007/s13277-012-0389-0
- 96.** Mongan, N. P., & Gudas, L. J. (2005). Valproic acid, in combination with all-trans retinoic acid and 5-aza-2'-deoxycytidine, restores expression of silenced RARbeta2 in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*, *4*(3), 477-486. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-04-0079
- 97.** National Comprehensive Cancer Network, N. (2018). NCCN clinical practice guidelines in oncology: breast cancer. Retrieved april 17, 2018, 2018, from [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines.asp](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp)
- 98.** National Institutes of Health, N. (2016). Instituto Nacional del Cáncer. 2018, from <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/neoadjuvant-therapy>
- 99.** Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., . . . Gray, J. W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, *10*(6), 515-527. doi: 10.1016/j.ccr.2006.10.008
- 100.** Ng, Z. X., Ong, M. S., Jegadeesan, T., Deng, S., & Yap, C. T. (2017). Breast Cancer: Exploring the Facts and Holistic Needs during and beyond Treatment. *Healthcare*, *5*(2). doi: UNSP 2610.3390/healthcare5020026
- 101.** Nian, H., Bisson, W. H., Dashwood, W. M., Pinto, J. T., & Dashwood, R. H. (2009). Alpha-keto acid metabolites of organoselenium compounds inhibit histone deacetylase

activity in human colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 30(8), 1416-1423. doi: 10.1093/carcin/bgp147

**102.** Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., . . . Perou, C. M. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10(16), 5367-5374. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0220

**103.** Oakman, C., Viale, G., & Di Leo, A. (2010). Management of triple negative breast cancer. *Breast*, 19(5), 312-321. doi: 10.1016/j.breast.2010.03.026

**104.** Oehme, I., Deubzer, H. E., Lodrini, M., Milde, T., & Witt, O. (2009). Targeting of HDAC8 and investigational inhibitors in neuroblastoma. *Expert Opin Investig Drugs*, 18(11), 1605-1617. doi: 10.1517/14728220903241658

**105.** Olsen, C. M., Meussen-Elholm, E. T., Roste, L. S., & Tauboll, E. (2004). Antiepileptic drugs inhibit cell growth in the human breast cancer cell line MCF7. *Mol Cell Endocrinol*, 213(2), 173-179. doi: 10.1016/j.mce.2003.10.032

**106.** Olson, D. E., Udeshi, N. D., Wolfson, N. A., Pitcairn, C. A., Sullivan, E. D., Jaffe, J. D., . . . Holson, E. B. (2014). An Unbiased Approach To Identify Endogenous Substrates of "Histone" Deacetylase 8. *Acs Chemical Biology*, 9(10), 2210-2216. doi: 10.1021/cb500492r

**107.** Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., & Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, 245(3), 194-205. doi: 10.1016/j.tox.2007.11.021

**108.** Park, S. Y., Jun, J. A., Jeong, K. J., Heo, H. J., Sohn, J. S., Lee, H. Y., . . . Kang, J. (2011). Histone deacetylases 1, 6 and 8 are critical for invasion in breast cancer. *Oncol Rep*, 25(6), 1677-1681. doi: 10.3892/or.2011.1236

**109.** Peart, M. J., Smyth, G. K., van Laar, R. K., Bowtell, D. D., Richon, V. M., Marks, P. A., . . . Johnstone, R. W. (2005). Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(10), 3697-3702. doi: 10.1073/pnas.0500369102

**110.** Perou, C. M. (2010). Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*, 15 Suppl 5, 39-48. doi: 10.1634/theoncologist.2010-S5-39

**111.** Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., . . . Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-752. doi: 10.1038/35021093

**112.** Phiel, C. J., Zhang, F., Huang, E. Y., Guenther, M. G., Lazar, M. A., & Klein, P. S. (2001). Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36734-36741. doi: 10.1074/jbc.M101287200

**113.** Phillips, A., Bullock, T., & Plant, N. (2003). Sodium valproate induces apoptosis in the rat hepatoma cell line, FaO. *Toxicology*, 192(2-3), 219-227.

114. Phipps, A. I., Chlebowski, R. T., Prentice, R., McTiernan, A., Wactawski-Wende, J., Kuller, L. H., . . . Li, C. I. (2011). Reproductive history and oral contraceptive use in relation to risk of triple-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 103(6), 470-477. doi: 10.1093/jnci/djr030
115. Pierobon, M., & Frankenfeld, C. L. (2013). Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. *Breast cancer res treat*, 137(1), 307-314. doi: 10.1007/s10549-012-2339-3
116. Prat, A., Adamo, B., Cheang, M. C., Anders, C. K., Carey, L. A., & Perou, C. M. (2013). Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist*, 18(2), 123-133. doi: 10.1634/theoncologist.2012-0397
117. Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., . . . Perou, C. M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12(5). doi: Artn R6810.1186/Bcr2635
118. Prestegui-Martel, B., Bermudez-Lugo, J. A., Chavez-Blanco, A., Duenas-Gonzalez, A., Garcia-Sanchez, J. R., Perez-Gonzalez, O. A., . . . Correa-Basurto, J. (2016). N-(2-hydroxyphenyl)-2-propylpentanamide, a valproic acid aryl derivative designed in silico with improved anti-proliferative activity in HeLa, rhabdomyosarcoma and breast cancer cells. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31(sup3), 140-149. doi: 10.1080/14756366.2016.1210138
119. Qian, Y., Zhang, J., Jung, Y., & Chen, X. (2014). DEC1 Coordinates with HDAC8 to Differentially Regulate TAp73 and  $\Delta$ Np73 Expression. *Plos ONE*, 9(1), e84015. doi: 10.1371/journal.pone.0084015
120. Richon, V. M. (2006). Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor. *British Journal of Cancer*, 95(S1), S2-S6. doi: 10.1038/sj.bjc.6603463
121. Richon, V. M., Emiliani, S., Verdin, E., Webb, Y., Breslow, R., Rifkind, R. A., & Marks, P. A. (1998). A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), 3003-3007.
122. Schuchmann, M., Schulze-Bergkamen, H., Fleischer, B., Schattenberg, J. M., Siebler, J., Weinmann, A., . . . Galle, P. R. (2006). Histone deacetylase inhibition by valproic acid down-regulates c-FLIP/CASH and sensitizes hepatoma cells towards CD95- and TRAIL receptor-mediated apoptosis and chemotherapy. *Oncol Rep*, 15(1), 227-230.
123. Schuetze, K. B., Stratton, M. S., Blakeslee, W. W., Wempe, M. F., Wagner, F. F., Holson, E. B., . . . McKinsey, T. A. (2017). Overlapping and Divergent Actions of Structurally Distinct Histone Deacetylase Inhibitors in Cardiac Fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther*, 361(1), 140-150. doi: 10.1124/jpet.116.237701
124. Segal, E., & Widom, J. (2009). What controls nucleosome positions? *Trends Genet*, 25(8), 335-343. doi: 10.1016/j.tig.2009.06.002

125. Sethi, D., Sen, R., Parshad, S., Khetarpal, S., Garg, M., & Sen, J. (2013). Histopathologic changes following neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Indian J Cancer*, 50(1), 58-64. doi: 10.4103/0019-509X.112301
126. Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27-36. doi: 10.1093/carcin/bgp220
127. Stearns, V., Zhou, Q., & Davidson, N. E. (2007). Epigenetic regulation as a new target for breast cancer therapy. *Cancer Invest*, 25(8), 659-665. doi: 10.1080/07357900701719234
128. Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41-45. doi: Doi 10.1038/47412
129. Tian, Y., Wong, V. W., Wong, G. L., Yang, W., Sun, H., Shen, J., . . . Chan, H. L. (2015). Histone Deacetylase HDAC8 Promotes Insulin Resistance and beta-Catenin Activation in NAFLD-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research*, 75(22), 4803-4816. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3786
130. Turner, N., Moretti, E., Siclari, O., Migliaccio, I., Santarpia, L., D'Incalci, M., . . . Di Leo, A. (2013). Targeting triple negative breast cancer: is p53 the answer? *Cancer Treat Rev*, 39(5), 541-550. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.12.001
131. Uchino, S. (2010). Creatinine. *Curr Opin Crit Care*, 16(6), 562-567. doi: 10.1097/MCC.0b013e32833ea7f3
132. Ungerstedt, J. S., Sowa, Y., Xu, W. S., Shao, Y., Dokmanovic, M., Perez, G., . . . Marks, P. A. (2005). Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(3), 673-678. doi: 10.1073/pnas.0408732102
133. Vallejos, C. S., Gomez, H. L., Cruz, W. R., Pinto, J. A., Dyer, R. R., Velarde, R., . . . Vigil, C. E. (2010). Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. *Clin Breast Cancer*, 10(4), 294-300. doi: 10.3816/CBC.2010.n.038
134. Van den Wyngaert, I., de Vries, W., Kremer, A., Neefs, J. M., Verhasselt, P., Luyten, W. H. M. L., & Kass, S. U. (2000). Cloning and characterization of human histone deacetylase 8. *Febs Letters*, 478(1-2), 77-83. doi: Doi 10.1016/S0014-5793(00)01813-5
135. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033. doi: 10.1126/science.1160809
136. Wade, P. A. (2001). Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Human Molecular Genetics*, 10(7), 693-698. doi: Doi 10.1093/Hmg/10.7.693

- 137.** Walerych, D., Napoli, M., Collavin, L., & Del Sal, G. (2012). The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis*, *33*(11), 2007-2017. doi: 10.1093/carcin/bgs232
- 138.** Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J. A., Schones, D. E., Barski, A., Cuddapah, S., . . . Zhao, K. (2008). Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nature Genetics*, *40*(7), 897-903. doi: 10.1038/ng.154
- 139.** Wang, Z. T., Chen, Z. J., Jiang, G. M., Wu, Y. M., Liu, T., Yi, Y. M., . . . Wang, H. S. (2016). Histone deacetylase inhibitors suppress mutant p53 transcription via HDAC8/YY1 signals in triple negative breast cancer cells. *Cell Signal*, *28*(5), 506-515. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.02.006
- 140.** Weichert, W. (2009). HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett*, *280*(2), 168-176. doi: 10.1016/j.canlet.2008.10.047
- 141.** Weisenberger, D. J., D Siegmund, K., Campan, M., Young, J., Long, T. I., Faasse, M. A., . . . Laird, P. W. (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature Genetics*, *38*(7), 787-793. doi: 10.1038/ng1834
- 142.** Weitzel, J. N., Blazer, K. R., MacDonald, D. J., Culver, J. O., & Offit, K. (2011). Genetics, Genomics, and Cancer Risk Assessment State of the Art and Future Directions in the Era of Personalized Medicine. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, *61*(5), 327-359. doi: 10.3322/caac.20128
- 143.** West, A. C., & Johnstone, R. W. (2014). New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *J Clin Invest*, *124*(1), 30-39. doi: 10.1172/JCI69738
- 144.** Wilson, B. J., Tremblay, A. M., Deblois, G., Sylvain-Drolet, G., & Giguere, V. (2010). An Acetylation Switch Modulates the Transcriptional Activity of Estrogen-Related Receptor alpha. *Molecular Endocrinology*, *24*(7), 1349-1358. doi: 10.1210/me.2009-0441
- 145.** Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T., & Oehme, I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett*, *277*(1), 8-21. doi: 10.1016/j.canlet.2008.08.016
- 146.** Xu, J., Reumers, J., Couceiro, J. R., De Smet, F., Gallardo, R., Rudyak, S., . . . Schymkowitz, J. (2011). Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol*, *7*(5), 285-295. doi: 10.1038/nchembio.546
- 147.** Yan, W., Liu, S., Xu, E., Zhang, J., Zhang, Y., Chen, X., & Chen, X. (2013). Histone deacetylase inhibitors suppress mutant p53 transcription via histone deacetylase 8. *Oncogene*, *32*(5), 599-609. doi: 10.1038/onc.2012.81
- 148.** Yang, I. V., & Schwartz, D. A. (2011). Epigenetic control of gene expression in the lung. *Am J Respir Crit Care Med*, *183*(10), 1295-1301. doi: 10.1164/rccm.201010-1579PP
- 149.** Yerushalmi, R., Woods, R., Ravdin, P. M., Hayes, M. M., & Gelmon, K. A. (2010). Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *The Lancet Oncology*, *11*(2), 174-183. doi: 10.1016/s1470-2045(09)70262-1

- 150.** Young, D. S. (1997). *Effects of preanalytical variables on clinical laboratory tests* (2 ed.). Washington (D.C.: AACC press.
- 151.** Zaharia, M., & Gomez, H. (2013). Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil diagnóstico y tratamiento. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 30(4), 649-656.
- 152.** Zhao, Q., Rank, G., Tan, Y. T., Li, H. T., Moritz, R. L., Simpson, R. J., . . . Jane, S. M. (2009). PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(3), 304-311. doi: 10.1038/nsmb.1568
- 153.** Ziauddin, M. F., Yeow, W. S., Maxhimer, J. B., Baras, A., Chua, A., Reddy, R. M., . . . Nguyen, D. M. (2006). Valproic acid, an antiepileptic drug with histone deacetylase inhibitory activity, potentiates the cytotoxic effect of Apo2L/TRAIL on cultured thoracic cancer cells through mitochondria-dependent caspase activation. *Neoplasia*, 8(6), 446-457. doi: 10.1593/neo.05823



**ANEXO 1**

Tabla 3. Registro semanal del peso corporal de los animales experimentales.

Control intacto							
Animal No.	12-jul-18	18-jul-18		24-jul-18		31-jul-18	
	Peso inicial	Semana 1	% diferencia de peso	Semana 2	% diferencia de peso	Semana 3	% diferencia de peso
41	17.4	18	3.4	17.1	-1.7	18.2	4.6
42	17.4	18.5	6.3	17.8	2.3	18.5	6.3
43	20.2	21.4	5.9	20.9	3.5	21.4	5.9
44	19.7	20.7	5.1	19.9	1.0	20.2	2.5
45	19.8	21	6.1	19.8	0.0	20.6	4.0
46	19.4	19.6	1.0	19.4	0.0	20.3	4.6
47	18.7	18.1	-3.2	18.1	-3.2	18.0	-3.7
<b>PROM. PESO SEMANAL (g)</b>	18.9	19.6		19.0		19.6	
<b>% PROM DIFERENCIA PESO</b>	NA	3.5		0.3		3.5	
Control alotrasplante							
Animal No.	05-jun-18	10-jul-18	18-jul-18		24-jul-18		
	Peso inicial	Semana 1	% diferencia de peso	Semana 2	% diferencia de peso	Semana 3	% diferencia de peso
31	18.8	17.3	-8.0	13.2	-29.8	10.2	-45.7
32	18.7	17.6	-5.9	14.4	-23.0	15.8	-15.5
33	18.4	17.2	-6.5	16.8	-8.7	17.7	-3.8
34	19.1	17.8	-6.8	16.8	-12.0	17.7	-7.3
35	18.7	17.6	-5.9	17	-9.1	17.7	-5.3
36	19.9	17.3	-13.1	16.1	-19.1	17	-14.6
37	18.5	17.3	-6.5	16.4	-11.4	16.8	-9.2
<b>PROM. PESO SEMANAL (g)</b>	18.9	17.4		15.8		16.1	
<b>% PROM DIFERENCIA PESO</b>	NA	-7.6		-16.2		-14.5	
Tratamiento 10 mg/kg							
Animal No.	03-jul-18	10-jul-18		18-jul-18		24-jul-18	
	Peso inicial	Semana 1	% diferencia de peso	Semana 2	% diferencia de peso	Semana 3	% diferencia de peso
1	21.3	20.8	-2.3	16.4	-23.0	NA	
2	19.2	18.7	-2.6	16.4	-14.6	16.5	-14.1
3	20.1	20.4	1.5	16.4	-18.4	NA	NA
4	20.2	18.6	-7.9	17.3	-14.4	NA	NA
5	20.6	20.9	1.5	15.1	-26.7	NA	NA
6	20.7	19.1	-7.7	17.2	-16.9	18.4	-11.1
7	21.1	20.7	-1.9	NA	NA	NA	NA
<b>PROM. DE PESO SEMANAL (g)</b>	20.5	19.9		16.5		17.5	
<b>% PROM. DIFERENCIA PESO</b>	NA	-2.8		-19.5		-14.7	

Continuación ANEXO 1.

Tratamiento 30 mg/kg							
Animal No.	04-jul-18	10-jul-18		18-jul-18		24-jul-18	
	Peso inicial	Semana 1	% diferencia de peso	Semana 2	% diferencia de peso	Semana 3	% diferencia de peso
11	20.0	19.2	-4.0	19.6	-2.0	19.5	-2.5
12	20.8	17.9	-13.9	18.3	-12.0	18.5	-11.1
13	21.4	19.2	-10.3	20.2	-5.6	20.8	-2.8
14	20.6	19.7	-4.4	17.2	-16.5	17	-17.5
15	21.1	19.6	-7.1	19.0	-10.0	20.3	-3.8
16	20.1	18.4	-8.5	18.8	-6.5	19.3	-4.0
17	20.7	18.4	-11.1	17.4	-15.9	17.8	-14.0
<b>PROM. PESO SEMANAL (g)</b>	20.7	18.9		18.6		19.0	
<b>% PROM DIFERENCIA PESO</b>	NA	-8.5		-9.8		-7.9	
Tratamiento 50 mg/kg							
Animal No.	05-jun-16	10-jul-18		18-jul-18		24-jul-18	
	Peso inicial	Semana 1	% diferencia de peso	Semana 2	% diferencia de peso	Semana 3	% diferencia de peso
21	21.2	19.4	-8.5	18.3	-13.7	19.6	-7.5
22	20.7	17.7	-14.5	17.8	-14.0	18.5	-10.6
23	22.8	20.0	-12.3	19.5	-14.5	19.1	-16.2
24	21.4	18.5	-13.6	19.9	-7.0	19.3	-9.8
25	20.0	19.4	-3.0	19.0	-5.0	19.0	-5.0
26	22.0	19.4	-11.8	19.2	-12.7	19.4	-11.8
27	21.0	17.5	-16.7	18.3	-12.9	18.5	-11.9
<b>PROM. PESO SEMANAL (g)</b>	21.3	18.8		18.9		19.1	
<b>% PROM DIFERENCIA PESO</b>	NA	-11.5		-11.5		-10.5	
Control 50mg/kg							
Animal No.	31-jul-18	31-jul-18		08-ago-18		16-ago-18	
	Peso inicial	Semana 1	% diferencia de peso	Semana 2	% diferencia de peso	Semana 3	% diferencia de peso
51	19.9	19.9	0.0	20.7	4.0	19.3	-3.0
52	22.0	22.0	0.0	22	0.0	21.6	
53	17.9	17.9	0.0	17.6	-1.7	17.4	-2.8
54	18.3	18.3	0.0	17.6	-3.8	17.2	-6.0
55	19.0	19.0	0.0	18.3	-3.7	17.4	-8.4
56	15.5	15.5	0.0	15.1	-2.6	14.2	-8.4
57	16.5	16.5	0.0	16.4	-0.6	16.4	-0.6
<b>PROM. PESO SEMANAL (g)</b>	18.4	18.4		18.2		17.6	
<b>% PROM DIFERENCIA PESO</b>	NA	0.0		-1.1		-4.3	

**ANEXO 2.**

Tabla 4. Resultados de las pruebas bioquímicas.

PARAMETROS	Ctrl intacto							Ctrl alotrasplante			
	Rn 41	Rn42	Rn43	Rn44	Rn45	Rn46	Rn47	Rn32	Rn33	Rn34	Rn35
GLUCOSA (mg/dL)	115.5	162.3	200.5	178.5	158.5	157.7	189.7	54.7	79.4	98.1	128.8
PROT. TOTALES (g/dL)	6	6.3	6.1	6.2	5.9	7	5.3	5.4	4.5	5	5.1
ALBUMINA (g/dL)	4.4	4.3	4.7	5	4.7	4.1	4.2	4.2	3.5	3.8	4.3
%ALBÚMINA	73.3	68.3	77.0	80.6	79.7	58.6	79.2	77.8	77.8	76.0	84.3
CREATININA (mg/dL)	1	0.4	0.8	0.8	0.2	1	0.6	0.5	0.8	0.4	1
ALT (GPT) (U/L)	11.5	8.2	7	1.2	4.6	20.5	20.7	NR	18.8	9.4	NR
AST (GOT) (U/L)	8316	251	300	282.2	115.6	727.5	303.3	NR	284.4	108.8	NR
UREA (mg/dL)	182	119.4	100.6	120.2	143	296.5	144.6	413	192	124.2	281
PARAMETROS	10mg/Kg	30mg/kg					50mg/kg				
	Rn2	Rn11	Rn12	Rn13	Rn15	Rn16	Rn27				
GLUCOSA (mg/dL)	244.3	207.2	145.8	141.6	188.0	168.7	37.1				
PROT. TOTALES (g/dL)	4.7	6.0	6.0	5.3	4.9	4.3	5.4				
ALBÚMINA (g/dL)	3.2	4.2	4.1	3.5	3.7	3.7	3.6				
%ALBÚMINA	68.1	70.0	68.3	66.0	75.5	86.0	66.7				
CREATININA (mg/dL)	0.8	0.4	0.4	0.6	0.5	0.5	NR				
ALT (U/L)	4.1	6.8	9.2	2.3	2.9	5.2	NR				
AST (U/L)	46.7	1040.0	191.2	30.0	38.9	16.7	NR				
UREA (mg/dL)	99.5	144.8	102.0	72.2	60.8	67.1	153.6				
PARAMETROS	Control 50mg/kg										
	Rn51	Rn52	Rn53	Rn54	Rn55	Rn56	Rn57				
GLUCOSA (mg/dL)	208.9	519.0	229.4	167.9	229.2	117.4	185.4				
PROT. TOTALES (g/dL)	6.3	7.8	6.1	5.6	5.8	6.2	5.5				
ALBÚMINA (g/dL)	4.3	4.2	3.8	3.6	3.7	3.8	3.4				
%ALBÚMINA	68.3	53.8	62.3	64.3	63.8	61.3	61.8				
CREATININA (mg/dL)	1.5	1.2	0.6	0.9	0.9	0.9	0.9				
ALT (U/L)	24.3	75.0	69.9	48.9	36.6	24.3	48.9				
AST (U/L)	573.3	336.6	33.3	303.3	33.3	36.6	60.0				
UREA (mg/dL)	99.0	85.2	88.5	83.4	98.7	77.4	97.5				

**ANEXO 3.**

**Tabla 5. Mediciones del porcentaje de fibrosis por campo.**

Ctrl alotrasplante			10mg/kg			30mg/kg			50mg/kg		
Área total	Área fibrosis	% fibrosis	Área total	Área fibrosis	% fibrosis	Área total	Área fibrosis	% fibrosis	Área total	Área fibrosis	% fibrosis
5038848	12587	0.2497992	5038848	56080	1.1129528	5038848	27227	0.5403418	5038848	8655	0.1717655
	35298	0.7005173		45160	0.8962366		83659	1.6602803		15693	0.3114402
	32591	0.6467947		26541	0.5267275		3032	0.0601725		797	0.0158171
	92659	1.8388925		70974	1.4085362		63220	1.2546519		4035	0.0800778
	114235	2.267086		10538	0.2091351		2803	0.0556278		1273	0.0252637
	12436	0.2468024		3904	0.077478		3586	0.0711671		1557	0.0308999
	24609	0.4883854		4877	0.096788		1912	0.0379452		2830	0.0561636