(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 369 240**

(51) Int. CI.:
A61K 48/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06254532 .2**
(96) Fecha de presentación: **31.08.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1949916**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

(54) Título: **AGENTES DE REMODELACIÓN DE CROMATINA PARA AUMENTAR LA EXPRESIÓN DE PDX-1 Y PROMOVER LA DIFERENCIACIÓN CELULAR.**

(30) Prioridad:
31.08.2005 US 713072 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.11.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.11.2011

(73) Titular/es:
LIFESCAN, INC.
1000 GIBRALTAR DRIVE
MILPITAS, CA 95035-6312, US

(72) Inventor/es:
Davis, Janet E. y
Fung, Ramie

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agentes de remodelación de cromatina para aumentar la expresión de PDX-1 y promover la diferenciación celular.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para inducir la diferenciación de células. En particular, la presente invención se refiere a procedimientos *in vitro* que inducen a las células a diferenciarse en un linaje pancreático o en una célula productora de hormonas pancreáticas o en un linaje de células β. La presente invención también proporciona procedimientos y composiciones para usar dichas células en el tratamiento terapéutico de diabetes.

Antecedentes

La pérdida de la función orgánica puede ser el resultado de defectos congénitos, lesión o enfermedad. La diabetes mellitus o diabetes es un ejemplo de una enfermedad que ocasiona pérdida de función orgánica. La mayoría de los casos de diabetes se incluyen en dos tipos clínicos: Tipo 1, también conocido como diabetes de aparición juvenil o diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI); y Tipo 2, también conocido como diabetes de aparición en adultos. Un procedimiento de tratamiento común de la diabetes de Tipo 1 implica la administración exógena de insulina, típicamente por inyección con una jeringa o una bomba. Este procedimiento no normaliza por completo los niveles de glucemia y a menudo se asocia con un riesgo aumentado de hipoglucemia. Si la función del páncreas pudiese restaurarse o rejuvenecerse mediante transplante o mediante terapias basadas en células, podría conseguirse un control glucémico más eficaz.

Existen muchas terapias de transplante actualmente usadas para tratar la diabetes: Un tratamiento de este tipo implica el transplante de islotes de Langerhans aislados en el paciente diabético. Un reto para el transplante de islotes en seres humanos ha sido la ausencia de suficiente cantidad de islotes para tratar la gran cantidad de pacientes diabéticos.

Las fuentes alternativas de material celular para transplante pueden incluir, por ejemplo, células derivadas de otros tejidos tales como, por ejemplo, vellosidades coriónicas, líquido amniótico o médula ósea. Estos tejidos distintos pueden ser tejidos fetales o embriónicos. Además, las células endocrinas de los islotes de Langerhans, incluyendo las células β, se renuevan constantemente mediante procesos de apoptosis y proliferación de nuevas células de islotes (neogénesis). Así pues, se piensa que el páncreas es una fuente de células no diferenciadas que pueden diferenciarse en células productoras de hormonas pancreáticas.

Sin embargo, un reto de estas estrategias celulares ha sido la capacidad de estas células para diferenciarse en un linaje de células β o en una célula secretora de hormonas pancreáticas. Dicha diferenciación implica cambios en la expresión de genes.

Mecanismo para la diferenciación celular: La expresión de genes es el proceso combinado de la transcripción de un gen en ARNm, el procesamiento de este ARNm y su traducción en proteínas (para genes que codifican proteínas). Una comparación de los patrones de expresión de genes de células del páncreas, que secretan enzimas y hormonas digestivas, y del hígado, el lugar de transporte de lípidos y transducción de energía, revela diferencias notables en genes que se expresan altamente. Esta diferencia es coherente con las funciones fisiológicas de estos tejidos. Por ejemplo, la expresión del gen de insulina en un mamífero está limitada a las células β del páncreas a través de mecanismos de control mediados en parte por factores de transcripción específicos, incluyendo Mafa y NeuroD. En otras células del cuerpo, las hormonas pancreáticas, tales como, por ejemplo, insulina, así como los otros genes específicos de peptidasa son transcripcionalmente silenciosos.

En el núcleo de las células de animales o plantas el ADN nunca se encuentra como una molécula desnuda. El ADN está siempre empaquetado en cromatina y se encuentra en asociación con proteínas y otras moléculas. Las moléculas incluyen, por ejemplo, proteínas histonas (solubles en soluciones ácidas), proteínas del GAM (Grupo de Alta Movilidad, solubles en solución salina neutra), proteínas residuales (solubles en soluciones de urea concentradas), fosfoproteínas (solubles en soluciones básicas), especies de ARN (solubles en soluciones de fenol acuosas) y especies de lípidos (solubles en soluciones de metanol-cloroformo). La cromatina es esa parte del núcleo de la célula que contiene todo el ADN del núcleo en las células de animales o plantas.

La modificación covalente de histonas se ha implicado en la regulación de expresión de genes. La acetilación reversible de proteínas histonas se combina con la metilación de ADN y otras modificaciones para generar un código epigenético de estructura y función de cromatina modificada. Las modificaciones covalentes para histonas pueden incluir acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinización y sumoilación.

El estado de acetilación de histonas y otras proteínas se regula dinámicamente mediante las acciones opuestas de acetiltransferasas y desacetilasas. Las histonas hipoacetiladas promueven la condensación de la cromatina y están asociadas con locus transcripcionalmente silenciosos, en los que el acceso del ADN a factores de transcripción o al aparato transcripcional está limitado. Dichas modificaciones en la cromatina pueden desempeñar una función seminal en la diferenciación tisular determinando el complemento de genes expresados dentro de tipos de células

individuales.

La metilación del ADN en restos de citosina está asociada con silenciamiento génico. El tratamiento con agentes que modifican esta modificación secundaria del ADN para crear sitios desmetilados se correlaciona con transcripción y expresión activa de genes. El fármaco, 5-azacitidina, puede incorporarse al ADN en lugar de citidina. Como consecuencia, la posición 5' se bloquea, conduciendo a la creación y perpetuación de secuencias de ADN desmetiladas. Después del tratamiento con 5'-azacitidina, se han descrito cambios en el estado de diferenciación celular; por ejemplo, se ha inducido el desarrollo de miocitos a partir de precursores no miocíticos. También se ha observado que el fármaco activa genes en un cromosoma X silencioso.

Factores que controlan el desarrollo pancreático: La proteína homeodominio PDX-1 (gen-1 Homeobox Pancreático y Duodenal, conocida también como IDX-1, IPF-1, STF-1 o IUF-1) desempeña una función principal en la regulación del desarrollo y función de los islotes pancreáticos. La PDX-1 regula la transcripción de estos genes asociados con identidades de células β, incluyendo insulina, glucoquinasa, polipéptido amiloide de los islotes y transportador de glucosa de tipo 2 (TGLU2).

El documento US20050090465 pone de manifiesto que la expresión ectópica de PDX-1 en hígado y piel induce un fenotipo de células de islotes pancreáticos en células del hígado y de la piel y da como resultado la expresión, producción y procesamiento de hormonas pancreáticas.

El documento US20040002447 proporciona procedimientos para inducir la expresión del gen de insulina en células. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden las etapas de: (i) proporcionar una célula que exprese un polinucleótido PDX-1; y (ii) poner en contacto la célula con un inhibidor de histona desacetilasa, induciendo por lo tanto la expresión del gen insulina en la células.

Los procedimientos desvelados en los documentos US20050090465 y US20040002447 precisan la expresión ectópica de PDX-1 para inducir la expresión del gen de insulina en células. Por tanto, sigue existiendo una necesidad significativa de desarrollar procedimientos para generar células secretoras de hormonas pancreáticas a partir de una fuente de células abundante que no precise la expresión ectópica de PDX-1.

Sumario

La presente invención incluye procedimientos *in vitro* que promueven la diferenciación de células modificando la expresión de genes dentro de las células. En una realización, los genes pueden ser necesarios para la diferenciación de un tipo de célula deseado. Como alternativa, los genes pueden asociarse con la función de un tipo de célula deseado. En una realización, puede modificarse la expresión de genes necesarios para la diferenciación y la función de un tipo de célula deseado.

Las células que se diferencian pueden ser en sí mismas células totalmente diferenciadas de otro linaje o tipo de célula o pueden ser células progenitoras parcialmente diferenciadas o pueden ser células progenitoras no diferenciadas.

En una realización, la presente invención se refiere a procedimientos *in vitro* que provocan que una célula que normalmente no expresa PDX-1 se diferencie en una célula de linaje pancreático o en una célula productora de hormonas pancreáticas o en una célula del linaje de células β.

En una realización, la presente invención se refiere a procedimientos *in vitro* que provocan que una célula que ha perdido la expresión de PDX-1 se diferencie en una célula de linaje pancreático o en una célula productora de hormonas pancreáticas o en una célula de linaje de células β.

En una realización, la diferenciación de células puede promoverse poniendo en contacto las células con al menos un agente de remodelación de cromatina. Las células pueden ponerse en contacto con un solo tratamiento de al menos un agente de remodelación de cromatina. En una realización alternativa, las células pueden ponerse en contacto con tratamientos múltiples de al menos un agente de remodelación de cromatina. Los tratamientos múltiples pueden ser con el mismo agente o con un agente diferente.

En una realización el al menos un agente de remodelación de cromatina puede ser un inhibidor de la actividad de histona desacetilasa. El inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede seleccionarse del grupo que consiste en butiratos, ácidos hidroxámicos, péptidos cíclicos y benzamidas. En algunas realizaciones, el inhibidor de la actividad de histona desacetilasa puede seleccionarse del grupo que consiste en 4-fenilbutirato, butirato de sodio, tricostatina A, ácido suberoil anilido hidroxámico (SAHA), oxamflatina, trapoxina B, FR901228, apicidina, clamidocina, depudecina, escriptaida, depsipéptido y N- acetildinalina.

En una realización, la presente invención puede referirse a procedimientos *in vitro* que promueven la diferenciación de células en un linaje pancreático o en una célula productora de hormonas pancreáticas o en un linaje de células β.

En una realización, la diferenciación puede promoverse aumentando la expresión de al menos un gen relacionado con diferenciación. En una realización, el al menos un gen relacionado con diferenciación puede ser PDX-1. En una

realización alternativa, el al menos un gen relacionado con diferenciación puede ser Sox-17. En una realización alternativa, el al menos un gen relacionado con diferenciación puede ser HNF-3 beta.

En una realización, las células normalmente no expresan la proteína homeodominio PDX-1 y el tratamiento con el al menos un agente de remodelación de cromatina estimula la expresión de PDX-1. En otra realización, la expresión de PDX-1 puede restaurarse en células que han perdido la expresión de PDX-1 durante un cultivo *in vitro*.

En una realización, las células pueden ponerse en contacto con tratamientos múltiples de al menos un agente de remodelación de cromatina. Los tratamientos múltiples pueden estimular o aumentar la expresión de PDX-1. En una realización alternativa, el tratamiento inicial con el al menos un agente de remodelación de cromatina puede estimular o aumentar la expresión de PDX-1, y los tratamientos posteriores pueden estimular la expresión de hormonas pancreáticas. Los tratamientos múltiples pueden ser con el mismo agente o con un agente diferente.

En una realización alternativa, el tratamiento inicial con el al menos un agente de remodelación de cromatina puede estimular o aumentar la expresión de PDX-1, y los tratamientos posteriores con el al menos un agente de remodelación de cromatina pueden estimular la expresión de al menos otro gen relacionado con diferenciación.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra los efectos del tratamiento con un inhibidor de histona desacetilasa sobre la expresión de genes en células Panc-1 y Fibroblastos Neonatales. Los datos muestran el efecto del tratamiento con tricostatina A 2,5 μM y 5 μM sobre la expresión de glucagón (panel a), Sox-17 (panel b), Pdx-1 (panel c) y HNF-3 beta (panel d). Las células no tratadas se muestran como un control negativo para comparación. El procedimiento experimental se describe en el **Ejemplo 6.**

La **Figura 2** muestra cambios en la expresión de genes en células derivadas de líquido amniótico a lo largo del tiempo, después de la adición de tricostatina A 1,25 μM. Los datos muestran expresión relativa de insulina (panel a), Sox-17 (panel b), Pdx-1 (panel c) y HNF-3 beta (panel d) en comparación con un control no tratado. El procedimiento experimental se describe en el **Ejemplo 7.**

La **Figura 3** muestra cambios en la expresión de genes en células estromales derivadas de páncreas de pases tardíos, a lo largo del tiempo después de la adición de tricostatina A 2,5 μM. Los datos muestran expresión relativa de Sox-17 (panel a), HNF-3 beta y Pdx-1 (panel b) y glucagón (panel c) en comparación con un control no tratado. El procedimiento experimental se describe en el **Ejemplo 8.**

La **Figura 4** muestra los cambios en la expresión de genes en células derivadas de líquido amniótico a lo largo del tiempo, después de tratamiento crónico, continuo con tricostatina A. Los datos muestran expresión relativa de glucagón (panel a), HNF-3 beta (panel b), insulina (panel c), Pdx-1 (panel d) y sox-17 (panel e) en comparación con un control no tratado. El procedimiento experimental se describe en el **Ejemplo 9.**

La **Figura 5** muestra los cambios en la expresión de genes en células estromales derivadas páncreas de pases tardíos, a lo largo del tiempo, después del tratamiento crónico, continuo con tricostatina A. Los datos muestran expresión relativa de glucagón (panel a), HNF-3 beta (panel b), Pdx-1 (panel c) y sox-17 (panel d) en comparación con un control no tratado. El procedimiento experimental se describe en el **Ejemplo 10.**

La **Figura 6** muestra los efectos de una selección de inhibidores de HDAC sobre la viabilidad de una línea celular derivada de líquido amniótico a las 24 horas y 72 horas después de la adición. El procedimiento experimental se describe en el **Ejemplo 16.** Los compuestos, identificados por los números en el eje x, se añadieron a las células a una concentración de 5 μM.

La **Figura 7** muestra los efectos de una selección de inhibidores de HDAC sobre la viabilidad de una línea celular derivada de líquido amniótico a las 24 h y 72 h después de la adición. El procedimiento experimental se describe en el **Ejemplo 16.** Los compuestos, identificados por los números en el eje x, se añadieron a las células a una concentración de 5 μM.

La **Figura 8** muestra los efectos de una selección de inhibidores de HDAC sobre la viabilidad de una línea celular derivada de líquido amniótico. El procedimiento experimental se describe en el **Ejemplo 16.** Los compuestos, identificados en la leyenda, se añadieron a las células a las concentraciones mostradas en el eje x. La viabilidad se determinó 24 horas después del tratamiento con el compuesto.

La **Figura 9** muestra los efectos de una selección de inhibidores de HDAC sobre la viabilidad de una línea celular derivada de páncreas adulto. El procedimiento experimental se describe en el **Ejemplo 16.** Los compuestos, identificados en la leyenda, se añadieron a las células a las concentraciones mostradas en el eje x. La viabilidad se determinó 24 horas después del tratamiento con el compuesto.

La **Figura 10** muestra los efectos de una selección de inhibidores de HDAC sobre la viabilidad de una línea celular derivada de líquido amniótico. El procedimiento experimental se describe en el **Ejemplo 16.** Los compuestos, identificados en la leyenda, se añadieron a las células a las concentraciones mostradas en el eje

x. La viabilidad se determinó 72 horas después del tratamiento con el compuesto.

La **Figura 11** muestra los efectos de una selección de inhibidores de HDAC sobre la viabilidad de una línea celular derivada de páncreas adulto. El procedimiento experimental se describe en el **Ejemplo 16.** Los compuestos, identificados en la leyenda, se añadieron a las células a las concentraciones mostradas en el eje x. La viabilidad se determinó 72 horas después del tratamiento con el compuesto.

La **Figura 12** muestra los efectos de una selección de supuestos compuestos inhibidores de HDAC sobre la actividad enzimática HDAC. Los compuestos, identificados en la leyenda, se incubaron con la enzima HDAC a las concentraciones mostradas. Los resultados se normalizaron frente a resultados observados con TSA.

Descripción detallada de la invención

Para aclarar la divulgación, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se dividió en las siguientes subsecciones que describen o ilustran algunas características, realizaciones o aplicaciones de la presente invención.

Células útiles en la presente invención

Las células adecuadas para su uso en los procedimientos de la presente invención pueden obtenerse de tejidos tales como, por ejemplo, médula ósea, sangre de cordón umbilical, saco amniótico, líquido amniótico, placenta, piel, grasa, músculo, vasculatura, hígado, páncreas o sangre periférica, usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Las células pueden ser células totalmente diferenciadas o pueden ser células parcialmente diferenciadas o células no diferenciadas. Las células pueden ser células madre de células progenitoras.

La diferenciación es el proceso mediante el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, tal como una nerona o un miocito, por ejemplo. Una célula diferenciada es una que ha asumido una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. Cuando se aplica el término comprometido al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha continuado en la ruta de diferenciación hasta un punto en el que, en circunstancias normales, continuará diferenciándose en un tipo de célula o en un subconjunto de tipos de células específico, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse en un tipo de célula diferente o volver a un tipo de célula menos diferenciada. La des-diferenciación se refiere al proceso mediante el cual una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Como se usa en el presente documento, el linaje de una célula define la herencia de la célula, es decir de que células procede y qué células puede originar. El linaje de una célula sitúa a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación.

Una célula progenitora es una célula que tiene la capacidad de crear progenie que sea más diferenciada que ella misma, que conserve sin embargo la capacidad de suministrar grupos de progenitores. Mediante esta definición, las propias células madre son también células progenitoras, como lo son los precursores más inmediatos para células finalmente diferenciadas.

El aislamiento de una población de células puede conseguirse usando anticuerpos monoclonales, proteínas específicas expresadas en la superficie de las células. Los anticuerpos monoclonales pueden adherirse al sustrato para facilitar la separación de las células unidas. Un experto habitual en la materia puede seleccionar los procedimientos que pueden usarse para aislar células adecuadas para su uso en la presente invención. Ejemplos de dichos procedimientos se enseñan en los documentos US6087113, US6261549, US5914262, US5908782 y US20040058412.

Las células pueden caracterizarse, por ejemplo, por características de crecimiento (por ejemplo, capacidad para duplicar la población, duplicar el tiempo, pases a la senescencia), análisis de cariotipo (por ejemplo, cariotipo normal; linaje maternal o neonatal), citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica (por ejemplo, para la detección de epítopos), perfilado de expresión de genes (por ejemplo, micromatrices de genes; reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo, PCR de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real y PCR convencional)), matrices de proteínas, secreción de proteínas (por ejemplo, mediante ensayo de coagulación plasmática o análisis de medio adaptado, por ejemplo, mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)), reacción de linfocitos mixta (por ejemplo, como medida de estimulación de PBMC) y/u otros procedimientos conocidos en la técnica.

Las células adecuadas para su uso en los procedimientos de la presente invención también pueden incluir células obtenidas de fuentes comerciales, tales como, por ejemplo, células madre mesenquimales humanas comercializadas con el nombre comercial POIETICS™ (Nº Cat. PT-2501, Cambrex). Estas células madre mesenquimales son positivas para la expresión de los siguientes marcadores: CD29, CD44, CD105 y CD166. Las células son negativas para la expresión de los marcadores CD14, CD34 y CD45.

En un aspecto de la presente invención, las células pueden ser células estromales derivadas de páncreas. Estas células pueden aislarse mediante un procedimiento multietapa, que se describe en el **Ejemplo 1.** Como alternativa, pueden aislarse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la materia. Se enseñan

ejemplos de procedimientos de aislamiento adecuados en los documentos US2003/0082155, US5,834,308, US6,001,647, US6,703,017, US6,815,203, WO2004/011621.

En un aspecto de la presente invención, las células pueden ser células derivadas de líquido amniótico. Estas células pueden aislarse mediante un procedimiento multietapa como se describe con detalle en el **Ejemplo 2.** Como alternativa, pueden aislarse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la materia. Se enseñan ejemplos de procedimientos de aislamiento adecuados en los documentos W02003/042405, US2005/0054093, en Anker y col, Blood 102, 1548-1549, 2003, Tsai y col, Human Reproduction 19, 1450-1456, 2004.

Las células aisladas, o tejidos de los cuales se obtienen las células pueden usarse para iniciar, o sembrar, cultivos de células. Las células aisladas pueden transferirse a recipientes estériles de cultivo tisular, revestidos o no con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (nativo, desnaturalizado o reticulado), gelatina, fibronectina y otras proteínas de matriz extracelular. Las células pueden cultivarse en cualquier medio de cultivo capaz de mantener el crecimiento de las células tal como, por ejemplo, DMEM (con alto o bajo contenido en glucosa), DMEM desarrollado, DMEM/MCDB 201, medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F12 de Ham (F12), medio de Dulbecco 17 modificado por Iscove, Medio de Crecimiento de Células Madre Mesenquimales (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640 y CELL-GRO-FREE. El medio de cultivo puede complementarse con uno o más componentes que incluyan, por ejemplo, suero bovino fetal (SBF); suero equino (SE); suero humano (SH); beta-mercaptoetanol (BME o 2-ME); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), factor de crecimiento epidérmico (FCE), factor de crecimiento de fibroblastos (FCF), factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV), factor de crecimiento de insulina -1 (FCI-1), factor inhibidor de leucocitos (FIL) y eritropoyetina; aminoácidos, incluyendo L-valina y uno o más antibióticos y/o agentes antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tales como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomicina, amfotericina B, gentamicina y nistatina, en solitario o en combinación. Las células pueden sembrarse en recipientes de cultivo a una densidad que permita el crecimiento celular.

En la técnica se conocen bien procedimientos para la selección del medio de cultivo más apropiado, preparación de medio y técnicas de cultivo de células y se describen en diversas fuentes, incluyendo Doyle y col., (eds.), 1995, &TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley &Sons, Chichester; and Ho and Wang (eds.), 1991, ANIMAL CELL BIOREACTORS, Butterworth-Heinemann, Boston.CELL

Las células adecuadas para su uso en la presente invención pueden desarrollarse cultivando en un medio de crecimiento definido que contenga al menos un factor que estimule la proliferación de las células. El al menos un factor puede incluir, por ejemplo, nicotinamida, miembros de la familia TFG-β, incluyendo TFG-β 1, 2 y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP-2, -4, 6, -7, -11, - 12 y -13), albúmina de suero, la familia de factores de crecimiento de fibroblastos, los factores AA y BB de crecimiento derivado de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (FCI-I, II), factores de diferenciación de crecimiento (FDC-5, -6, -8, -10, 11), péptido I y II de tipo glucagón (GLP-I y II), mimetobody GLP-1 y GLP-2, Exendina-4, ácido retinoico hormona paratiroidea, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina, beta mercaptoetanol, factor de crecimiento epidérmico (FCE), gastrina I y II, quelantes de cobre tales como trietilen pentamina, TGF-β, forscolina, butirato de sodio, activina, betacelulina, noggina, factores de crecimiento de neuritas, nodal, insulina/transferrina/selenio (ITS), factor de crecimiento de hepatocitos (FCH), factor de crecimiento de queratinocitos (FCQ), extracto de pituitaria bovina, proteína asociada a neogénesis de islotes (INGAP), inhibidores proteosómicos, inhibidores de la ruta notch, inhibidores del erizo sónico o combinaciones de los mismos. Como alternativa, las células adecuadas para su uso en la presente invención pueden desarrollarse en medios adaptados. La expresión “medio adaptado” significa que una población de células se desarrolla en un medio de cultivo de células definido básico y aporta factores solubles al medio. En un uso de este tipo, las células se eliminan del medio, mientras que permanecen los factores solubles que producen las células. Después, este medio se usa para cultivar una población de células diferente.

Caracterización de las células de la presente invención

Los procedimientos para evaluar la expresión de genes, mediante niveles de proteínas o ácidos nucleicos en células cultivadas o aisladas son convencionales en la técnica. Estos incluyen reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), véanse, por ejemplo los procedimientos descritos en el **Ejemplo 3**, transferencias Northern, hibridación *in situ* (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col., eds. 2001 complementarias)), transferencia de Western y para marcadores que son accesibles en células intactas, análisis de citometría de flujo (FACS) (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998), y los procedimientos descritos en el **Ejemplo 4**) e inmunoensayos tales como análisis inmunohistoquímico de material seccionado (véanse, por ejemplo, los procedimientos descritos en el **Ejemplo 5**).

Los ejemplos de anticuerpos útiles para detectar determinados marcadores de proteínas se indican en la **Tabla I A yB.** Debe observarse que existen disponibles otros anticuerpos dirigidos contra los mismos marcadores que reconocen los anticuerpos indicados en las **Tablas I A yB** o pueden desarrollarse fácilmente. Dichos otros anticuerpos también pueden emplearse para evaluar la expresión de marcadores en las células aisladas de acuerdo con la presente invención.

Los expertos en la materia conocen bien las características de las células del linaje de células β y continúan identificándose otras características del linaje de células β. Estas características pueden usarse para confirmar que las células derivadas de líquido amniótico, aisladas de acuerdo con la presente invención, se han diferenciado para adquirir las propiedades características del linaje de células β. Las características específicas del linaje de células β incluyen la expresión de uno o más factores de transcripción, tales como, por ejemplo, PDX-1 (gen 1 homobox pancreático y duodenal), NGN-3 (neurogenina-3), Hlxb9, Nkx6, Isl1, Pax6, NeuroD, Hnfla, Hnf6, Hnf3 Beta y Mafa entre otros. Estos factores de transcripción están bien establecidos en la técnica para la identificación de células endocrinas. Véase, por ejemplo, Edlund (Nature Reviews Genetics 3: 524-632 (2002)).

Diferenciación de células por remodelación de cromatina.

La diferenciación de las células útiles en la presente invención puede conseguirse modificando la expresión de genes en las células. Esto puede conseguirse tratando las células con al menos un agente que remodele la estructura de la cromatina dentro de las células, de manera que una región de ADN que contenga genes activos o potencialmente activos esté más débilmente empaquetada, menos condensada y se pueda acceder a la transcripción. De manera ideal, el tratamiento de las células con el al menos un agente que remodele la estructura de la cromatina dentro de las células puede dar como resultado la modificación de la expresión de genes sin ser tóxico a la célula o desencadenar una reacción adversa, tal como, por ejemplo, muerte celular. Un experto en la materia puede determinar fácilmente dichos sucesos tóxicos o adversos y seleccionar un agente que remodele la estructura de la cromatina dentro de las células en las que se minimicen dichos sucesos.

En una realización, las células forman parte de un cultivo celular *in vitro*. Generalmente, una célula, tal como una célula madre, o una célula progenitora en cultivo, puede ponerse en contacto con una cantidad de al menos un agente de remodelación de cromatina eficaz para modificar la expresión de genes dentro de la célula.

Las células tratadas con un agente de remodelación de cromatina pueden presentar cambios globales en la expresión de genes no limitado a cualquier gen individual o familia de genes. El resultado puede regular negativamente algunos genes, regular positivamente otros y puede dejar no obstante otros genes inalterados dependiendo del tipo de célula, de su etapa de diferenciación y de las respuestas a lo largo del tiempo en relación con el protocolo de tratamiento y ambiental u otras señales estimuladoras tales como, por ejemplo, división celular.

Puede surgir otra complicación cuando los agentes de remodelación de cromatina cambian la expresión de genes que, en si mismos, regulan otros genes aguas abajo, por ejemplo genes de factores de transcripción. Por último, los agentes de remodelación de cromatina no pueden influir en todos los dominios reguladores de genes de una manera equivalente y por lo tanto no pueden producir expresión de genes completa en relación con una célula completamente diferenciada. Por ejemplo, un agente de remodelación de cromatina no puede modificar al mismo grado regiones potenciadoras de genes, que operan bi-direccionalmente a distancias variables desde regiones promotoras y como consecuencia, un gen puede activarse sin conseguir expresión completa.

Los genes cuyos niveles de expresión se modifican por tratamiento con agentes de remodelación de cromatina pueden ser necesarios para la diferenciación de un tipo de célula deseado, en el presente documento denominado genes “relacionados con la diferenciación”. Como alternativa, los genes pueden asociarse con la función de un tipo de célula deseado. La función puede incluir, por ejemplo, la secreción de insulina en el caso de una célula β. Los agentes de remodelación de cromatina pueden influir simultáneamente en la expresión de genes relacionados con la diferenciación y genes asociados con la función de un tipo de célula deseado.

La remodelación de la cromatina puede conseguirse por modificación directa covalente de histonas. La modificación covalente puede ser por acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinización y sumoilación. La modificación covalente puede conseguirse añadiendo al menos un agente de remodelación de cromatina que estimule una o todas estas modificaciones. Como alternativa, el al menos un agente de remodelación de cromatina puede inhibir una o más de estas modificaciones.

En una realización, el procedimiento de la presente invención implica esencialmente:

- Aislar una población de células,
- Poner en contacto la población de células con al menos un agente de remodelación de cromatina,
- Determinar los cambios en la expresión de genes de la población de células,
- Cultivar la población de células tratadas *in vitro*.

En una realización, el procedimiento de la presente invención implica esencialmente:

- Aislar una población de células que no exprese PDX-1 o que haya perdido la expresión de PDX-1 durante el cultivo *in vitro,*
- Poner en contacto la población de células con al menos un agente de remodelación de cromatina,
- Determinar posteriormente los cambios en la expresión de genes de la población de células,
- Cultivar la población de células tratadas *in vitro*.

Los cambios en la expresión de genes pueden ser por regulación positiva o por regulación negativa o una

combinación. El al menos un agente de remodelación de cromatina puede influir en el nivel de expresión de un gen o genes múltiples, al mismo o diferente grado. El al menos un agente de remodelación de cromatina puede influir en el nivel de expresión de un gen o genes múltiples y puede no influir en los niveles de expresión de otros genes.

Las células pueden necesitar un tratamiento o más de un tratamiento del al menos un agente de remodelación de cromatina. El más de un tratamiento puede ser con el mismo agente de remodelación de cromatina o con un agente de remodelación de cromatina diferente.

La concentración del al menos un agente de remodelación de cromatina puede variar dependiendo de la célula usada, de la elección del agente o agentes de remodelación de cromatina, del gen o genes cuyos niveles de expresión van a modificarse, de las condiciones de cultivo y similares. El al menos un agente de remodelación de cromatina puede ponerse en contacto con las células durante hasta aproximadamente 72 horas, o hasta aproximadamente 48 horas, o hasta aproximadamente 24 horas, o hasta aproximadamente 12 horas, o hasta aproximadamente 6 horas, o hasta aproximadamente 4 horas o hasta aproximadamente 2 horas o hasta aproximadamente 1 hora.

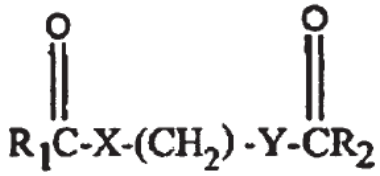
Las células tratadas con el al menos un agente de remodelación de cromatina pueden tratarse con al menos otro factor para promover la diferenciación de las células en un tipo de célula específico. Los factores pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, miembros de la familia TGF-β, incluyendo TGF-β1, 2 y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP-2, -4, 6, -7, -11, -12, y -13), albúmina de suero, miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos, factores AA y BB de crecimiento derivado de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de tipo insulina (FCI-I, -II), factores de diferenciación de crecimiento (FDC-5, -6, -8, -10, -11), péptido I y II de tipo glucagón (GLP-I y -II), mimetobody GLP-1 y GLP-2, Exendina-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina, beta mercaptoetanol, factor de crecimiento epidérmico (FCE), gastrina I y II, quelantes de cobre tales como trietilen pentamina, forscolina, butirato de sodio, activina, betacelulina, ITS, noggina, factores de crecimiento de neuritas, nodal, factor de crecimiento de hepatocitos (FCH), factor de crecimiento de queratinocitos (FCQ), extracto de pituitaria bovina, proteína asociada con neogénesis de islotes (INGAP), inhibidores proteosómicos, inhibidores de la ruta notch, inhibidores del erizo sónico o combinaciones de los mismos.

Los expertos en la materia pueden optimizar la combinación y concentraciones de factores de crecimiento, la duración del cultivo y otras condiciones del cultivo para conseguir una diferenciación eficaz mediante, por ejemplo, el control del porcentaje de células que pueden diferenciarse en células características del linaje deseado. El uno o más factores de crecimiento pueden añadirse en una cantidad suficiente para inducir la diferenciación de las células de la presente invención en células que llevan marcadores de un linaje de células β a lo largo de un periodo de tiempo de aproximadamente una a cuatro semanas.

Agentes de remodelación de cromatina

En un aspecto de la presente invención, el agente de remodelación de cromatina es un modulador de la actividad de histonas desacetilasas. Las “histonas desacetilasas” hacen referencia a enzimas que eliminan grupos acetilo de las histonas. El modulador de la actividad de las histonas desacetilasas puede mejorar la actividad de las enzimas histonas desacitelasas o puede inhibir la actividad de las enzimas histonas desacetilasas.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de las histonas desacetilasas puede ser un compuesto delta carbonilo, tal como, por ejemplo, los compuestos divulgados en la Solicitud de Patente Europa EP 1216986, que tienen la siguiente fórmula general:

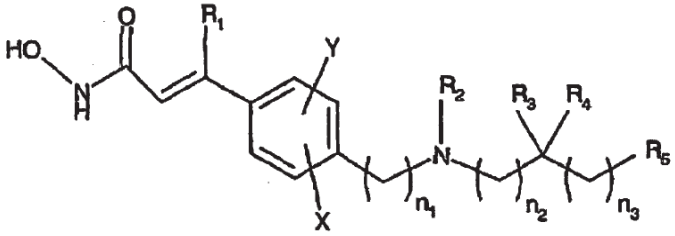


en la que X se selecciona del grupo que consiste en oxígeno, azufre y N(R); en la que Y se selecciona del grupo que consiste en azufre, N(R) y CH_2; en la que R es H o CH_3; en la que R_1 y R_2 son iguales o diferentes y tienen la fórmula general:

-(CH2)o-(R3)p-(CH2)q-(R4)r-(CH2)s-Z

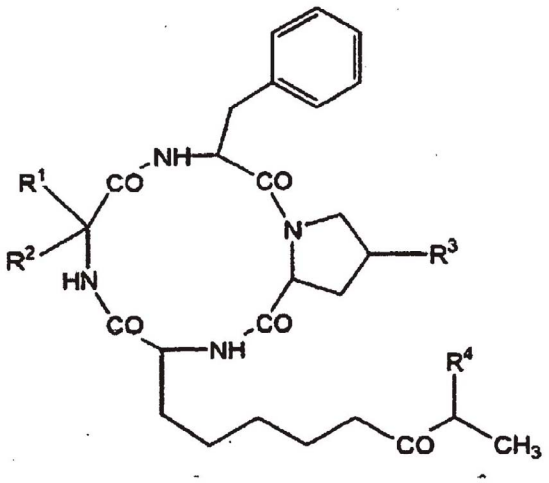
En la que R_3 y R_4 son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo (CH=CH), (C≡C), azufre y oxígeno; en la que Z se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y arilo, heteroarilo, cicloalquilo sustituidos o no sustituidos que tienen la siguiente fórmula general C_nH_{2n}-1 y alcoxi; en la que n es 3 o mayor, y en la que o, p, q, r y s son iguales o diferentes y son cada uno entre 0 y 10.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de las histonas desacetilasas puede ser un compuesto hidroxamato, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO0222577, que tienen la fórmula general:



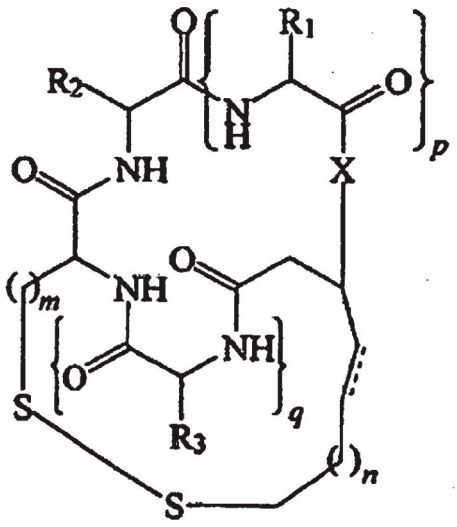
En la que R_1 es H, halo o un alquilo C_1-C_6 de cadena lineal; R_2 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_{10}, cicloalquilo C_4-C_9, heterocicloalquilo C_4-C_9, heterocicloalquilalquilo C_4-C_9, cicloalquilalquilo, arilo, heteroarilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, -$(CH_2)_nC(O)R_6$, -$(CH_2)_nOC(O)R_6$, amino acilo, HON-C(O)-CH=C(R_1)-aril-alquil- y -$(CH_2)_nR_7$; R_3 y R_4 son iguales o diferentes e independientemente H, alquilo C_1-C_6, acilo o acilamino, o R_3 y R_4 junto con el átomo de carbono al que están unidos representan C=Q C=S o C=NR_8, o R_2 junto con el nitrógeno al que está unido y R_3 junto con el carbono al que está unido puede formar un heterocicloalquilo C_4-C_9, un heteroarilo, un poliheteroarilo, un poliheterociclo no aromático o un anillo poliheterociclo mínimo de arilo y no arilo; R_5 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_4-C_9, heterocicloalquilo C_4-C_9, acilo, arilo, heteroarilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, policiclo aromático, policiclo no aromático, policiclo mixto de arilo y no arilo, poliheteroarilo, poliheterociclo no aromático y poliheterociclo mixto de arilo y no arilo; n, n_1, n_2 y n_3 son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre 0-6, cuando n_1 es 1-6, cada átomo de carbono puede estar opcional e independientemente sustituido con R_3 y/o R_4; X e Y son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre H, halo, alquilo C_1-C_4, NO_2, $C(O)R_1$, OR_9, SR_9, CN y $N1R_{10}R_{11}$; R_6 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_4-C_9, heterocicloalquilo C_4-C_9, cicloalquilalquilo, arilo, heteroarilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, OR_{12} y $NR_{13}R_{14}$; R_7 se selecciona entre OR_{15}, SR_{15}, $S(O)R_{16}$, SO_2R_{17}, $NR_{13}R_{14}$ y $NR_{12}SO_2R_6$; R_8 se selecciona entre H, OR_{15}, $NR_{13}R_{14}$, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_4-C_9, heterocicloalquilo C_4-C_9, arilo, heteroarilo, arilalquilo y heteroarilalquilo; R_9 se selecciona entre alquilo C_1-C_4 y C(O)-alquilo; R_{10} y R_{11} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre H, alquilo C_1-C_4 y -C(O)-alquilo; R_{12} se selecciona entre H, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_4-C_9, heterocicloalquilo C_4-C_9, heterocicloalquilalquilo C_4-C_9, arilo, policiclo mixto de arilo y no arilo, heteroarilo, arilalquilo y heteroarilalquilo; R_{13} y R_{14} son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre H, alquilo C_1-C_6,, cicloalquilo C_4-C_9, heterocicloalquilo C_4-C_9, arilo, heteroarilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, amino acilo o R_{13} y R_{14} junto con el nitrógeno al que están unidos son heterocicloalquilo C_4-C_9, heteroarilo, poliheteroarilo, poliheterociclo no aromático o poliheterociclo mixto de arilo y no arilo; R_{15} se selecciona entre H, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_4-C_9, heterocicloalquilo C_4-C_9, arilo, heteroarilo, arilalquilo, heteroarilalquilo y $(CH_2)_mZ1R_{12}$; R_{16} se selecciona entre alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_4-C_9, heterocicloalquilo C_4-C_9, arilo, heteroarilo, poliheteroarilo, arilalquilo, heteroarilalquilo y $(CH_2)_mZ1R_{12}$; R_{17} se selecciona entre alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_4-C_9, heterocicloalquilo C_4-C_9, arilo, policiclo aromático, heteroarilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, poliheteroarilo y $NR_{13}R_{14}$; m es un número entero seleccionado de 0 a 6; y Z se selecciona entre O, NR_{13}, S y S(O); o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de las histonas desacetilasas puede ser un compuesto tetrapeptídico cíclico, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO0021979, que tienen la fórmula general:



En la que R1 es metilo, W es metilo o etilo, W es hidrógeno o metilo y W es hidroxi, teniendo opcionalmente un grupo protector de hidroxi, con la condición de que cuando W es hidrógeno, W es etilo.

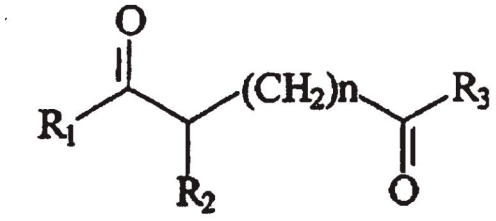
En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un compuesto depsipeptídico, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO0142282, que tienen la fórmula general:



En la que m es 1, 2, 3 ó 4; n es 0, 1, 2 ó 3; p y q son independientemente 1 ó 2; X es O, NH o NR; R_1, R_2, y R_3 son iguales o diferentes e independientemente un resto de cadena lateral aminoacídica o un derivado de cadena lateral aminoacídica; y R es un resto alquilo, arilo o arilalquilo de cadena inferior, con la condición de que el compuesto no sea FR901228.

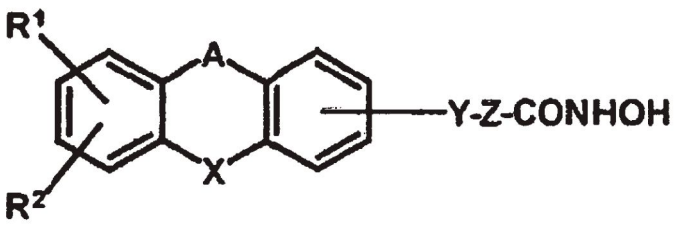
En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser hidroxiamida del ácido 6-(1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-il)-hexanoico, denominado "scriptaid", como se describe en el documento WO0149290.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas pueden ser compuestos que tienen la fórmula general:



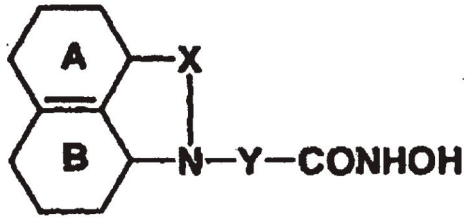
En la que R_1 y R_2 son iguales o diferentes y cada uno es un resto hidrófobo; en la que R_3 es un ácido hidroxámico, hidroxilamino, hidroxilo, amino, alquilamino o un grupo alquiloxi; y n es un número entero de 3 a 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismos, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO0118171.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de hitonas desacetilasas puede ser un compuesto de alquilhidroxamato tricíclico, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2002085883, que tienen la fórmula general:



En la que A representa un enlace, los grupos -CH_2-O-, -CH_2-S-, -CH_2-CH_2- o- NH-CO-; X representa el grupo -NR^{3-}, =CO o -CH(OH,)-; Y representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o el grupo -NR^{4-}; Z representa un grupo alquileno de cadena lineal que comprende 4, 5, 6, 7 u 8 átomos de carbono, en el que un grupo CH_2 puede estar reemplazado por un átomo de oxígeno o azufre, o en el que 2 átomos de carbono forman un doble enlace C=C y que está sin sustituir o sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados entre alquilo (C_{1-4}) y átomos de halógeno; R^1 y R^2 indican sustituyentes seleccionados independientemente entre un átomo de hidrógeno, átomos de halógeno, alquilo(C_{1-4}), trifluorometilo, hidroxi, alcoxi(C_{1-4}), benciloxi, alquilendioxi(C_{1-3}), nitro, amino, alquilamino(C_{1-4}), di[alquil(C_{1-4})]-amino o grupos alcanoilamino (C_{1-4}); R^3 y R^4 indican independientemente átomos de hidrógeno o grupos alquilo(C_{1-4}); sus enantiómeros, diaestereoisómeros, racematos y mezclas de los mismos.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser una lactama tricíclica o derivado de sultamo, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento W02002062773, que tienen la fórmula general:

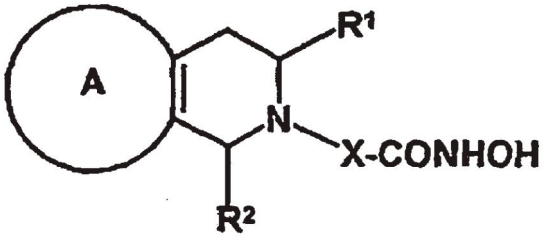


En la que

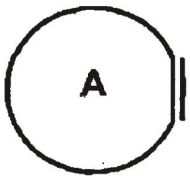
representa un grupo ciclohexenilo o un grupo fenilo,

representa a ciclohexenilo o un grupo fenilo que puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre un átomo de halógeno, un grupo nitro, un grupo amino, un grupo alquilamino(C_{1-4}), un grupo di[alquil(C_{1-4})]-amino o un grupo alcanoilamino (C_{1-4}), X es a grupo carbonilo o un grupo sulfonilo, Y es un grupo alquileno de cadena lineal que comprende 5, 6 ó 7 átomos de carbono, en el que un grupo CH_2 puede estar reemplazado por un átomo de oxígeno o de azufre, o en el que 2 átomos de carbono forman un doble enlace C=C y que está sin sustituir o sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados entre alquilo(C_{1-4}) y átomos de halógeno, sus enantiómeros, diaestereoisómeros, racematos, mezclas de los mismos y sales farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un derivado de tetrahidropiridina, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2002051842, que tienen la fórmula general:

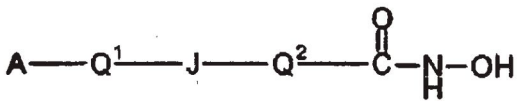


En la que

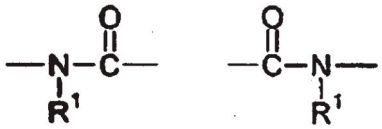


Indica (a) un grupo fenilo que puede estar sin sustituir o sustituido con 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre un átomo de halógeno, un alquil(C_{1-4}) -, trifluorometil-, hidroxi-, alcoxi(C_{1-4}) -, benciloxi-, alquilenodi(C_{1-3})-oxi-, nitro-, amino-, alquilamino(C_{1-4})-, di[alquil(C_{1-4})]-amino-, alcanoil(C_{1-4})-amino- o un grupo fenilo, que puede estar sin sustituir o sustituido con 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre un átomo de cloro, un alquil(C_{1-4}) -, trifluorometil-, hidroxi-, alcoxi(C_{1-4})-, alquilendioxi(C_{1-3}) -, nitro-, amino-, alquilamino(C_{1-4})-, di[alquil(C_{1-4})]amino- y un grupo alcanoilamino(C_{1-4}) o (b) representa un grupo indolilo que puede estar sin sustituir o sustituido con 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre un átomo de halógeno, un alquil(C_{1-4})-, trifluorometil-, hidroxi-, alcoxi(C_{1-4})-, benciloxi-, alquilendioxi(C_{1-3})-, nitro-, amino-, alquilamino(C_{1-4})-, di[alquil(C_{1-4})]amino- o un grupo alcanoilamino(C_{1-4})-, R^1 y R^2 son iguales o diferentes entre sí y son un átomo de hidrógeno, un alquil(C_{1-4})-, un grupo trifluorometilo o un grupo arilo, X es un grupo alquileno de cadena lineal que comprende 5, 6 ó 7 átomos de carbono, en el que un grupo CH_2 puede estar reemplazado por un átomo de oxígeno o azufre, o en el que 2 átomos de carbono forman un doble enlace C=C y que está sin sustituir o sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados entre alquilo(C_{1-4}) y átomos de halógeno, sus enantiómeros, diaestereoisómeros, racematos y mezclas de los mismos y sales farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un compuesto de ácido carbámico, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento W02002026696, que tienen la fórmula general:

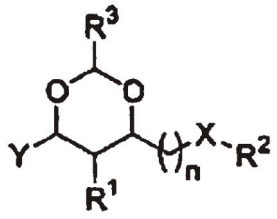


En la que A es un grupo arilo; Q^1 es un grupo líder arilo, que tiene una estructura principal de al menos 2 átomos de carbono; J es un engarce de amida seleccionado entre:



R_1 es un sustituyente amido; y Q^2 es un grupo líder ácido; y en el que: A, es un grupo arilo C_{5-20} y está opcionalmente sustituido; el grupo líder arilo es un grupo alquileno C_{1-7} y está opcionalmente sustituido; el sustituyente amido, R^1, es hidrógeno, alquilo C_{1-7}, heterociclilo C_{3-20} o arilo C_{5-20}; el grupo líder ácido, Q^2, es alquileno C_{1-7}; arileno C_{5-20}; arileno C_{5-20}-alquileno C_{1-7}; alquileno C_{1-7}-arileno C_{5-20}; y está opcionalmente sustituido; y, el grupo líder ácido, Q^2, tiene una estructura principal de al menos 3 átomos de carbono; y sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, amidas, ésteres, éteres, formas químicamente protegidas y profármacos de los mismos.

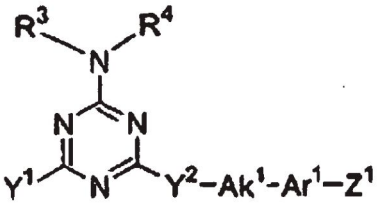
En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un compuesto de dioxano, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2002089782, que tienen la fórmula general:



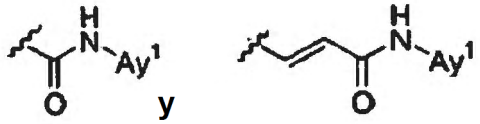
En la que R^1 es hidrógeno o un resto alifático, heterolifático, arilo, heteroarilo, -(alifático)arilo, -(alifático)heteroarilo, -(heteroalifático)arilo o -(heteroalifático)heteroarilo; n es 1-5; R^2 es hidrógeno, un grupo protector, o un resto alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, -(alifático)arilo, -(alifático)heteroarilo, -(heteroalifático)arilo o -(heteroalifático)heteroarilo; X es -O-, -$C(R^{2A})_{2-}$, -S- o -NR^{2A}-, en el que R^{2A} es hidrógeno, un grupo protector o un resto alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, -(alifático)arilo, -(alifático)heteroarilo, (heteroalifático)arilo o -

(heteroalifático)heteroarilo; o en el que dos o más apariciones de R^2 y R^{2A}, tomadas juntas, forman un resto alifático cíclico o heteroalifático o un resto arilo o heteroarilo; R^3 es un resto alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, -(alifático)arilo, -(alifático)heteroarilo, -(heteroalifático)arilo o -(heteroalifático)heteroarilo; e Y es hidrógeno o un resto alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, -(alifático)arilo, (alifático)heteroarilo, -(heteroalifático)arilo o -(heteroalifático)heteroarilo, por lo que cada uno de los grupos alifático y heteroalifático anteriores está independientemente sustituido o sin sustituir, es cíclico o acíclico, lineal o ramificado y cada uno de los grupos arilo y heteroarilo anteriores está sustituido o sin sustituir.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un compuesto que tiene la fórmula general:

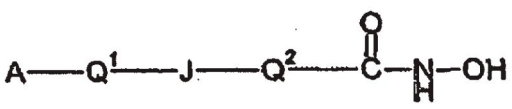


En la que R^3 y R^4 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, L^1, Cy^1 y $-L^1-Cy^1$, en el que L^1 es alquilo C_1-C_6, heteroalquilo C_2-C_6 o alquenilo C_3-C_6; y Cy^1 es cicloalquilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo, estando cada uno opcionalmente sustituido y estando cada uno opcionalmente condensado con uno o dos anillos arilo o heteroarilo, o con uno o dos anillo cicloalquilo o heterocíclicos, saturados o parcialmente insaturados, estando cada uno opcionalmente sustituido; o R^3 y R^4 se toman junto con el átomo de nitrógeno adyacente para formar un anillo de 5, 6 ó 7 miembros, en el que los átomos en el anillo se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en C, O, S y N, y en el que el anillo está opcionalmente sustituido y forma parte opcionalmente de un sistema de anillos bicíclico, o está opcionalmente condensado con uno o dos anillos arilo o heteroarilo, o con uno o dos anillos heterocíclicos o cicloalquilo saturados o parcialmente saturado, estando cada uno de los anillos y sistemas de anillo opcionalmente sustituidos; Y^1 se selecciona entre el grupo que consiste en-$N(R^1)(R^2)$, $-CH_2$-C(O)-$N(R^1)(R^2)$, halógeno, e hidrógeno, en el que R^1 y R^2 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, L^1, Cy^1 y $-L^1-Cy^1$, en el que L^1 es alquilo C_1-C_6, heteroalquilo C_2-C_6 o alquenilo C_3-C_6; y Cy^1 es cicloalquilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo, estando cada uno opcionalmente sustituido y estando cada uno opcionalmente condensado con uno o dos anillo arilo o heteroarilo, o con uno o dos anillos heterocíclicos o cicloalquilo saturados o parcialmente insaturados, estando cada anillo opcionalmente sustituido; o R^1 y R^2 se toman junto con el átomo de nitrógeno adyacente para formar un anillo de 5, 6 ó 7 miembros, en el que los átomos en el anillo se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en C, O, S y N, y en el que el anillo está opcionalmente sustituido y forma opcionalmente parte de un sistema de anillos bicíclico o está opcionalmente condensado con uno o dos anillo arilo o heteroarilo, o con uno o dos anillos cicloalquilo o heterocíclicos, saturados o parcialmente insaturados, estando cada uno de dichos anillos y sistemas de anillo opcionalmente sustituido; Y^2 en un enlace químico o $N(R^0)$, en el que R^0 se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, arilo, aralquilo y acilo; Ak^1 es alquileno C_1-C_6, heteroalquileno-C_1-C_6 (preferentemente, en el que (H_2- está reemplazado con -NH- y más preferentemente -NH-CH_2-), alquenileno C_2-C_6 o alquinileno C_2-C_6; Ar^1 es arileno o heteroarileno, estando ambos opcionalmente sustituido; y Z^1 se selecciona entre el grupo que consiste en

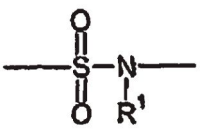


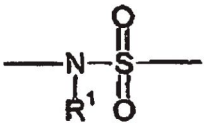
en el que Ay^1 es arilo o heteroarilo, estando cada uno opcionalmente sustituido. Dichos compuestos de describen en el documento WO2003024448.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un compuesto de ácido carbámico, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento W02002030879, que tienen la fórmula general:

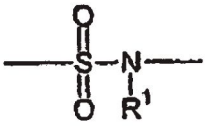


En el que A es un grupo arilo; Q^1 es un enlace covalente o un grupo líder arilo; J es un engarce de sulfonamida seleccionado entre:



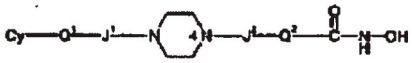


R^1 es un sustituyente sulfonamido; y Q^2 es un grupo líder ácido; con la condición de que si J es:



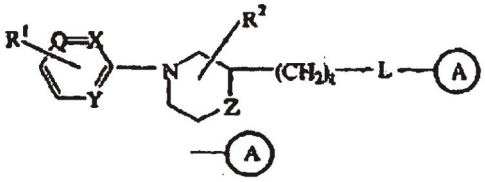
entonces Q^1 es un grupo líder arilo; y en el que: A, es un grup arilo C_{5-20} y está opcionalmente sustituido; el grupo líder arilo, es está presente, es un grupo alquileno C_{1-7} y está opcionalmente sustituido; el sustituyente sulfonamido, R^1, es hidrógeno, alquilo C_{1-7}, heterociclilo C_{3-20} o arilo C_{5-20}; el grupo líder ácido, Q^2, es alquileno C_{1-7}; arileno C_{5-20}; arilen C_{5-20}-alquileno C_{1-7}; alquilen C_{1-7}-arileno C_{5-20}; o un engarce de éter; y está opcionalmente sustituido; y sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, amidas, ésteres, éteres, formas protegidas químicamente y profármacos de los mismos.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un compuesto de ácido carbámico, tales como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2003082288, que tienen la fórmula general:



En la que Cy es independientemente un grupo ciclilo; Q^1 es independientemente un enlace covalente o un grupo líder ciclilo; el grupo piperazin-1,4-diilo está opcionalmente sustituido; J^1 es independientemente un enlace covalente o -C(=O)-; J^2 es independientemente -C(=O)- o-S(=O)$_2$-; Q^2 es independientemente un grupo líder ácido; en la que: Cy es independientemente: carbociclilo C_{3-20}, heterociclilo C_{3-20} o arilo C_{5-20}; y está opcionalmente sustituido; Q^1 es independientemente: un enlace covalente; alquileno C_{1-7}; o alquilen C_{1-7}-X-alquileno C_{1-7}, -X-alquileno C_{1-7} o alquilen C_{1-7}-X-, en el que X es -O- o -S-; y está opcionalmente sustituido; Q^2 es independientemente: alquileno C_{4-8}; y está opcionalmente sustituido; y tiene una longitud de estructura principal de al menos 4 átomos; o: Q^2 es independientemente: arileno C_{5-20}; arilen C_{5-20}-alquileno C_{1-7}; alquileno C_{1-7}-arileno C_{5-20}; o alquilen C_{1-7}-arilen C_{5-20}-alquileno C_{1-7}; y está opcionalmente sustituido; y tiene una longitud de estructura principal de al menos 4 átomos; o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, amida; éster, éter, forma químicamente protegida o profármaco de los mismos.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un derivado de piperazinil-, piperidinil- y morfolinil-, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2003076438, que tienen la fórmula general:



las formas N-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas de los mismos, en la que t es 0, 1, 2, 3 ó 4 y cuando t es 0 entonces se pretende un enlace directo;

cada Q es nitrógeno o

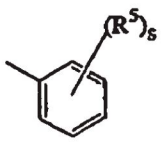
cada X es nitrógeno o

cada Y es nitrógeno o

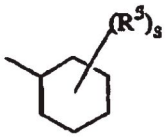
cada Z es -NH-, -O- o

R^1 es $-C(O)NR^3R^4$, $-NHC(O)R^7$, $-C(O)$-alcanodiil $C_{1-6}SR^7$, $-NR^8C(O)N(OH)R^7$, $-NR^8C(O)$alcanodiil $C_{1-6}SR^7$, $-NR^8C(O)C=N(OH)R^7$ u otro grupo quelante de Zn, en el que cada uno de R^3 y R^4 se selecciona independientemente entre hidrógeno, hidroxi, alquilo C_{1-6}, hidroxialquilo C_{1-6}, aminoalquilo C_{1-6} o aminoarilo; R^7 es hidrógeno, alquilo C_{1-6}, alquilcarbonilo C_{1-6}, arilalquilo C_{1-6}, alquilpirazinilo C_{1-6}, piridinona, pirrolidinona o metilimidazolilo; R^8 es hidrógeno o alquilo C_{1-6}; R^2 es hidrógeno, hidroxi, amino, hidroxialquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, arilalquilo C_{1-6}, aminocarbonilo, hidroxicarbonilo, aminoalquilo C_{1-6}, : aminocarbonilalquilo C_{1-6}, hidroxicarbonilalquilo C_{1-6}, hidroxiaminocarbonilo, alquiloxicarbonilo C_{1-6}, alquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6} o di(alquil C_{1-6})amino-alquilo C_{1-6}; -L- es un radical bivalente seleccionado entre $-NR^9C(O)-$, $-NR^9SO_{2-}$ o $-NR^9CH_{2-}$, en el que R^9 es hidrógeno, alquilo C_{1-6}, cicloalquilo C_{3-10}, hidroxialquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}-alquilo C_{1-6} o di(alquil C_{1-6})amino-alquilo C_{1-6};

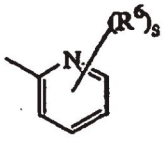
es un radical seleccionado entre



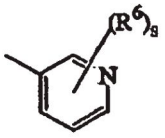
(a-1)



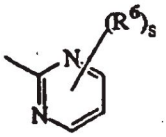
(a-2)



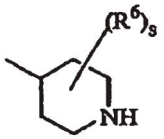
(a-3)



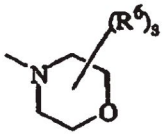
(a-4)



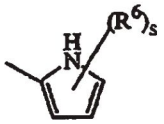
(a-5)



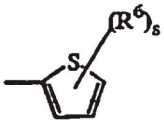
(a-6)



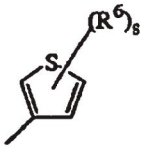
(a-7)



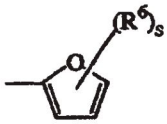
(a-8)



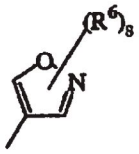
(a-9)



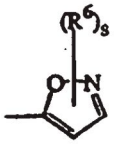
(a-10)



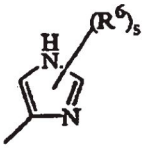
(a-11)



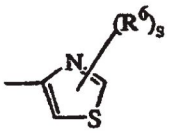
(a-12)



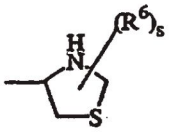
(a-13)



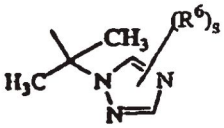
(a-14)



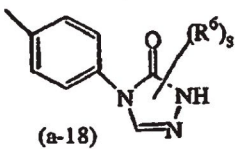
(a-15)



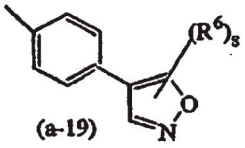
(a-16)



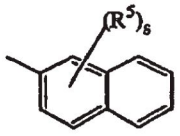
(a-17)



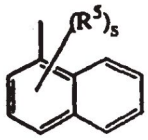
(a-18)



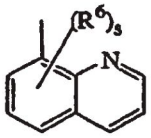
(a-19)



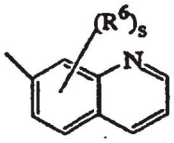
(a-20)



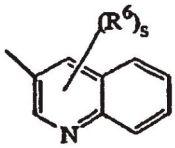
(a-21)



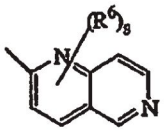
(a-22)



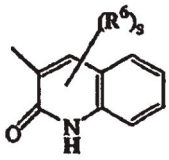
(a-23)



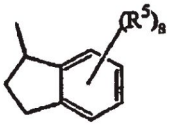
(a-24)



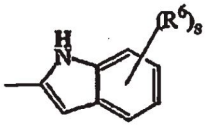
(a-25)



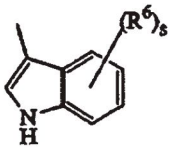
(a-26)



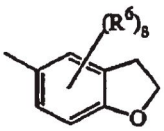
(a-27)



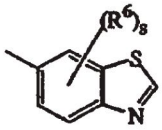
(a-28)



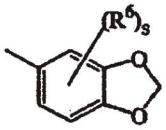
(a-29)



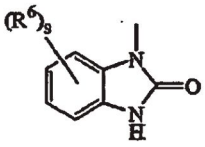
(a-30)



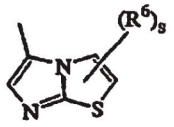
(a-31)



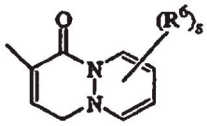
(a-32)



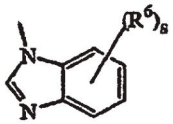
(a-33)



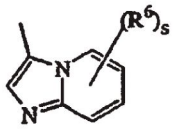
(a-34)



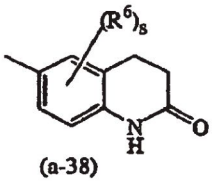
(a-35)



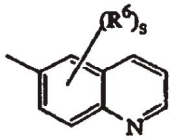
(a-36)



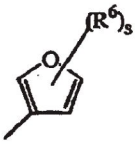
(a-37)



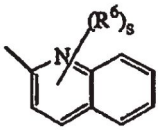
(a-38)



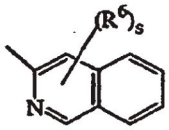
(a-39)



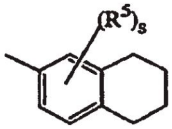
(a-40)



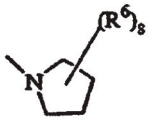
(a-41)



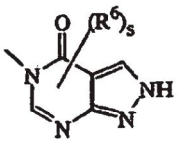
(a-42)

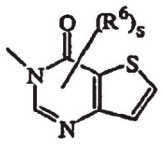


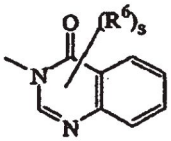
(a-43)

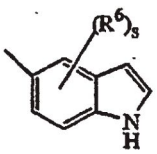


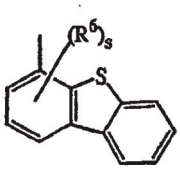
(a-44)

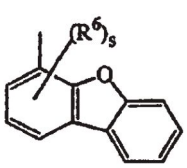

(a-45)

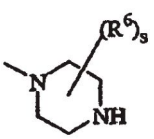

(a-46)


(a-47)


(a-48)


(a-49)

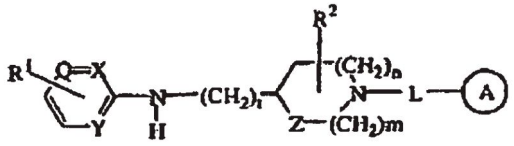

(a-50)


(a-51)

en el que cada s es independientemente 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; cada R^5 y R^6 se selecciona independientemente entre hidrógeno; halo; hidroxi; amino; nitro; trihaloalquilo C_{1-6}; trihaloalquiloxi C_{1-6}; alquilo C_{1-6}; alquilo C_{1-6} sustituido con arilo y cicloalquilo C_{3-10}; alquiloxi C_{1-6}; alquiloxi C_{1-6}-alquiloxi C_{1-6}; alquilcarbonilo C_{1-6}; alquiloxicarbonilo C_{1-6}; alquilsulfonilo C_{1-6}; cianoalquilo C_{1-6}; hidroxialquilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}; hidroxialquilamino C_{1-6}; aminoalquiloxi C_{1-6}; di(alquil C_{1-6}) aminocarbonilo; di(hidroxialquil C_{1-6})amino; (aril)(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquiloxi C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})ami- no alquilamino C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})amino alquilamino C_{1-6}- alquilo C_{1-6}; arilsulfonilo; arilsulfonilamino; ariloxi; ariloxi alquilo C_{1-6}; arilalquenediilo C_{26}; di(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})amino alquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})amino(alquil C_{1-6}) amino; di(alquil C_{1-6})amino(alquil C_{1-6})amino alquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})amino alquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6}) aminoalquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})amino alquilo C_{1-6}; aminosulfonilamino (alquil C_{1-6})amino; aminosulfonilamino(alquil C_{1-6}) amino alquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6}) aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})ami- no alquilo C_{1-6}; ciano; tiofenilo; tiofenilo sustituido con di(alquil C_{1-6})amino alquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})amino alquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})amino alquilo C_{1-6}, alquilpiperazinil C_{1-6} alquilo C_{1-6}, hidroxi alquilpiperazinil C_{1-6} alquilo C_{1-6}, hidroxi alquiloxi C_{1-6} alquilpiperazinil C_{1-6} alquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6}) aminosulfonilpiperazinil alquilo C_{1-6}, alquiloxipiperidinilo C_{1-6}, alquiloxipiperidinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}), morfolinilalquilo C_{1-6}, hidroxialquil C_{1-6}-(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6} o di(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; furanilo; furanilo sustituido con hidroxialquilo C_{1-6}; benzofuranilo; imidazolilo; oxazolilo; oxazolilo sustituido con arilo y alquilo C_{1-6}; alquiltriazolilo C_{1-6}; tetrazolilo; pirrolidinilo; pirrolilo; piperidinilalquiloxi C_{1-6}; morfolinilo; alquilmorfolinilo C_{1-6}; morfolinilalquiloxi C_{1-6}; morfolinilalquilo C_{1-6}; morfolinilalquilamino C_{1-6}; morfolinilalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; piperazinilo; alquilpiperazinilo C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquiloxi C_{1-6}, piperazinilalquilo C_{1-6}; naftalenilsulfonilpiperazinilo; naftalenilsulfonilpiperidinilo; naftalenilsulfonilo; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilamino C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquilpiperazinilsulfonilo C_{1-6}; aminosulfonilpiperazinilalquiloxi C_{1-6}; aminosulfonilpiperazinilo; aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilo; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}; hidroxialquilpiperazinilo C_{1-6}; hidroxialquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquiloxipiperidinilo C_{1-6}; allciloxipiperidinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; piperidinilaminoalquilamino C_{1-6}; piperidinilaminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; (alquilpiperidiil C_{1-6})(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}; (alquilpiperidinil C_{1-6})(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; (hidroxialquil C_{1-6})(alquil C_{1-6})amino; (hidroxialquil C_{1-6})(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; hidroxialquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; di(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; pirrolidinilalquilo C_{1-6}; pirrolidinilalquiloxi C_{1-6}; pirazolilo; tiopirazolilo; pirazolilo sustituido con dos sustituyentes seleccionados entre alquilo C_{1-6} o trihaloalquilo C_{1-6}; piridinilo; piridinilo sustituido con alquiloxi C_{1-6}, ariloxi o arilo; pirimidinilo; tetrahidropirimidinilpiperazinilo; tetrahidropirimidinilpiperazinilalquilo C_{1-6}; quinolinilo; indol; fenilo; fenilo sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, amino, nitro, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, hidroxialquilo C_{1-4}, trifluorometilo, trifluorometiloxi, hidroxialquiloxi C_{1-4}, alquilsulfonilo C_{1-4}, alquiloxi C_{1-4}alquiloxi C_{1-4}, alquiloxicarbonilo C_{1-4}, aminoalquiloxi C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquiloxi C_{1-4}, di(alquil C_{1-4}) amino, di(alquil C_{1-4})aminocarbonilo, di(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})amino(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4}) amino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(C_{1-4}alquil)aminoalquilo C_{1-4}-(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminoalquil C_{1-4}-(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})amino, aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-6}, ciano, piperidinilalquiloxi C_{1-4}, pirrolidinilalquiloxi C_{1-4}, aminosulfonilpiperazinilo, aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilpiperazinilo, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-4}, hidroxialquilpiperazinilo C_{1-4}, hidroxialquilpiperazinil C_{1-4} alquilo C_{1-4}, alquiloxipiperidinilo C_{1-4}, alquiloxi C_{1-4}-piperidinilalquilo C_{1-4}, hidroxialquiloxi C_{1-4}-alquilpiperazinilo C_{1-4}, hidroxialquiloxi C_{1-4}alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, (hidroxialquil C_{1-4})(alquil C_{1-4})amino, (hidroxialquil C_{1-4})(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, hidroxialquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, di(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, furanilo, furanilo sustituido con -CH=CH-CH=CH-, pirrolidinilalquilo C_{1-4}, pirrolidinilalquiloxi C_{1-4}, morfolinilo, morfolinilalquiloxi C_{1-4}, morfolinilalquilo C_{1-4}, morfolinilalquilamino C_{1-4}, morfolinilalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, piperazinilo, alquilpiperazinilo C_{1-4}, alquil C_{1-4}-piperazinilalquiloxi C_{1-4}, piperazinilalquilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilamino C_{1-4},

alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-6}, pirimidinilpiperazinilo, pirimidinilpiperazinilalquilo C_{1-4}, piperidinilaminoalquilamino C_{1-4}, piperidinilaminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, (alquilpiperidinil C_{1-4})(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}, (alquilpiperidinil C_{1-4})(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, piridinilalquiloxi C_{1-4}, hidroxialquilamino C_{1-4}, di(hidroxialquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}, aminotiadiazolilo, aminosulfonilpiperazinilalquiloxi C_{1-4} o tiofenilalquilamino C_{1-4}; cada R^5 y R^6 puede situarse en el nitrógeno en sustitución del hidrógeno; en los anteriores, arilo es fenilo o fenilo sustituido con uno o más sustituyentes cada uno seleccionados independientemente entre halo, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, trifluorometilo, ciano o hidroxicarbonilo.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un compuesto de la fórmula general:



las formas *N*-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas del mismo, en la que n es 0, 1, 2 ó 3 y cuando n es 0, entonces se presente un enlace directo; m es 0, 1, 2 ó 3 y cuando m es 0, entonces se pretende un enlace directo; t es 0 ó 1 y cuando t es 0, entonces se pretende un enlace directo;

cada Q es nitrógeno o

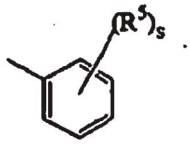
cada X es nitrógeno o

cada Y es nitrógeno o

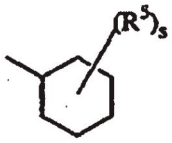
cada Z es $-CH_{2-}$ o -O-;

R^1 es $-C(O)NR^3R^4$, $-N(H)C(O)R^7$, -C(O)-alcanodiil $C_{1-6}SR^7$, $-NR^8C(O)N(OH)R^7$, $-NR^8C(O)$alcanodiil $C_{1-6}SR^7$, $-NR^3C(O)C=N(OH)R^7$ u otro grupo quelante de Zn, en el que cada uno de R^3 y R^4 se selecciona independientemente entre hidrógeno, hidroxi, alquilo C_{1-6}, hidroxialquilo C_{1-6}, aminoalquilo C_{1-6} o aminoarilo; R^7 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_{1-6}, alquilcarbonilo C_{1-6}, arilalquilo C_{1-6}, C_{1-6}alquilpirazinilo, piridinona, pirrolidinona o metilimidazolilo; R^8 se selecciona independientemente entre hidrógeno o alquilo C_{1-6}; R^2 es hidrógeno, hidroxi, amino, hidroxialquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, arilalquilo C_{1-6}, aminocarbonilo, hidroxicarbonilo, aminoalquilo C_{1-6}, aminocarbonilalquilo C_{1-6}, hidroxicarbonilalquilo C_{1-6}, hidroxiaminocarbonilo, alquiloxicarbonilo C_{1-6}, alquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6} o di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; -L- es un radical bivalente seleccionado entre alcanodiilo C_{1-6}, carbonilo, sulfonilo o alcanodiilo C_{1-6} sustituido con fenilo

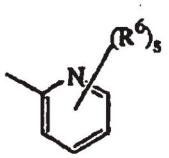
es un radical seleccionado entre



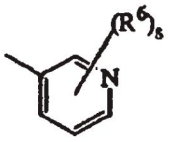
(a-1)



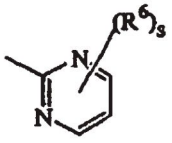
(a-2)



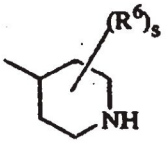
(a-3)



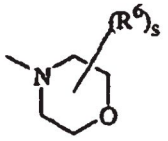
(a-4)



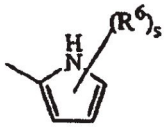
(a-5)



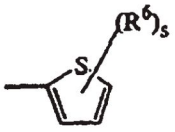
(a-6)



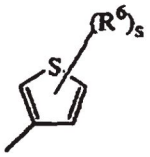
(a-7)



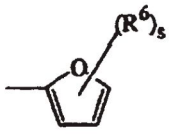
(a-8)



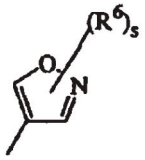
(a-9)



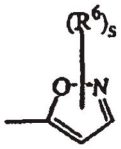
(a-10)



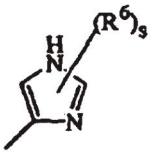
(a-11)



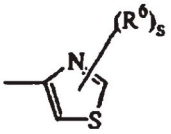
(a-12)



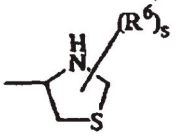
(a-13)



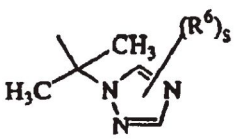
(a-14)



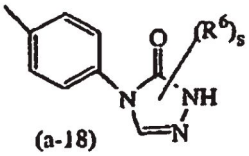
(a-15)



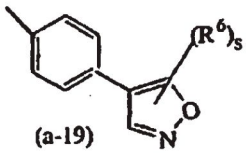
(a-16)



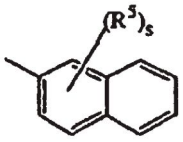
(a-17)



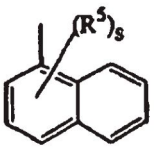
(a-18)



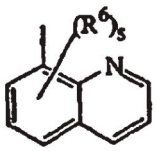
(a-19)



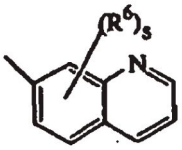
(a-20)



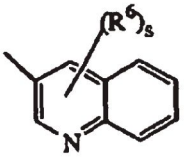
(a-21)



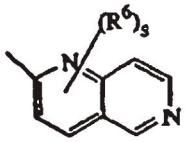
(a-22)



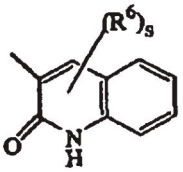
(a-23)



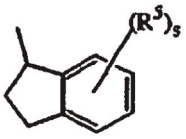
(a-24)



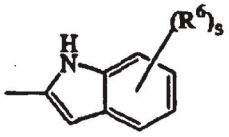
(a-25)



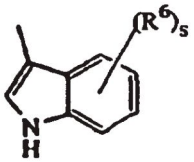
(a-26)



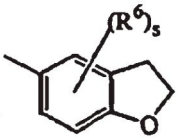
(a-27)



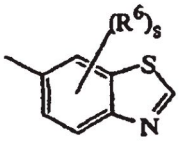
(a-28)



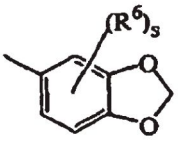
(a-29)



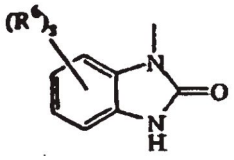
(a-30)



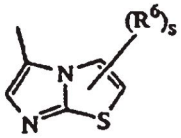
(a-31)



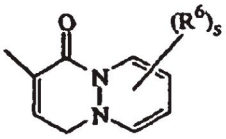
(a-32)



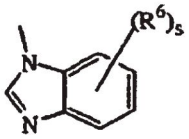
(a-33)



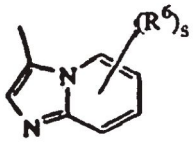
(a-34)



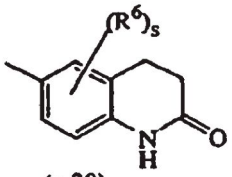
(a-35)



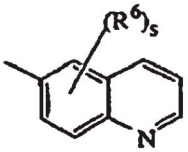
(a-36)



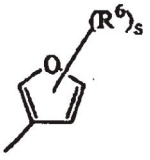
(a-37)



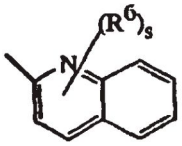
(a-38)



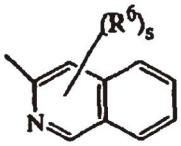
(a-39)



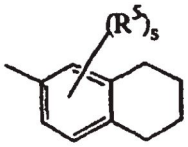
(a-40)



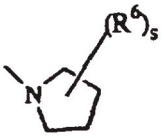
(a-41)



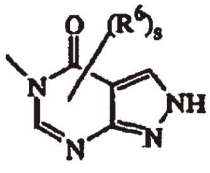
(a-42)

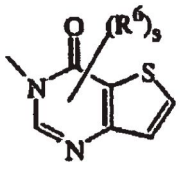


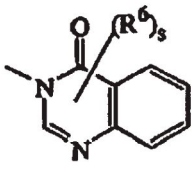
(a-43)

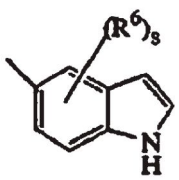


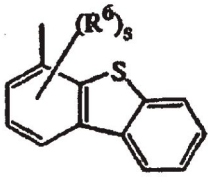
(a-44)

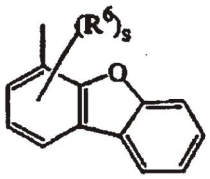

(a-45)

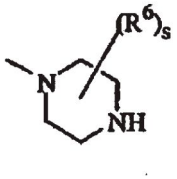

(a-46)


(a-47)


(a-48)


(a-49)

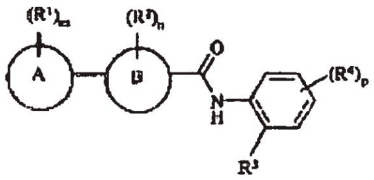

(a-50)


(a-51)

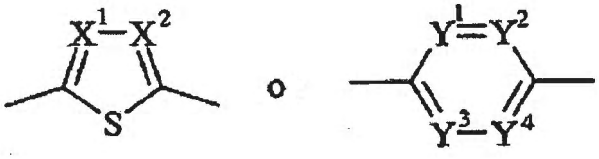
en los que cada s es independientemente 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; cada R^5 y R^6 se seleccionan independientemente entre hidrógeno; halo; hidroxi; amino; nitro; trihaloalquilo C_{1-6}; trihaloalquiloxi C_{1-6}; alquilo C_{1-6}; alquilo C_{1-6} sustituido con arilo y cicloalquilo C_{3-10}; alquiloxi C_{1-6}; alquiloxi C_{1-6}alquiloxi C_{1-6}; alquilcarbonilo C_{1-6}; alquiloxicarbonilo C_{1-6}; alquilsulfonilo C_{1-6}; cianoalquilo C_{1-6}; hidroxialquilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}; hidroxialquilamino C_{1-6}; aminoalquiloxi C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminocarbonilo; di(hidroxialquil C_{1-6})amino; (aril)(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquiloxi C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; arilsulfonilo; arilsulfonilamino; ariloxi; ariloxialquilo C_{1-6}; arilalquenediilo C_{2-6}; di(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})amino(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})amino(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6} (alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}-(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})amino; aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; ciano; tiofenilo; tiofenilo sustituido con di(alquil C_{1-6})aminoalquil C_{1-6}-(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, hidroxialquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}, alquiloxipiperidinilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}-piperidinilalquilo C_{1-6}, morfolinilalquilo C_{1-6}, hidroxialquil C_{1-6}-(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6} o di(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; furanilo; furanilo sustituido con hidroxialquilo C_{1-6}; benzofuranilo; imidazolilo; oxazolilo; oxazolilo sustituido con arilo y alquilo C_{1-6}; alquiltriazolilo C_{1-6}; tetrazolilo; pirrolidinilo; pirrolilo; piperidinilalquiloxi C_{1-6}; morfolinilo; alquilmorfolinilo C_{1-6}; morfolinilalquiloxi C_{1-6}; morfolinilalquilo C_{1-6}; morfolinilalquilamino C_{1-6}; morfolinilalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; piperazinilo; alquilpiperazinilo C_{1-6}; alquil C_{1-6}-piperazinilalquiloxi C_{1-6}; piperazinilalquilo C_{1-6}; naftalenilsulfonilpiperazinilo; naftalenilsulfonilpiperidinilo; naftalenilsulfonilo; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilamino C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquilpiperazinilsulfonilo C_{1-6}; aminosulfonilpiperazinilalquiloxi C_{1-6}; aminosulfonilpiperazinilo; aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilo; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}; hidroxialquilpiperazinilo C_{1-6}; hidroxialquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; piperidiniloalquiloxi C_{1-6}; alquiloxipiperidinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; piperidinilaminoalquilamino C_{1-6}; piperidinilamino C_{1-6}-alquilaminoalquilo C_{1-6}; (alquilpiperidinil C_{1-6})(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}; (alquilpiperidinil C_{1-6})(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; (hidroxialquil C_{1-6})(alquil C_{1-6})amino; (hidroxi C_{1-6}alquil)(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; hidroxialquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; di(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; pirrolidinilalquilo C_{1-6}; pirrolidinilalquiloxi C_{1-6}; pirazolilo; tiopirazolilo; pirazolilo sustituido con dos sustituyentes seleccionados entre acilo C_{1-6} o trihaloalquilo C_{1-6}; piridinilo; piridinilo sustituido con alquiloxi C_{1-6}, ariloxi o arilo; pirimidinilo; tetrahidropirimidinilpiperazinilo; tetrahidropirimidinilpiperazinilalquilo C_{1-6}; quinolinilo; indolilo; fenilo; fenilo sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, amino, nitro, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, hidroxialquilo C_{1-4}, trifluorometilo, trifluorometiloxi, hidroxialquiloxi C_{1-4}, alquilsulfonilo C_{1-4}, alquiloxi C_{1-4}-alquiloxi C_{1-4}, alquiloxicarbonilo C_{1-4}, aminoalquiloxi C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquiloxi C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminocarbonilo, di(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})amino(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})amino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}-(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminoalquil C_{1-4}-(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})amino, aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-6}, ciano, piperidinilalquiloxi C_{1-4}, pirrolidinilalquiloxi C_{1-4}, aminosulfonilpiperazinilo, aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-4}-di(alquil C_{1-4})aminosulfonilpiperazinilo, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-4}, hidroxialquilpiperazinilo C_{1-4}, hidroxialquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, alquiloxipiperidinilo C_{1-4}, alquiloxi C_{1-4}-piperidinilalquilo C_{1-4}, hidroxialquiloxi C_{1-4}-alquilpiperazinilo C_{1-4}, hidroxialquiloxi C_{1-4}-alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, (hidroxialquil C_{1-4})(alquil C_{1-4})amino, (hidroxialquil C_{1-4})(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(hidroxialquil C_{1-4})amino, di(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, furanilo, furanilo sustituido con -CH=CH-CH=CH-, pirrolidinilalquilo C_{1-4}, pirrolidinilalquiloxi C_{1-4}, morfolinilo,

morfolinilalquiloxi C_{1-4}, morfolinilalquilo C_{1-4}, morfolinilalquilamino C_{1-4}, morfolinilalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, piperazinilo, alquilpiperazinilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquiloxi C_{1-4}, piperazinilalquilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilamino C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-6}, tetrahidropirimidinilpiperazinilo, tetrahidropirimidinilpiperazinilalquilo C_{1-4}, piperidinilaminoalquilamino C_{1-4}, piperidinilaminalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, (alquilpiperidinil C_{1-4})(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}, (alquilpiperidinil C_{1-4})(hidroxialquil C_{1-4})amino C_{1-4}-alquilaminoalquilo C_{1-4}, piridinilalquiloxi C_{1-4}, hidroxialquilamino C_{1-4}, hidroxialquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})-aminoalquilamino C_{1-4}, aminotiadiazolilo, aminosulfonilpiperazinilalquiloxi C_{1-4} o tiofenilalquilamino C_{1-4}; cada R^5 y R^6 puede situarse en el nitrógeno en sustitución del hidrógeno; en los anteriores, arilo es fenilo o fenilo sustituido con uno o más sustituyentes cada uno seleccionado independientemente entre halo, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, trifluorometilo, ciano o hidroxicarbonilo. Véase, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2003076430.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un compuesto de la fórmula general:

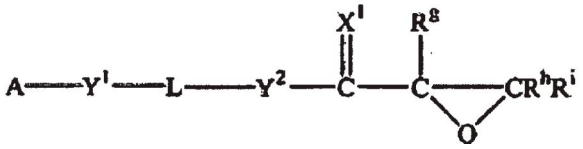


en la que: el Anillo A es un heterociclilo, en el que si dicho heterociclilo contiene un resto -NH-, ese nitrógeno puede estar opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre G; R^1 es un sustituyente sobre carbono y se selecciona entre halo, nitro, ciano, hidroxi, oxo, trifluorometilo, trifluorometoxi, amino, carboxi, carbamoílo, mercapto, sulfamoílo, alquilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, alcoxi C_{1-6}, alcanoílo C_{1-6}, alcanoiloxi C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})amino, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$amino, alcanoilamino C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})carbamoílo, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$carbamoílo, alquil C_{1-6}-S(O)a, en el que a es de 0 a 2, alcoxicarbonilo C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})sulfamoílo, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$sulfamoílo, arilo, ariloxi, arilalquilo C_{1-6}, grupo heterocíclico, (grupo heterocíclico)alquilo C_{1-6} o un grupo (D-E-); en la que R^1, incluyendo el grupo (D-E-), puede estar opcionalmente sustituido sobre carbono por uno o más V; y en la que, si dicho grupo heterocíclico contiene un resto -NH-, ese nitrógeno puede estar opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre J; V es halo, nitro, ciano, hidroxi, oxo, trifluorometilo, trifluorometoxi, amino, carboxi, carbamoílo, mercapto, sulfamoílo, alquilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, alcoxi C_{1-6}, alcanoílo C_{1-6}, alcanoiloxi C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})amino, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$amino, alcanoilamino C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})carbamoílo, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$carbamoílo, alquil C_{1-6}-S(O)$_a$, en el que a es de 0 a 2, alcoxicarbonilo C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})sulfamoílo, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$sulfamoílo o un grupo (D'-E'-); en la que V, incluyendo el grupo (D'-E'-), puede estar opcionalmente sustituido sobre carbono con uno o más W; W y Z se seleccionan independientemente entre halo, nitro, ciano, hidroxi, oxo, trifluorometilo, trifluorometoxi, amino, carboxi, carbamoílo, mercapto, sulfamoílo, alquilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, alcoxi C_{1-6}, alcanoílo C_{1-6}, alcanoiloxi C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})amino, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$amino, alcanoilamino C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})carbamoílo, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$carbamoílo, alquil C_{1-6}-S(O)$_a$, en el que a es de 0 a 2, alcoxicarbonilo C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})sulfamoílo o N,N-(alquil C_{1-6})$_2$sulfamoílo; G, J y K se seleccionan independientemente entre alquilo C_{1-8}, alquenilo C_{2-8}, alquinilo C_{2-8}, alcanoílo C_{1-8}, alquilsulfonilo C_{1-6}, alcoxicarbonilo C_{1-8}, carbamoílo, N-(alquil C_{1-6})carbamoílo, N,N-(alquil C_{1-8})carbamoílo, benciloxicarbonilo, benzoílo y fenilsulfonilo, arilo, arilalquilo C_{1-6} o (grupo heterocíclico)alquilo C_{1-6}; en la que G, J y K pueden estar opcionalmente sustituidos sobre carbono por uno o más Q; y en el que si dicho grupo heterocíclico contiene un resto -NH-, ese nitrógeno puede estar opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre hidrógeno o alquilo C_{1-6}; Q es halo, nitro, ciano, hidroxi, oxo, trifluorometilo, trifluorometoxi, amino, carboxi, carbamoílo, mercapto, sulfamoílo, alquilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, alcoxi C_{1-6}, alcanoílo C_{1-6}, alcanoiloxi C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})amino, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$amino, alcanoilamino C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})carbamoílo, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$carbamoílo, alquil C_{1-6}-S(O)$_a$, en el que a es de 0 a 2, alcoxicarbonilo C_{1-6}, alcoxicarbonilamino C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})sulfamoílo, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$sulfamoílo, arilo, ariloxi, arilalquilo C_{1-6}, arilalcoxi C_{1-6}, grupo heterocíclico, (grupo heterocíclico)alquilo C_{1-6}, (grupo heterocíclico)alcoxi C_{1-6} o un grupo (D''-E''-); en la que Q, incluyendo el grupo (D''-E''-), puede estar opcionalmente sustituido sobre carbono por uno o más Z; D, D' y D'' se seleccionan independientemente entre alquilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, cicloalquilo C_{3-8}, cicloalquil C_{3-8}-alquilo C_{1-6}, arilo, arilalquilo C_{1-6}, grupo heterocíclico, (grupo heterocíclico)alquilo C_{1-6}; en la que D, D' y D'' pueden estar opcionalmente sustituidos sobre carbono por uno o más F'; y en el que si dicho grupo heterocíclico contiene un resto -NH-, ese nitrógeno puede estar opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre K; E, E' y E'' se seleccionan independientemente entre -N(R^a)-, -O-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-, -N(R^a)C(O)-, -N(R^a)C(O)N(R^b)-, -N(R^a)C(O)O-, -OC(O)N(R^a)-, -C(O)N(R^a)-, -S(O)$_r$, -SO_2N(R^a)-, -N(R^a)SO_2-; en los que R^a y R^b se seleccionan independientemente entre hidrógeno o alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido con uno o más F y r es 0-2; F y F' se seleccionan independientemente entre halo, nitro, ciano, hidroxi, trifluorometilo, trifluorometoxi, amino, carboxi, carbamoílo, mercapto, sulfamoílo, alquilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, alcoxi C_{1-6}, alcanoílo C_{1-6}, alcanoiloxi C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})amino, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$amino, alcanoilamino C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6}) carbamoílo, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$carbamoílo, alquil C_{1-6}-(O)$_a$, en el que a es de 0 a 2, alcoxicarbonilo C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})sulfamoílo y N,N-(alquil C_{1-6})$_2$sulfamoílo; m es 0, 1, 2, 3 ó 4; en la que los valores de R^1 pueden ser iguales o diferentes; el Anillo B es un anillo seleccionado entre



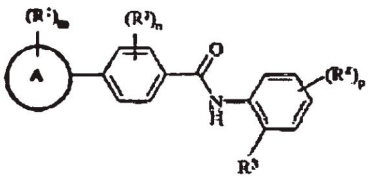
en los que, X^1 y X^2 se seleccionan entre CH o N; e Y^1, Y^2, Y^3 e Y^4 se seleccionan entre CH o N con la condición de que al menos uno de Y^1, Y^2, Y^3 e Y^4 sea N; R^2 es halo; n es 0, 1 ó 2; en la que los valores de R^2 pueden ser iguales o diferentes; R^3 es amino o hidroxi; R^4 es halo, nitro, ciano, hidroxi, trifluorometilo, trifluorometoxi, amino, carboxi, carbamoílo, mercapto, sulfamoílo, alquilo C_{1-3}, alquenilo C_{2-3}, alquinilo C_{1-3}, alcoxi C_{1-3}, alcanoílo C_{1-3}, alcanoiloxi C_{1-3}, N-(alquil C_{1-3})amino, N,N-(alquil C_{1-3})$_2$amino, alcanoilamino C_{1-3}, N-(alquil C_{1-3})carbamoílo, N,N-(alquil C_{1-3})$_2$carbamoílo, alquil C_{1-3}-$S(O)_a$, en el que a es de 0 a 2, alcoxicarbonilo C_{1-3}, N-(alquil C_{1-3})sulfamoílo, N,N-(alquil C_{1-3})$_2$sulfamoílo; y p es 0, 1 ó 2; en la que los valores de R^4 pueden ser iguales o diferentes; o una sal farmacéuticamente aceptable o hidroestable *in vivo*, éster o amida de los mismos. Véase, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2003092686.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un compuesto de alfa-cetoepóxido, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2003099272, que tienen la fórmula general:



En la que A es un grupo cíclico seleccionado entre el grupo que consiste en cicloalquilo C_{3-14}, heterocicloalquilo de 3-14 miembros, cicloalquenilo C_{4-14}, heterocicloalquenilo de 3-8 miembros, arilo y heteroarilo; estando el resto cíclico opcionalmente sustituido con alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilo, hidroxilalquilo, halo, haloalquilo, amino, tio, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciltio, alquilcarboniloxi, alquiloxicarbonilo, alquilcarbonilo, alquilsulfonilamino, aminosulfonilo, o alquilsulfonilo; o A es una cadena de hidrocarburo C_{3-12} ramificada saturada o una cadena de hidrocarburo C_{3-12} ramificada insaturada, interrumpida opcionalmente por -O-, -S-, -N(R^a)-, -C(O)-, -N(R^a)-SO_2-, -SO2-N(R^a)-, -N(R^a)-C(O)-O-, -O-C(O)-N(R^a)-, -N(R^a)-C(O)-N(R^b)-, -O-C(O)-, -C(O)-O-, -O-SO_2 -, -SO_2-O- o -O-C(O)-O-, en el que cada uno de R^a y R^b, independientemente, es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilalquilo, hidroxilo o haloalquilo; estando cada una de las cadenas de hidrocarburo ramificadas, saturadas o insaturadas, opcionalmente sustituidas con alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilo, hidroxilalquilo, halo, haloalquilo, amino, tio, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciltio, alquilcarboniloxi, alquiloxicarbonilo, alquilcarbonilo, alquilsulfonilamino, aminosulfonilo o alquilsulfonilo; cada uno de Y^1 e Y^2 es independientemente -CH_2-, -O-, -S-, -N(R^c)-, -N(R^c)-C(O)-O-, -N(R^c)-C(O)-, -C(O)-N(R^c)-, -O-C(O)-N(R^c)-, -N(R^c)-C(O)-N(R^d)-, -C(O)-, -C(NR^c)-, -O-C(O)-O- o un enlace; siendo cada uno de R^c y R^d independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilalquilo, hidroxilo o haloalquilo; L es una cadena de hidrocarburo C_{4-12} que contiene opcionalmente al menos un doble enlace, al menos un triple enlace o al menos un doble enlace y un triple enlace; estando la cadena de hidrocarburo opcionalmente sustituida con alquilo C_{1-4}, alquenilo C_{2-4}, alquinilo C_{2-4}, alcoxi C_{1-4}, hidroxilo, halo, amino, tio, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciltio, nitro, ciano, cicloalquilo C_{3-5}, heterocicloalquilo de 3-5 miembros, arilo monocíclico, heteroarilo de 5-6 miembros, alquilcarboniloxi C_{1-4}, alquiloxicarbonilo C_{1-4}, alquilcarbonilo C_{1-4} o formilo; y estando opcionalmente interrumpida adicionalmente por -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(O)-O-, -O-C(O)-N(R^e)-, -N(R^e)-C(O)-N(R^f)- o -O-C(O)-O-; siendo cada uno de R^e y R^f independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilalquilo, hidroxilo o haloalquilo; X^1 es O o S; y cada uno de R^g, R^h y R^i, independientemente, es hidrógeno o alquilo C_{1-6}; con la condición de que cuando cada uno de Y^1 e Y^2 independientemente, es un enlace o CH_2, A sea fenilo sin sustituir o heterociclilo y L sea C_{4-7}, L tanga al menos un doble enlace o al menos un triple enlace, y en el que cada uno de Y^1 e Y^2 sea un enlace, A sea fenilo sin sustituir y L sea C_4, L no sea un dieno; o una sal del mismo.

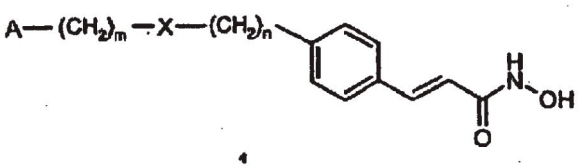
En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un derivado de benzamida, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2003087057, que tienen la fórmula general:



En la que el Anillo A es un heterociclilo, en el que si dicho heterociclilo contiene un resto -NH-, ese nitrógeno puede estar opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre K; R^1 es un sustituyente sobre carbono y se

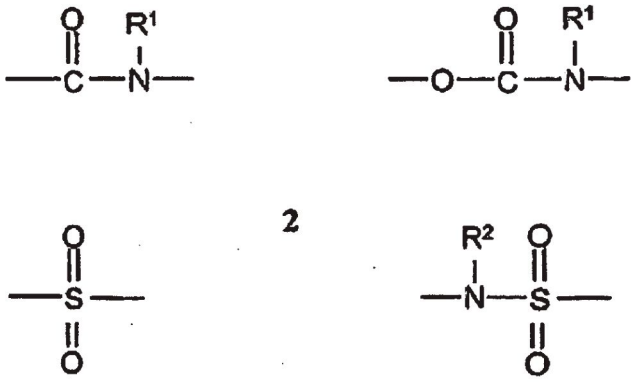
selecciona entre halo, nitro, ciano, hidroxi, trifluorometilo, trifluorometoxi, amino, carboxi, carbamoílo, mercapto, sulfamoílo, alquilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, alcoxi C_{1-6}, alcanoílo C_{1-6}, alcanoiloxi C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})amino, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$amino, alcanoilamino C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})carbamoílo, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$carbamoílo, alquil C_{1-6}-S(O)$_a$, en el que a es de 0 a 2, alcoxicarbonilo C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})sulfamoílo, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$sulfamoílo, arilo, ariloxi, arilalquilo C_{1-6}, grupo heterocíclico, (grupo heterocíclico)alquilo C_{1-6} o un grupo (B-E-); en la que R^1, incluyendo el grupo (B-E-), puede estar opcionalmente sustituido sobre carbono por uno o más W; y en el que si dicho grupo heterocíclico contiene un resto -NH-, ese nitrógeno puede estar opcionalmente sustituido con J; W es halo, nitro, ciano, hidroxi, trifluorometilo, trifluorometoxi, amino, carboxi, carbamoílo, mercapto, sulfamoílo, alquilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, alcoxi C_{1-6}, alcanoílo C_{1-6}, alcanoiloxi C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})amino, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$amino, alcanoilamino C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})carbamoílo, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$carbamoílo, alquil C_{1-6}-S(O)$_a$, en el que a es de 0 a 2, alquiloxicarbonilo C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})sulfamoílo, N. N-(alquil C_{1-6})$_2$sulfamoílo o un grupo (B'-E'-); en el que W, incluyendo el grupo (B'-E'-), puede estar opcionalmente sustituido sobre carbono por uno o más Y; Y y Z se seleccionan independientemente entre halo, nitro, ciano, hidroxi, trifluorometilo, trifluorometoxi, amino, carboxi, carbamoílo, mercapto, sulfamoílo, alquilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, alcoxi C_{1-6}, alcanoílo C_{1-6}, alcanoiloxi C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})amino, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$amino, alcanoilamino C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})carbamoílo, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$carbamoílo, alquil C_{1-6}S(O)$_a$, en el que a es de 0 a 2, alcoxicarbonilo C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})sulfamoílo o N,N-(alquil C_{1-6})$_2$sulfamoílo; G, J y K se seleccionan independientemente entre alquilo C_{1-8}, alquenilo C_{2-8}, alcanoílo C_{1-8}, alquilsulfonilo C_{1-8}, alcoxicarbonilo C_{1-8}, carbamoílo, N-(alquil C_{1-8})carbamoílo, N,N-(alquil C_{1-8})carbamoílo, benciloxicarbonilo, benzoílo, fenilsulfonilo, arilo, arilalquilo C_{1-6} o (grupo heterocíclico)alquilo C_{1-6}; en el que G, J y K pueden estar opcionalmente sustituidos sobre carbono por uno o más Q; y en el que si dicho grupo heterocíclico contiene un resto -NH-, ese nitrógeno puede estar opcionalmente sustituido con hidrógeno o alquilo C_{1-6}; Q es halo, nitro, ciano, hidroxi, trifluorometilo, trifluorometoxi, amino, carboxi, carbamoílo, mercapto, sulfamoílo, alquilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, alcoxi C_{1-6}, alcanoílo C_{1-6}, alcanoiloxi C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})amino, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$amino, alcanoilamino C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})carbamoílo, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$carbamoílo, alquil C_{1-6}-S(O)$_a$, en el que a es de 0 a 2, alcoxicarbonilo C_{1-6}, alcoxicarbonilamino C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})sulfamoílo, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$sulfamoílo, arilo, ariloxi, arilalquilo C_{1-6}, arilalcoxi C_{1-6}, grupo heterocíclico, (grupo heterocíclico)alquilo C_{1-6}, (grupo heterocíclico)alcoxi C_{1-6} o un grupo (B"-E"-); en la que Q, incluyendo el grupo (B"-E"-), puede estar opcionalmente sustituido sobre carbono por uno o más Z; B, B' y B" se seleccionan independientemente entre alquilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, cicloalquilo C_{3-8}, cicloalquil C_{3-8}-alquilo C_{1-6}, arilo, arilalquilo C_{1-6}, grupo heterocíclico, (grupo heterocíclico)alquilo C_{1-6}, fenilo o fenilalquilo C_{1-6}; en la que B, B' y B" pueden estar opcionalmente sustituidos sobre carbono por uno o más D; y en el que si dicho grupo heterocíclico contiene un resto -NH-, ese nitrógeno puede estar opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre G; E, E' y E" se seleccionan independientemente entre -N(R^a)-, -O-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-, - N(R^a)C(O)-, -N(R^a)C(O)N(R^b)-, -N(R^a)C(O)O-, -OC(O)N(R^a)-, -C(O)N(R^a)-, -S(O)$_r$-, -SO_2N(R^a)-, -N(R^a)SO_2-; en los que R^a y R^b se seleccionan independientemente entre hidrógeno o alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido con uno o más F, y r es 0-2; D y F se seleccionan independientemente entre halo, nitro, ciano, hidroxi, trifluorometilo, trifluorometoxi, amino, carboxi, carbamoílo, mercapto, sulfamoílo, alquilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, alcoxi C_{1-6}, alcanoílo C_{1-6}, alcanoiloxi C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})amino, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$amino, alcanoilamino C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})carbamoílo, N,N-(alquil C_{1-6})$_2$carbamoílo, alquil C_{1-6}S(O)$_a$, en el que a es de 0 a 2, alcoxicarbonilo C_{1-6}, N-(alquil C_{1-6})sulfamoílo o N,N-(alquil C_{1-6})$_2$sulfamoílo; m es 0, 1, 2, 3 ó 4; en el que los valores de R^1 pueden ser iguales o diferentes; R^2 es halo; n es 0, 1 ó 2; en el que los valores de R^2 pueden ser iguales o diferentes; R^3 es amino o hidroxi; R^4 es halo, nitro, ciano, hidroxi, trifluorometilo, trifluorometoxi, amino, carboxi, carbamoílo, mercapto, sulfamoílo, alquilo C_{1-3}, alquenilo C_{2-3}, alquinilo C_{2-3}, alcoxi C_{1-3}, alcanoílo C_{1-3}, alcanoiloxi C_{1-3}, N-(alquil C_{1-3})amino, N,N-(alquil C_{1-3})$_2$amino, alcanoilamino C_{1-3}, N-(alquil C_{1-3})carbamoílo, N,N-(alquil C_{1-3})$_2$carbamoílo, alquil C_{1-3}S(O)$_a$, en el que a es de 0 a 2, alcoxicarbonilo C_{1-3}, N-(alquil C_{1-3})sulfamoílo, N,N-(alquil C_{1-3})$_2$sulfamoílo; p es 0, 1 ó 2; en el que los valores de R^4 pueden ser iguales o diferentes; o una sal farmacéuticamente aceptable, éster hidrolizable *in vivo* o amida de los mismos; con la condición de que dicho compuesto no sea N-(2-amino-6-hidroxifenil)-4-1-metilhomopiperazin-4-il)benzamida; N-(2-amino-6-metilfenil)-4-(1-metilhomopiperazin-4-il)benzamida; N-(2-aminofenil)-4-(1-t-butoxicarbonilhomopiperazin-4-il)benzamida; o N-(2-aminofenil)-4-(1-metilhomopiperazin-4-il)benzamida.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un derivado de ácido hidroxámico, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2003087066, que tienen la fórmula general:



En la que A es un fenilo opcionalmente sustituido o un grupo heterocíclico aromático que tiene de 1 a 4 sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 carbonos, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 4 carbonos, un grupo aminoalquilo que tiene de 1 a 4 carbonos, un grupo alquilamino que tiene de 1 a 4 carbonos, un grupo acilo que tiene de 1 a 4 carbonos, un grupo acilamino que tiene de 1 a 4 carbonos, un grupo alquiltio que tiene de 1 a 4

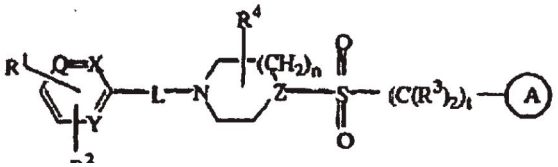
carbonos, un grupo perfluoroalquilo que tiene de 1 a 4 carbonos, un grupo perfluoroalcoxi que tiene de 1 a 4 carbonos, un grupo carboxilo, un grupo alcoxicarbonilo que tiene de 1 a 4 carbonos, un grupo fenilo, un grupo heterocíclico aromático y un grupo heterocíclico, estando dicho grupo heterocíclico opcionalmente sustituido con un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 carbonos, un grupo bencilo o un grupo piridilmetilo; m es un número entero de 0 a 4; n es un número entero de 1 a 4; X es un resto que tiene una estructura seleccionada entre las que se ilustran en la fórmula



2

R^1 y R^2 son independientemente H o un grupo alquilo opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 4 carbonos; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un derivado de sulfonilo, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2003076422, que tienen la fórmula general:



las formas *N*-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas de los mismos, en la que n es 0, 1, 2 ó 3 y cuando n es 0, entonces se pretende un enlace directo; t es 0, 1, 2, 3 ó 4 y cuando t es 0, entonces se pretende un enlace directo; cada Q es nitrógeno o

cada X es nitrógeno o

cada Y es nitrógeno o

cada Z es nitrógeno o

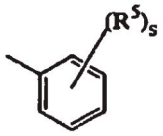
R^1 es $-C(O)NR^7R^8$, $-N(H)C(O)R^9$, -C(O)-alcanodiil $C_{1-6}SR^9$, $-NR^{10}C(O)N(OH)R^9$, - $NR^{10}C(O)$alcanodiil $C_{1-6}SR^9$, $-NR^{10}C(O)C=N(OH)R^9$ o otro grupo quelante de Zn en el que cada uno de R^7 y R^8 se selecciona independientemente entre hidrógeno, hidroxi, alquilo C_{1-6}, hidroxialquilo C_{1-6}, aminoalquilo C_{1-6} o aminoarilo; R^9 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_{1-6}, alquilcarbonilo C_{1-6}, arilalquilo C_{1-6}, alquilpirazinilo C_{1-6}, piridinona, pirrolidinona o metilimidazolilo; R^{10} se selecciona independientemente entre hidrógeno o alquilo C_{1-6};

R^2 es hidrógeno, halo, hidroxi, amino, nitro, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, trifluorometilo, di(alquil C_{1-6})amino, hidroxiamino o naftalenilsulfonilpirazinilo;

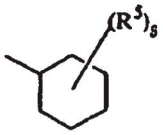
-L- es un enlace directo o un radical bivalente seleccionado entre alcanodiilo C_{1-6}, amino, carbonilo o aminocarbonilo; cada R^3 representa un átomo de hidrógeno y un átomo de hidrógeno puede estar reemplazado con arilo;

R^4 es hidrógeno, hidroxi, amino, hidroxialquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, arilalquilo C_{1-6}, aminocarbonilo, hidroxicarbonilo, aminoalquilo C_{1-6}, aminocarbonilalquilo C_{1-6}, hidroxicarbonilalquilo C_{1-6}, hidroxiaminocarbonilo, alquiloxicarbonilo C_{1-6}, alquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6} o di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6};

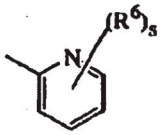
es un radical seleccionado entre



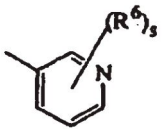
(a-1)



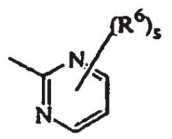
(a-2)



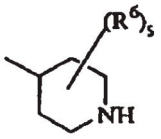
(a-3)



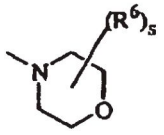
(a-4)



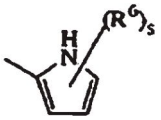
(a-5)



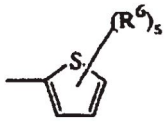
(a-6)



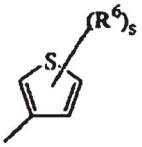
(a-7)



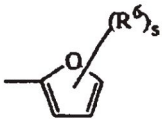
(a-8)



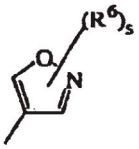
(a-9)



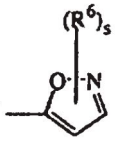
(a-10)



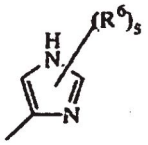
(a-11)



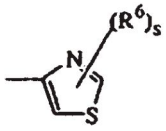
(a-12)



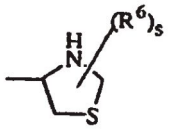
(a-13)



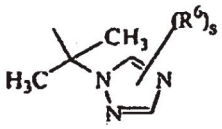
(a-14)



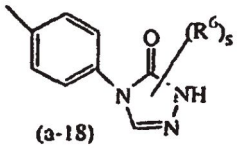
(a-15)



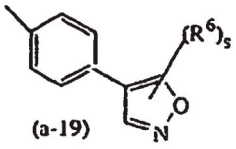
(a-16)



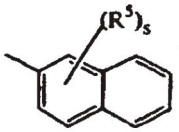
(a-17)



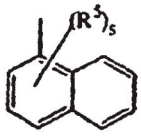
(a-18)



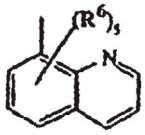
(a-19)



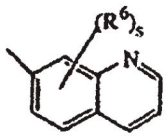
(a-20)



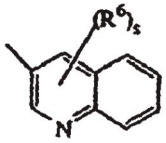
(a-21)



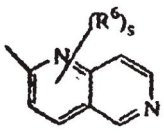
(a-22)



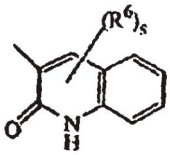
(a-23)



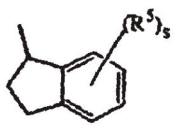
(a-24)



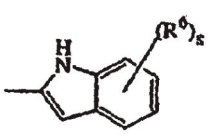
(a-25)



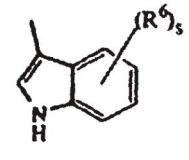
(a-26)

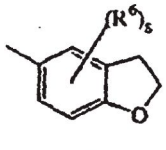


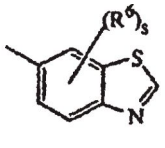
(a-27)

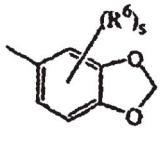


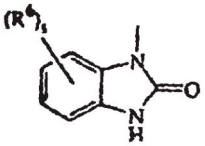
(a-28)

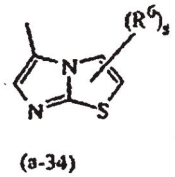

(a-29)

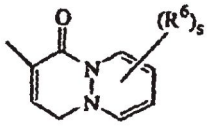

(a-30)

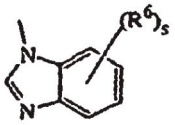

(a-31)

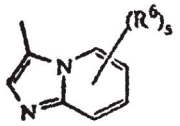

(a-32)

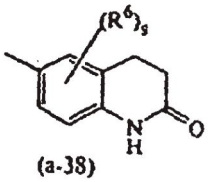

(a-33)

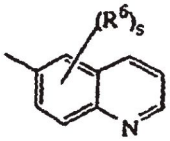

(a-34)

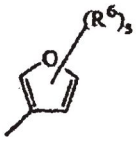

(a-35)

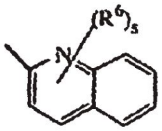

(a-36)

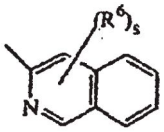

(a-37)

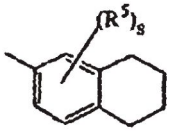

(a-38)

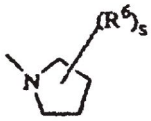

(a-39)

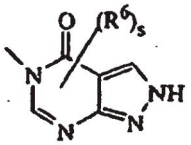

(a-40)

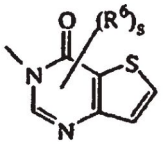

(a-41)

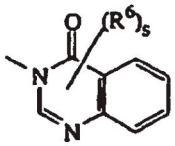

(a-42)

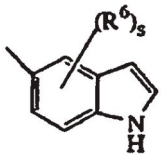

(a-43)

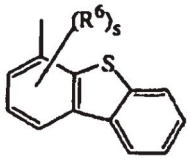

(a-44)

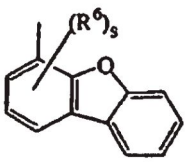

(a-45)

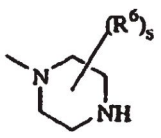

(a-46)


(a-47)


(a-48)


(a-49)


(a-50)


(a-51)

en los que cada s es independientemente 0, 1, 2, 3, 4 ó 5;

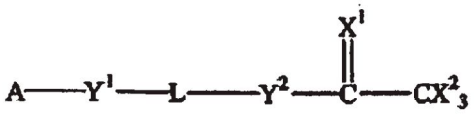
cada R^5 y R^6 se seleccionan independientemente entre hidrógeno; halo; hidroxi; amino; nitro; trihaloalquilo C_{1-6}; trihaloalquiloxi C_{1-6}; alquilo C_{1-6}; alquilo C_{1-6} sustituido con arilo y cicloalquilo C_{3-10}; alquiloxi C_{1-6}; alquiloxi C_{1-6}-alquiloxi C_{1-6}; alquilcarbonilo C_{1-6}; alquiloxicarbonilo C_{1-6}; alquilsulfonilo C_{1-6}; cianoalquilo C_{1-6}; hidroxialquilo C_{1-6};

hidroxialquiloxi C_{1-6}; hidroxialquilamino C_{1-6}; aminoalquiloxi C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminocarbonilo; di(hidroxialquil C_{1-6})amino; (aril)(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquiloxi C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; arilsulfonilo; arilsulfonilamino; ariloxi; ariloxialquilo C_{1-6}; arilalquenodiilo C_{2-6}; di(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})amino(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})amino(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminoalquil C_{1-6}-(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquil C_{1-6}-(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; aminosulfonilamino(C_{1-6}alquil)amino; aminosulfonilamino(C_{1-6}alquil) aminoalquilo C_{1-6}; di(C_{1-6}alquil)aminosulfonilamino(C_{1-6}alquil)amino; di(alquil C_{1-6}) aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; ciano; tiofenilo; tiofenilo sustituido con di(alquil C_{1-6})aminoalquil C_{1-6}-(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, alquil C_{1-6}-piperazinilalquilo C_{1-6}, hidroxialquil C_{1-6}-piperazinilalquilo C_{1-6}, hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}, alquiloxipiperidinilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}-piperidinilalquilo C_{1-6}, morfolinilalquilo C_{1-6}, hidroxialquil C_{1-6}-(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6} o di(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; furanilo; furanilo sustituido con hidroxialquilo C_{1-6}; benzofuranilo; imidazolilo; oxazolilo; oxazolilo sustituido con arilo y alquilo C_{1-6}; alquiltriazolilo C_{1-6}; tetrazolilo; pirrolidinilo; pirrolilo; piperidinilalquiloxi C_{1-6}; morfolinilo; alquilmorfolinilo C_{1-6}; morfolinilalquiloxi C_{1-6}; morfolinilalquilo C_{1-6}; morfolinilalquilamino C_{1-6}; morfolinilo C_{1-6}, alquilaminoalquilo C_{1-6}; piperazinilo; alquilpiperazinilo C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquiloxi C_{1-6}; piperazinilalquilo C_{1-6}; naftalenilsulfonilpiperazinilo; naftalenilsulfonilpiperidinilo; naftalenilsulfonilo: alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilamino C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquilpiperazinilsulfonilo C_{1-6}; aminosulfonilpiperazinilalquiloxi C_{1-6}; aminosulfonilpiperazinilo; aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilo; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}; hidroxialquilpiperazinilo C_{1-6}; hidroxialquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquiloxipiperidinilo C_{1-6}; alquiloxi C_{1-6}-piperidinilalquilo C_{1-6}; piperidinilaminoalquilamino C_{1-6}; piperidinilaminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; (alquilpiperidinil C_{1-6})(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}; (alquilpiperidinil C_{1-6})(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; (hidroxialquil C_{1-6})(alquil C_{1-6})amino; (hidroxialquil C_{1-6})(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; hidroxialquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; di(hidroxialquil C_{1-6}) aminoalquilo C_{1-6}; pirrolidinilalquilo C_{1-6}; pirrolidinilalquiloxi C_{1-6}; pirazolilo; tiopirazolilo; pirazolilo sustituido con dos sustituyentes seleccionados entre alquilo C_{1-6} o trihaloalquilo C_{1-6}; piridinilo; piridinilo sustituido con alquiloxi C_{1-6}, ariloxi o arilo; pirimidinilo; tetrahidropirimidinilpiperazinilo; tetrahidropirimidinilpiperazinilalquilo C_{1-6}; quinolinilo; indolilo; fenilo; fenilo sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, amino, nitro, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, hidroxialquilo C_{1-4}, trifluorometilo, trifluorometiloxi, hidroxialquiloxi C_{1-4}, alquilsulfonilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-4}-alquiloxi C_{1-4}, alquiloxicarbonilo C_{1-4}, aminoalquiloxi C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquiloxi C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminocarbonilo, di(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})amino(alquil C_{1-4}) amino, di(alquil C_{1-4})amino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquil C_{1-4}-(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminoalquil C_{1-4}-(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})amino, aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-6}, ciano, piperidinilalquiloxi C_{1-4}, pirrolidinilalquiloxi C_{1-4}, aminosulfonilpiperazinilo, aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilpiperazinilo, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-4}, hidroxialquilpiperazinilo C_{1-4}, hidroxialquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, alquiloxipiperidinilo C_{1-4}, alquiloxi C_{1-4}-piperidinilalquilo C_{1-4}, hidroxialquiloxi C_{1-4}-alquilpiperazinilo C_{1-4}, hidroxialquiloxi C_{1-4}-alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, (hidroxialquil C_{1-4})(alquil C_{1-4})amino, (hidroxialquil C_{1-4})(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(hidroxialquil C_{1-4})amino, di(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, furanilo, furanilo sustituido con -CH=CH-CH=CH-, pirrolidinilalquilo C_{1-4}, pirrolidinilalquiloxi C_{1-4}, morfolinilo, morfolinilalquiloxi C_{1-4}, morfolinilalquilo C_{1-4}, morfolinilalquilamino C_{1-4}, morfolinilalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, piperazinilo, alquilpiperazinilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquiloxi C_{1-4}, piperazinilalquilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilamino C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-6}, tetrahidropirimidinilpiperazinilo, tetrahidropirimidinilpiperazinilalquilo C_{1-4}, piperidinilaminoalquilamino C_{1-4}, piperidinilaminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, (alquilpiperidinil C_{1-4})(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}, (alquilpiperidinil C_{1-4})(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, piridinilalquiloxi C_{1-4}, hidroxialquilamino C_{1-4}, hidroxialquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}, aminotiadiazolilo, aminosulfonilpiperazinilalquiloxi C_{1-4} o tiofenilalquilamino C_{1-4};

el resto central

también puede estar puenteado (es decir, formando un resto bicíclico) con un puente de metileno, etileno o propileno; cada R^5 y R^6 puede situarse en el nitrógeno en sustitución del hidrógeno; en los anteriores, arilo es fenilo o fenilo sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados cada uno independientemente entre halo, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, trifluorometilo, ciano o hidroxicarbonilo.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un compuesto de trihalometilcarbonilo, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2003099760, que tienen la fórmula general:



en la que el resto cíclico A se selecciona entre el grupo que consiste en cicloalquilo C_{3-14}, heterocicloalquilo de 3-14 miembros, cicloalquenilo C_{4-14}, heterocicloalquenilo de 3-8 miembros, arilo y heteroarilo; estando el resto cíclico opcionalmente sustituido con alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilo, hidroxilalquilo, halo, haloalquilo, amino, tio, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciltio, alquilcarboniloxi, alquiloxicarbonilo, alquilcarbonilo, alquilsulfonilamino, aminosulfonilo, o alquilsulfonilo; o A es una cadena de hidrocarburo C_{3-12} ramificada saturada o una cadena de hidrocarburo C_{3-12} ramificada insaturada opcionalmente interrumpida por -O-, -S-, -N(R^a)-, -C(O)-, -N(R^a)-SO_2-, -SO_2-N(R^a)-, -N(R^a)-C(O)-O-, -O-C(O)-N(R^a)-, -N (R^a)-C(O)-N(R^b)-, -O-C(O)-, -C(O)-O-, -O-SO_2-, -SO_2-O- o -O-C(O)-O-, en la que cada uno de R^a y R^b, independientemente caracterizado, es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilalquilo, hidroxilo, o haloalquilo; estando cada una de las cadenas de hidrocarburo ramificadas, saturadas o insaturadas opcionalmente sustituida con alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilo, hidroxilalquilo, halo, haloalquilo, amino, tio, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciltio, alquilcarboniloxi, alquiloxicarbonilo, alquilcarbonilo, alquilsulfonilamino, aminosulfonilo o alquilsulfonilo; cada uno de Y^1 e Y^2 es independientemente -O-, -S-, -N(R^c)-, -N(R^c)-C(O)-O-, -N(R^c)-C(O)-, -C(O)-N(R^c)-, -O-C(O)- N(R^c)-, -N(R^c)-C(O)-N(R^d)-, -O-C(O)-O- o un enlace; siendo cada uno de R^c y R^d independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilalquilo, hidroxilo, o haloalquilo; L es una cadena hidrocarburo C_{3-12} lineal que contiene opcionalmente al menos un doble enlace, al menos un triple enlace o al menos un doble enlace y un triple enlace; estando la cadena de hidrocarburo opcionalmente sustituida con alquilo C_{1-4}, alquenilo C_{2-4}, alquinilo C_{2-4}, alcoxi C_{1-4}, hidroxilo, halo, amino, tio, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciltio, nitro, ciano, cicloalquilo C_{3-5}, heterocicloalquilo de 3-5 miembros, arilo monocíclico, heteroarilo de 5-6 miembros, alquilcarboniloxi C_{1-4}, alquiloxicarbonilo C_{1-4}, alquilcarbonilo C_{1-4} o formilo; y estando adicionalmente interrumpida opcionalmente por -O-, -N(R^e)-, - N(R^e)-C(O)-O-, -O-C(O)-N(R^e)-, - N(R^e)-C(O)-N(R^f)- o -O-C(O)-O-; cada R^e y

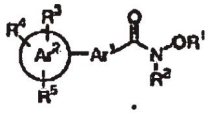
siendo R^f independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilalquilo, hidroxilo o haloalquilo, y X^1 es O o S; X^2 es un halógeno; con la condición de que cuando cada uno Y^1 e Y^2 es un enlace, L sea una cadena de hidrocarburo C_{6-12} que contenga al menos un doble enlace en C1, C2, C3 o C5 de la cadena de hidrocarburo de C=X^1, al menos un triple enlace o al menos un doble enlace o un triple enlace, estando la cadena de hidrocarburo opcionalmente sustituida con alquilo C_{1-4}, alquenilo C_{2-4}, alquinilo C_{2-4}, alcoxi C_{1-4}, hidroxilo, halo, amino, tio, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciltio, nitro, ciano, cicloalquilo C_{3-5}, heterocicloalquilo de 3-5 miembros, arilo monocíclico, heteroarilo de 5-6 miembros, alquilcarboniloxi C_{1-4}, alquiloxicarbonilo C_{1-4}, alquilcarbonilo C_{1-4} o formilo; y estando opcionalmente interrumpido por -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(O)-O-, -O-C(O)-N(R^e)-, -N(R^e)-C(O)-N(R^f)- o -O-C(O)-O-; siendo cada uno de R^e y R^f independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilalquilo, hidroxilo o haloalquilo; o una sal de mismos.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un compuesto de alfa-chalcogenmetilcarbonilo, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2003099789, que tienen la fórmula general:

en la que A es un resto cíclico seleccionado entre el grupo que consiste en cicloalquilo C_{1-4}, heterocicloalquilo de 3-14 miembros, cicloalquenilo C_{4-14}, heterocicloalquenilo de 3-8 miembros, arilo y heteroarilo; estando el resto cíclico opcionalmente sustituido con alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilo, hidroxilalquilo, halo, haloalquilo, amino, tio, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciltio, alquilcarboniloxi, alquiloxicarbonilo, alquilcarbonilo, alquilsulfonilamino, aminosulfonilo, o alquilsulfonilo; o A es una cadena de hidrocarburo C_{3-12} ramificada saturada o un cadena de hidrocarburo C_{3-12} insaturada ramificada, opcionalmente interrumpida por y -O-, -S-, -N(R^a) -, -C(O)-, -N(R^a)-SO_2-, -SO_2-N(R^a)-, -N(R^a)-C(O)-O-, -O-C(O)-N(R^a)-, -N(R^a)-C(O)-N(R^b)-, -O-C(O)-, -C(O)-O-, -O-SO_2-, -SO_2-O- o -O-C(O)-O-, en los que cada uno de R^a y R^b, independientemente caracterizado, es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilalquilo, hidroxilo o haloalquilo; estando cada una de las cadenas de hidrocarburos ramificadas, saturadas e insaturadas opcionalmente sustituida con alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilo, hidroxilalquilo, halo, haloalquilo, amino, tio, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciltio, alquilcarboniloxi, alquiloxicarbonilo, alquilcarbonilo, alquilsulfonilamino, aminosulfonilo o alquilsulfonilo; cada uno de Y^1 e Y^2 es independientemente -CH_2-, -O-, -S-, -N(R^c)-, -N(R^c)-C(O)-O-, -N(R^c)-C (O)-, -C(O)-N(R^c)-, -O- C(O)-N(R^c)-, -N(R^c)-C(O)-N(R^d)-, -O-C(O)-O- o un enlace; siendo cada uno de R^c y R^d independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilalquilo, hidroxilo o haloalquilo; L es una cadena de hidrocarburo C_{3-12} lineal que contiene opcionalmente al menos un doble enlace, al menos un triple enlace o al menos un doble enlace y un triple enlace; estando la cadena de hidrocarburo opcionalmente sustituida con alquilo C_{1-4}, alquenilo C_{2-4}, alquinilo C_{1-4}, alcoxi C_{1-4}, hidroxilo, halo, amino, tio, alquiltio,

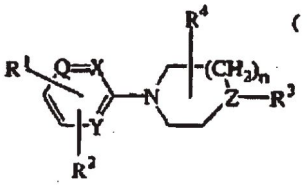
ariltio, aralquiltio, aciltio, nitro, ciano, cicloalquilo C_{3-5}, heterocicloalquilo de 3-5 miembros, arilo monocíclico, heteroarilo de 5-6 miembros, alquilcarboniloxi C_{1-4}, alquiloxicarbonilo C_{1-4}, alquilcarbonilo C_{1-4} o formilo; y estando opcionalmente interrumpida por -O-, -N(R^e)-, -N(R^e-C(O)-O-, -O-C(O)-N(R^e)-, - N(R^e)-C(O)-N(R^f)- o -O-C (O)-O-; siendo cada uno de R^e y R^f independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilalquilo, hidroxilo o haloalquilo; X^1 es O o S; y X^2 es - OR, -SR^1 o -SeR^1, en los que R es hidrógeno, alquilo, acilo, arilo o aralquilo; con la condición de que cuando Y^1 es un enlace y L esté saturado, el carbono adyacente a Y^1 no esté sustituido con alcoxi C_{1-4} o hidroxilo; o una sal de mismo.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un derivado de hidroxamato bicíclico, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2003066579, que tienen la fórmula general:



En la que R^1 es hidrógeno o alquilo; R^2 es hidrógeno; Ar^1 es fenileno o un anillo heteroarilo de seis miembros que contiene uno o dos átomos de nitrógeno en el anillo, siendo el resto de los átomos en el anillo carbono; en el que dicho grupo Ar^1 está opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados independientemente entre alquilo, halo, hidroxi, alcoxi, haloalcoxi o haloalquilo; Ar^2 es arilo, benzoimidazol-2-ilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo; R^3 es hidrógeno, alquilo, halo, hidroxi o alcoxi; y R^4 y R^5 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, halo, haloalquilo, nitro, ciano, carboxi, carboxialquilo, alcoxicarbonilo, fenilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo, heterocicloaminoalquilo, -X-R^6 o -(alquileno C_{1-6})-Y-R^7, en el que X e Y son independientemente -O-, -S-,-SO-, -SO_2-, -NRs-, -CO-, -NR^9CO-, -$CONR^{10}$, -$NR^{11}SO_2$-, -SO_2NR^{12}-, -NHC(O)O-, -OC(O)NH-, -$NR^{13}CONR^{14}$- o -$NR^{15}SO_2NR^{16}$-, en los que R^6 y R^7 son independientemente hidrógeno, alquilo, hidroxialquilo, fenilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo, fenilalquilo opcionalmente sustituido, fenoxialquilo opcionalmente sustituido, fenilalquenilo opcionalmente sustituido, fenilaminoalquilo opcionalmente sustituido, heteroaralquilo opcionalmente sustituido, heteroariloxialquilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilalquilo opcionalmente sustituido o cicloalquilalquilo; R^8, R^9, R^{11}, R^{13} y R^{15} son independientemente hidrógeno, alquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo o fenilalquilo opcionalmente sustituido; R^{10}, R^{12}, R^{14} y R^{16} son independientemente hidrógeno, alquilo, fenilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxi, hidroxialquilo, haloalquilo, alcoxialquilo, carboxialquilo, cianoalquilo, aminoalquilo, aminocarbonilalquilo, alquilaminocarbonilalquilo, dialquilaminocarbonilalquilo o acilo; o R^4 y R^5 forman juntos metilenodioxi; e isómeros individuales, mezclas de isómeros; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, con la condición de que: (i) al menos uno de R^3, R^4 y R^5 no sea hidrógeno; (ii) cuando Ar^2 es cicloalquilo, entonces al menos dos de R^3, R^4 y R^5 son hidrógeno; (iii) cuando R^1 y R^3 son hidrógeno, Ar^1 es fenileno y Ar^2 es fenilo y uno de R^4 y R^5 es metoxi, entonces el otro de R^4 y R^5 no sea -OR^6, en el que R^6 es S ciclopentilo o fenilpentilo; (iv) cuando Ar^1 es fenileno y Ar^2 es fenilo, entonces al menos uno de R^3, R^4 y R^5 no sea alquilo; (v) cuando Ar^1 es fenileno, Ar^2 es arilo y se sitúa en la posición 3 del anillo fenileno, entonces Ar^2 no esté sustituido con un fenilo opcionalmente sustituido; (vi) cuando Ar^1 es fenileno y Ar^2 es fenilo y R^4 o R^5 es - $CONR^{10}R^6$ o -(alquileno C_{1-6})-$CONR^{10}R^7$, entonces dicho R^4 o R^5 no esté situado en la posición 4 del anillo fenilo; y (vii) cuando Ar^1 es fenileno, Ar^2 es fenilo y dos de R^3, R^4 y R^5 son hidrógeno, entonces el resto de R^3, R^4 y R^5 no sea nitro.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un compuesto de la fórmula general:



las formas N-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas de la misma, en la que n es 0, 1, 2 ó 3 y cuando n es 0, entonces se pretende un enlace directo;

cada Q es nitrógeno o

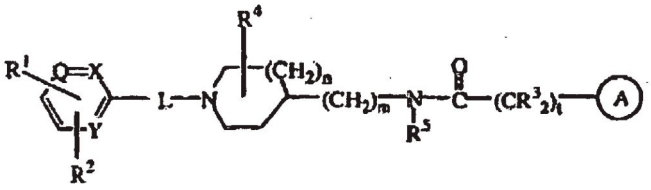
cada X es nitrógeno o

cada Y es nitrógeno o

cada Z es nitrógeno o

R^1 es -C(O)NR^5R^6, -N(H)C(O)R^7, -C(O)-alcanodiil C_{1-6}-SR^7, -NR^8C(O)N(OH)R^7, - NR^8C(O)alcanodiil C_{1-6}-SR^7, -NR^8C(O)C=N(OH)R^7 u otro grupo quelante de Zn, en el que cada uno de R^5 y R^6 se selecciona independientemente entre hidrógeno, hidroxi, alquilo C_{1-6}, hidroxialquilo C_{1-6}, aminoalquilo C_{1-6} o aminoarilo; R^7 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_{1-6}, alquilcarbonilo C_{1-6}, arilalquilo C_{1-6}, C_{1-6}alquilpirazinilo, piridinona, pirrolidinona o metilimidazolilo; R^8 se selecciona independientemente entre hidrógeno o alquilo C_{1-6}; R^2 es hidrógeno, halo, hidroxi, amino, nitro, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, trifluorometilo, di(alquil C_{1-6})amino, hidroxiamino o naftalenilsulfonilpirazinilo; R^3 es hidrógeno, alquilo C_{1-6}, arilalquenediil C_{2-6}, furanilcarbonilo, naftalenilcarbonilo, -C(O)fenilR^9, alquilaminocarbonilo C_{1-6}, aminosulfonilo, arilaminosulfonilo, aminosulfonilamino, di(alquil C_{1-6})aminosulfonilamino, arilaminosulfonilamino, aminosulfonilaminoalquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminosulfonilaminoalquilo C_{1-6}, arilaminosulfonilaminoalquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, alquilsulfonilo C_{1-12}, di(alquil C_{1-6})aminosulfonilo, trihaloalquilsulfonilo C_{1-6}, di(aril)alquilcarbonilo C_{1-6}, tiofenilalquilcarbonilo C_{1-6}, piridinilcarbonilo o arilalquilcarbonilo C_{1-6}, en el que cada R^9 se selecciona independientemente entre fenilo; fenilo sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, amino, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, hidroxialquilo C_{1-4}, hidroxialquiloxi C_{1-4}, aminoalquiloxi C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquiloxi C_{1-4}, di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminoalquil C_{1-6}-(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, hidroxialquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, alquiloxi C_{1-4}-piperidinilalquilo C_{1-4}, hidroxialquiloxi C_{1-4}-alquilpiperazinilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, di(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, pirrolidinilalquiloxi C_{1-4}, morfolinilalquiloxi C_{1-4} o morfolinilalquilo C_{1-4}; tiofenilo; o tiofenilo sustituido con di(alquil C_{1-4})aminoalquiloxi C_{1-4}, di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminoalquil C_{1-6}-(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, pirrolidinilalquiloxi C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, di(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquil C_{1-4} o morfolinilalquiloxi C_{1-4}. R^4 es hidrógeno, hidroxi, amino, hidroxialquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, arilalquilo C_{1-6}, aminocarbonilo, hidroxicarbonilo, aminoalquilo C_{1-6}, aminocarbonilalquilo C_{1-6}, hidroxicarbonilalquilo C_{1-6}, hidroxiaminocarbonilo, alquiloxicarbonilo C_{1-6}, alquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6} o di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; cuando R^3 y R^4 están presentes en el mismo átomo de carbono, R^3 y R^4 pueden formar juntos un radical bivalente de fórmula -C(O)-NH-CH_2-NR^{10}-, en la que R^{10} es hidrógeno o arilo; cuando R^3 y R^4 están presentes en átomos de carbono adyacentes, R^3 y R^4 pueden formar juntos un radical bivalente de fórmula =CH-CH=CH-CH=; en los anteriores, arilo es fenilo o fenilo sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados cada uno independientemente entre halo, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, trifluorometilo, ciano o hidroxicarbonilo. Véase, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2003075929.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un derivado de carbonilamino, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2003076395, que tienen la fórmula general:



las formas N-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas de las mismas, en la que n es 0, 1, 2 ó 3 y cuando n es 0, entonces se pretende un enlace directo; m es 0 ó 1 y cuando m es 0, entonces se pretende un enlace directo; t es 0, 1, 2, 3 ó 4 y cuando t es 0, entonces se pretende un enlace directo;

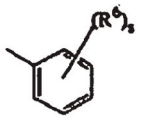
cada Q es nitrógeno o

cada X es nitrógeno o

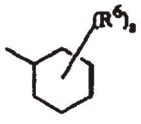
cada Y es nitrógeno o

R^1 es $-C(O)NR^8R^9$, $-NHC(O)R^{10}$, -C(O)-alcanodiil C_{1-6}-SR^{10}, $-NR^{11}C(O)N(OH)R^{10}$, $-NR^{11}C(O)$alcanodiil C_{1-6}-SR^{10}, $-NR^{11}C(O)C=N(OH)R^{10}$ u otro grupo quelante de Zn, en el que cada uno de R^8 y R^9 se selecciona independientemente entre hidrógeno, hidroxi, alquilo C_{1-6}, hidroxialquilo C_{1-6}, aminoalquilo C_{1-6} o aminoarilo; R^{10} es hidrógeno, alquilo C_{1-6}, alquilcarbonilo C_{1-6}, arilalquilo C_{1-6}, alquilpirazinilo C_{1-6}, piridinona, pirrolidinona o metilimidazolilo; R^{11} es hidrógeno o alquilo C_{1-6}; R^2 es hidrógeno, halo, hidroxi, amino, nitro, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, trifluorometilo, di(alquil C_{1-6})amino, hidroxiamino o naftalenilsulfonilpirazinilo; -L- es un enlace directo o un radical bivalente seleccionado entre alcanodiilo C_{1-6}, alcanodiiloxi C_{1-6}, amino, carbonilo o aminocarbonilo; cada R^3 representa independientemente un átomo de hidrógeno y un átomo de hidrógeno puede estar reemplazado con un sustituyente seleccionado entre arilo; R^4 es hidrógeno, hidroxi, amino, hidroxialquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, arilalquilo C_{1-6}, aminocarbonilo, hidroxicarbonilo, aminoalquilo C_{1-6}, aminocarbonilalquilo C_{1-6}, hidroxicarbonilalquilo C_{1-6}, hidroxiaminocarbonilo, alquiloxicarbonilo C_{1-6}, alquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6} o di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; R^5 es hidrógeno, alquilo C_{1-6}, cicloalquilo C_{1-10}, hidroxialquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6} o arilo;

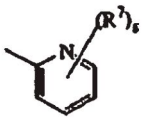
es un radical seleccionado entre



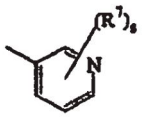
(a-1)



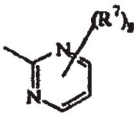
(a-2)



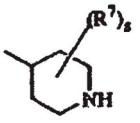
(a-3)



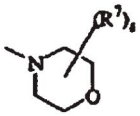
(a-4)



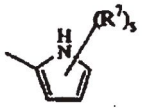
(a-5)



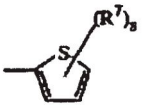
(a-6)



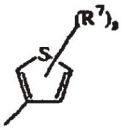
(a-7)



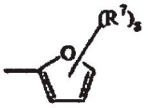
(a-8)



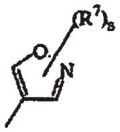
(a-9)



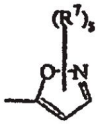
(a-10)



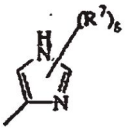
(a-11)



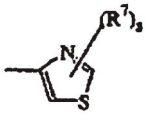
(a-12)



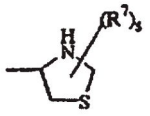
(a-13)



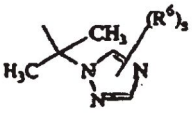
(a-14)



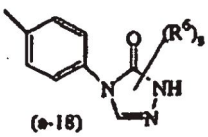
(a-15)



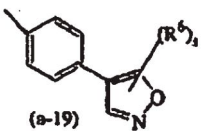
(a-16)



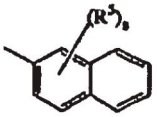
(a-17)



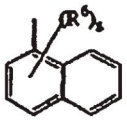
(a-18)



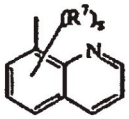
(a-19)



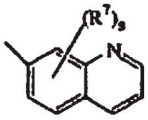
(a-20)



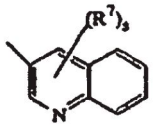
(a-21)



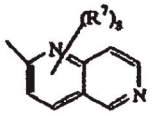
(a-22)



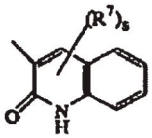
(a-23)



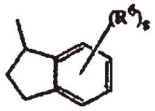
(a-24)



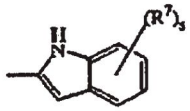
(a-25)



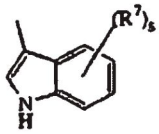
(a-26)



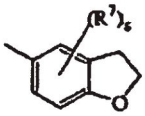
(a-27)



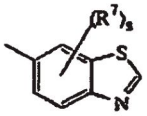
(a-28)



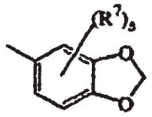
(a-29)



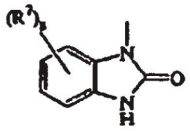
(a-30)



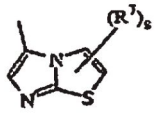
(a-31)



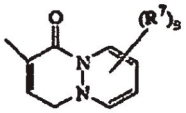
(a-32)



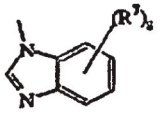
(a-33)



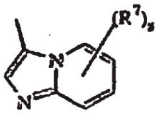
(a-34)



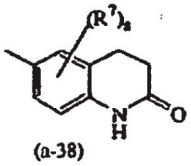
(a-35)



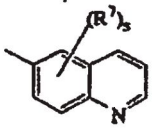
(a-36)



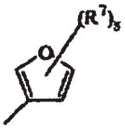
(a-37)



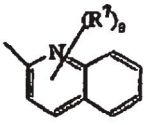
(a-38)



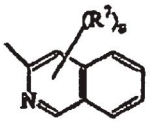
(a-39)



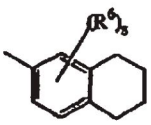
(a-40)



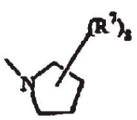
(a-41)



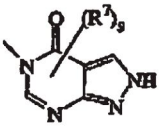
(a-42)

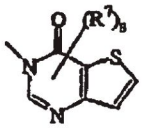


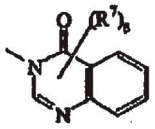
(a-43)

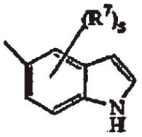


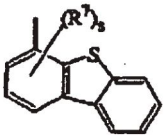
(a-44)

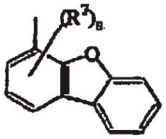

(a-45)

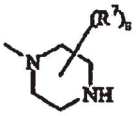

(a-46)


(a-47)


(a-48)


(a-49)

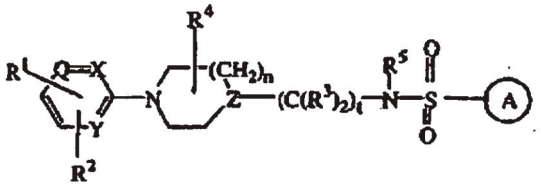

(a-50)


(a-51)

en el que cada s es independientemente 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; cada R^6 y R^7 se selecciona independientemente entre hidrógeno; halo; hidroxi; amino; nitro; trihaloalquilo C_{1-6}; trihaloalquiloxi C_{1-6}; alquilo C_{1-6}; alquilo C_{1-6} sustituido con arilo y cicloalquilo C_{3-10}; alquiloxi C_{1-6}; alquiloxi C_{1-6}-alquiloxi C_{1-6}; alquilcarbonilo C_{1-6}; alquiloxicarbonilo C_{1-6}; alquilsulfonilo C_{1-6}; cianoalquilo C_{1-6}; hidroxialquilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}; hidroxialquilamino C_{1-6}; aminoalquiloxi C_{1-6}; di(alquil C_{1-6}) aminocarbonilo; di(hidroxialquil C_{1-6})amino; (aril)(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquiloxi C_{1-6}; CH(alquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; arilsulfonilo; arilsulfonilamino; ariloxi; ariloxialquilo C_{1-6}; arilalquenediilo C_{2-6}; di(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})amino(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})amino(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminoalquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6}) aminoalquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})amino; aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; ciano; tiofenilo; tiofenilo sustituido con di(alquil C_{1-6})aminoalquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, alquil C_{1-6}-piperazinilalquilo C_{1-6}, hidroxialquil C_{1-6}-piperazinilalquilo C_{1-6}, hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquil C_{1-6}-piperazinilalquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}, alquiloxipiperidinilo C_{1-6}, alquiloxipiperidinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, morfolinilalquilo C_{1-6}, hidroxialquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6} o di(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; furanilo; furanilo sustituido con hidroxialquilo C_{1-6}; benzofuranilo; imidazolilo; oxazolilo; oxazolilo sustituido con arilo y alquilo C_{1-6}; alquiltriazolilo C_{1-6}; tetrazolilo; pirrolidinilo; pirrolilo; piperidinilalquiloxi C_{1-6}; morfolinilo; alquilmorfolinilo C_{1-6}; morfolinilalquiloxi C_{1-6}; morfolinilalquilo C_{1-6}; morfolinilalquilamino C_{1-6}; morfolinilalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; piperazinilo; alquilpiperazinilo C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquiloxi C_{1-6}; piperazinilalquilo C_{1-6}; naftalenilsulfonilpiperazinilo; naftalenilsulfonilpiperidinilo; naftalenilsulfonilo; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilamino C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquilpiperazinilsulfonilo C_{1-6}; aminosulfonilpiperazinilalquiloxi C_{1-6}; aminosulfonilpiperazinilo; aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilo; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}; hidroxialquilpiperazinilo C_{1-6}; hidroxilquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquiloxipiperidinilo C_{1-6}; alquiloxipiperidinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; piperidinilaminoalquilamino C_{1-6}; piperidinilaminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; (alquilpiperidinil C_{1-6})(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}, (alquilpiperidinil C_{1-6})(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinil C_{1-6}-alquil C_{1-6}; (hidroxialquil C_{1-6})(alquil C_{1-6})amino; (hidroxialquil C_{1-6})(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; hidroxialquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; di(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; pirrolidinilalquilo C_{1-6}; pirrolidinilalquiloxi C_{1-6}; pirazolilo; tiopirazolilo; pirazolilo sustituido con dos sustituyentes seleccionados entre alquilo C_{1-6} o trihaloalquilo C_{1-6}; piridinilo; piridinilo sustituido con alquiloxi C_{1-6}, ariloxi o arilo; pirimidinilo; tetrahidropirimidinilpiperazinilo; tetrahidropirimidinilpiperazinilalquilo C_{1-6}; quinolinilo; indol; fenilo; fenilo sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, amino, nitro, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, hidroxialquilo C_{1-6}, trifluorometilo, trifluorometiloxi, hidroxialquiloxi C_{1-4}, alquilsulfonilo C_{1-4}, alquiloxi C_{1-4}-alquiloxi C_{1-4}, alquiloxicarbonilo C_{1-4}, aminoalquiloxi C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquiloxi C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminocarbonilo, di(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})amino(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})amino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquil C_{1-4}-(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminoalquil C_{1-4}-(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})amino, aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-6}, ciano, piperidiniIalquiloxi C_{1-4}, pirrolidiniIalquiloxi C_{1-4}, aminosulfonilpiperazinilo, aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilpiperazinilo, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-4}, hidroxialquilpiperazinilo C_{1-4}, hidroxialquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, alquiloxipiperidinilo C_{1-4}, alquiloxipiperidinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, hidroxialquiloxi C_{1-4}-alquilpiperazinilo C_{1-4}, hidroxialquiloxi C_{1-4}-alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, (hidroxialquil C_{1-4})(alquil C_{1-4})amino, (hidroxialquil C_{1-4})(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(hidroxialquil C_{1-4})amino, di(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, furanilo, furanilo sustituido con -CH=CH-CH=CH-, pirrolidinilalquilo C_{1-4}, pirrolidinilalquiloxi C_{1-4}, morfolinilo, morfolinilalquiloxi C_{1-4}, morfolinilalquilo C_{1-4}, morfolinilalquilamino C_{1-4}, morfolinilalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, piperazinilo, alquilpiperazinilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquiloxi C_{1-4}, piperazinilalquilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilamino C_{1-4},

alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, tetrahidropirimidinilpiperazinilo, tetrahidropirimidinilpiperazinilalquilo C_{1-4}, piperidinilaminoalquilamino C_{1-4}, piperidinilaminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, (alquilpiperidinil C_{1-4})(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}, (alquilpiperidinil C_{1-4})(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, piridinilalquiloxi C_{1-4}, hidroxialquilamino C_{1-4}, hidroxialquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}, aminotiadiazolilo, aminosulfonilpiperazinilalquiloxi C_{1-4} o tiofenilalquilamino C_{1-4}; cada R^6 y R^7 puede estar situado en el nitrógeno en sustitución del hidrógeno; en los anteriores, arilo es fenilo o fenilo sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados cada uno independientemente entre halo, alquilo C_{1-4}, alquiloxi C_{1-6}, trifluorometilo, ciano o hidroxicarbonilo.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un derivado de sulfonilamino, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2003076401, que tienen la fórmula general:



las formas N-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas estereoquímicamente isoméricas de las mismas, en la que n es 0, 1, 2 ó 3 y cuando n es 0, entonces se pretende un enlace directo; t es 0, 1, 2, 3 ó 4 y cuando t es 0, entonces se pretende un enlace directo;

cada Q es nitrógeno o

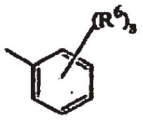
cada X es nitrógeno o

cada Y es nitrógeno o

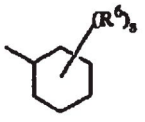
cada Z es nitrógeno o

R^1 es $-C(O)NR^8R^9$, $-N(H)C(O)R^{10}$, -C(O)-alcanodiil C_{1-6}-SR^{10}, $-NRC(O)N(OH)R^{10}$, $-NR^{11}C(O)$alcanodiil C_{1-6}-SR^{10}, $-NR^{11}C(O)C=N(OH)R^{10}$ u otro grupo quelante de Zn, en el que cada uno de R^8 y R^9 se selecciona independientemente entre hidrógeno, hidroxi, alquilo C_{1-6}, hidroxialquilo C_{1-6}, aminoalquilo C_{1-6} o aminoarilo; R^{10} se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_{1-6}, alquilcarbonilo C_{1-6}, arilalquilo C_{1-6}, alquilpirazinilo C_{1-6}, piridinona, pirrolidinona o metilimidazolilo; R^{11} se selecciona independientemente entre hidrógeno o alquilo C_{1-6}; R^2 es hidrógeno, halo, hidroxi, amino nitro, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, trifluorometilo, di(alquil C_{1-6})amino, hidroxiamino o naftalenilsulfonilpirazinilo; cada R^3 representa independientemente un átomo de hidrógeno y un átomo de hidrógeno puede estar reemplazado por un sustituyente seleccionado entre arilo; R^4 es hidrógeno, hidroxi, amino, hidroxialquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, arilalquilo C_{1-6}, aminocarbonilo, hidroxicarbonilo, aminoalquilo C_{1-6}, aminocarbonilalquilo C_{1-6}, hidroxicarbonilalquilo C_{1-6}, hidroxiaminocarbonilo, alquiloxicarbonilo C_{1-6}, alquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6} o di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; R^5 es hidrógeno, alquilo C_{1-6}, cicloalquilo C_{3-10}, hidroxialquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6} o arilo;

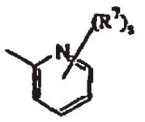
es un radical seleccionado entre



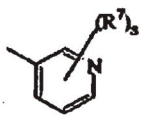
(a-1)



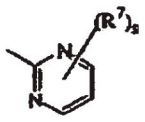
(a-2)



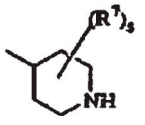
(a-3)



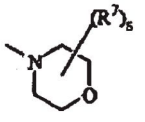
(a-4)



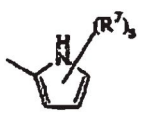
(a-5)



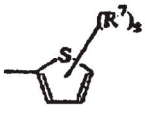
(a-6)



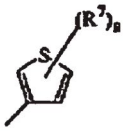
(a-7)



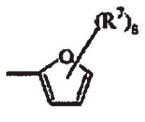
(a-8)



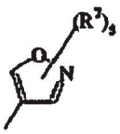
(a-9)



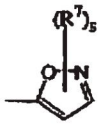
(a-10)



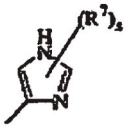
(a-11)



(a-12)

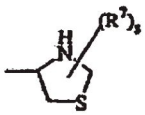


(a-13)

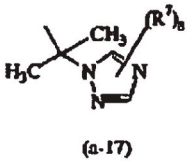


(a-14)

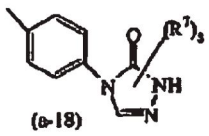
(a-15)



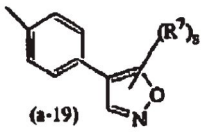
(a-16)



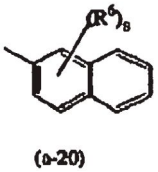
(a-17)



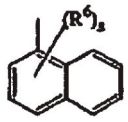
(a-18)



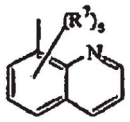
(a-19)



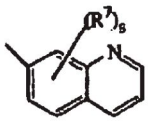
(a-20)



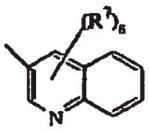
(a-21)



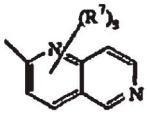
(a-22)



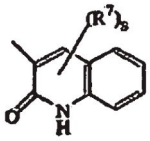
(a-23)



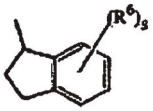
(a-24)



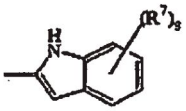
(a-25)



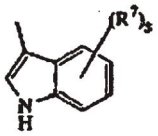
(a-26)



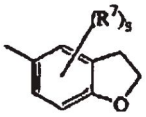
(a-27)



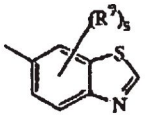
(a-28)



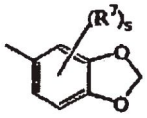
(a-29)



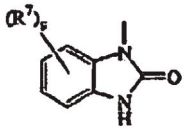
(a-30)



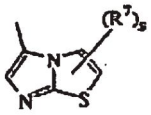
(a-31)



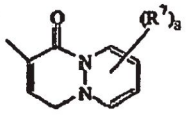
(a-32)



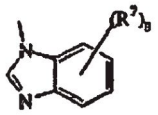
(a-33)



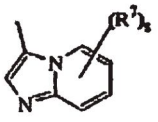
(a-34)



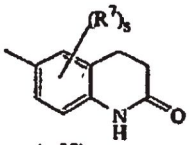
(a-35)



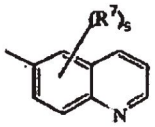
(a-36)



(a-37)

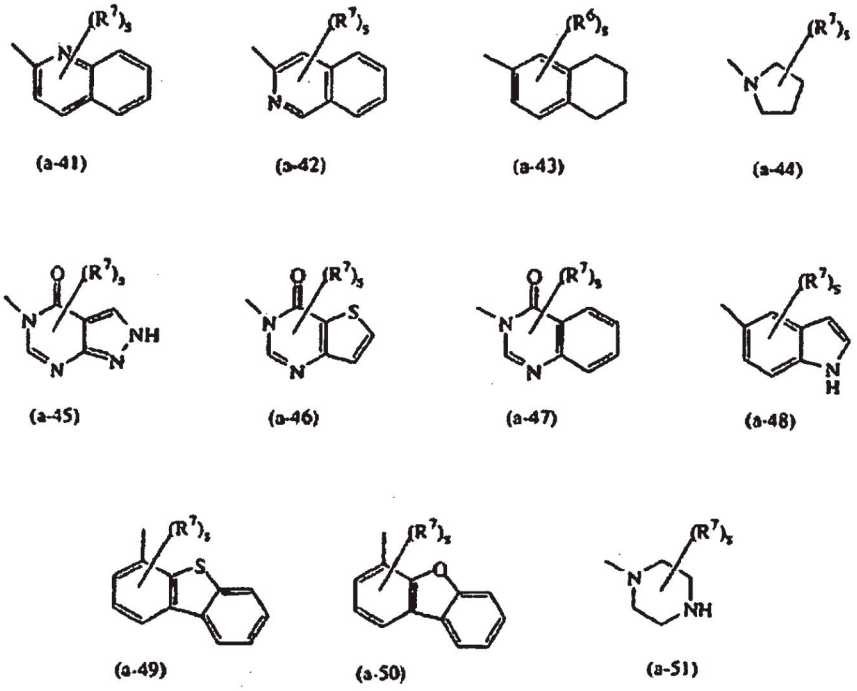


(a-38)



(a-39)

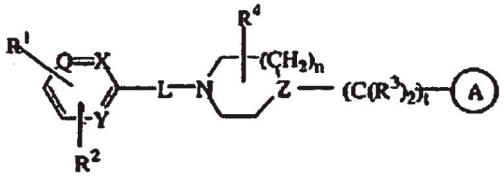
(a-40)



en que cada s es independientemente 0, 1, 2, 3, 4 o 5; cada R^6 y R^7 se selecciona independientemente entre hidrógeno; halo; hidroxi; amino; nitro; trihaloalquilo C_{1-6}; trihaloalquiloxi C_{1-6}; alquilo C_{1-6}; alquilo C_{1-6} sustituido con arilo y cicloalquilo C_{3-10}; alquiloxi C_{1-6}; alquiloxi C_{1-6}-alquiloxi C_{1-6}; alquilcarbonilo C_{1-6}; alquiloxicarbonilo C_{1-6}; alquilsulfonilo C_{1-6}; cianoalquilo C_{1-6}; hidroxialquilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}; hidroxialquilamino C_{1-6}; aminoalquiloxi C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminocarbonilo; di(hidroxialquil C_{1-6})amino; (aril)(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquiloxi C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; arilsulfonilo; arilsulfonilamino; ariloxi; ariloxialquilo C_{1-6}; arilalquenediilo C_{2-6}; di(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})amino(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})amino(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminoalquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})amino; aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; ciano; tiofenilo; tiofenilo sustituido con di(alquil C_{1-6})aminoalquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, hidroxialquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, hidroxi C_{1-6}-alquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinilalquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}, alquiloxipiperidinilo C_{1-6}, alquiloxipiperidinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, mofolinilalquilo C_{1-6}, hidroxialquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6} o di(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; furanilo; furanilo sustituido con hidroxialquilo C_{1-6}; benzofuranilo; imidazolilo; oxazolilo; oxazolilo sustituido con arilo y alquilo C_{1-6}; alquiltriazolilo C_{1-6}; tetraxolilo; pirrolidinilo; pirrolilo; piperidinilalquiloxi C_{1-6}; morfolinilo; alquilmorfolinilo C_{1-6}; morfolinilalquiloxi C_{1-6}; morfolinilalquilo C_{1-6}; morfolinilalquilamino C_{1-6}; morfolinilalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; piperazinilo; alquilpiperazinilo C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquiloxi C_{1-6}; piperazinilalquilo C_{1-6}; naftalenilsulfonilpiperazinilo; naftalenilsulfonilpiperidinilo; naftalenilsulfonilo; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilamino C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquilpiperazinilsulfonilo C_{1-6}; aminosulfonilpiperazinilalquiloxi C_{1-6}; aminosulfonilpiperazinilo; aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilo; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}; hidroxialquilpiperazinilo C_{1-6}; hidroxialquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquiloxipiperidinilo C_{1-6}; alquiloxipiperidinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; piperidinilaminoalquilamino C_{1-6}; piperidinilaminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; (alquilpiperidinil C_{1-6})(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}; (alquilpiperidinil C_{1-6})(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; (hidroxialquil C_{1-6})(alquil C_{1-6})amino; (hidroxialquil C_{1-6})(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; hidroxialquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; di(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; pirrolidinilalquilo C_{1-6}; pirrolidinilalquiloxi C_{1-6}; pirazolilo; tiopirazolilo; pirazolilo sustituido con dos sustituyentes seleccionados entre alquilo C_{1-6} o trihaloalquilo C_{1-6}; piridinilo; piridinilo sustituido con alquiloxi C_{1-6}, ariloxi o arilo; pirimidinilo; tetrahidropirimidinilpiperazinilo; tetrahidropirimidinilpiperazinilalquilo C_{1-6}; quinolinilo; indol; fenilo; fenilo sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, amino, nitro, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, hidroxialquilo C_{1-4}, trifluorometilo, trifluorometiloxi, hidroxialquiloxi C_{1-4}, alquilsulfonilo C_{1-4}, alquiloxi C_{1-4}-alquiloxi C_{1-4}, alquiloxicarbonilo C_{1-4}, aminoalquiloxi C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquiloxi C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminocarbonilo, di(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})amino(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})amino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquil C_{1-4}(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminoalquil C_{1-4}-(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})amino, aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-

$_4$)aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-6}, ciano, piperidinilalquiloxi C_{1-4}, pirrolidinilalquiloxi C_{1-4}, aminosulfonilpiperazinilo, aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilpiperazinilo, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-4}, hidroxialquilpiperazinilo C_{1-4}, hidroxialquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, alquiloxipiperidinilo C_{1-4}, alquiloxipiperidinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, hidroxialquiloxi C_{1-4}-alquilpiperazinilo C_{1-4}, hidroxialquiloxi C_{1-4}-alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, (hidroxialquil C_{1-4})(alquil C_{1-4})amino, (hidroxialquil C_{1-4})(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(hidroxialquil C_{1-4})amino, di(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, furanilo, furanilo sustituido con -CH=CH-CH=CH-, pirrolidinilalquilo C_{1-4}, pirrolidinilalquiloxi C_{1-4}, morfolinilo, morfolinilalquiloxi C_{1-4}, morfolinilalquilo C_{1-4}, morfolinilalquilamino C_{1-4}, morfolinilalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, piperazinilo, alquilpiperazinilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquiloxi C_{1-4}, piperazinilalquilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilamino C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-6}, tetrahidropirimidinilpiperazinilo, tetrahidropirimidinilpiperazinilalquilo C_{1-4}, piperidinilaminoalquilamino C_{1-4}, piperidinilaminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, (alquilpiperidinil C_{1-4})(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}, (alquilpiperidinil C_{1-4})(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, piridinilalquiloxi C_{1-4}, hidroxialquilamino C_{1-4}, hidroxialquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}, aminotiadiazolilo, aminosulfonilpiperazinilalquiloxi C_{1-4} o tiofenilalquilamino C_{1-4}; cada R^6 y R^7 puede estar situado en el nitrógeno en sustitución del hidrógeno; en los anteriores, arilo es fenilo o fenilo sustituido con uno o más sustituyentes seleccionado cada uno independientemente entre halo, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, trifluorometilo, ciano o hidroxicarbonilo.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas puede ser un compuesto de la fórmula general:



las formas N-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas esteroquímicamente isoméricas de la misma, en la que n es 0, 1, 2 ó 3 y cuando n es 0, entonces se pretende un enlace directo; t es 0, 1, 2, 3 ó 4 y cuando t es 0, entonces se pretende un enlace directo;

cada Q es nitrógeno o

cada X es nitrógeno o

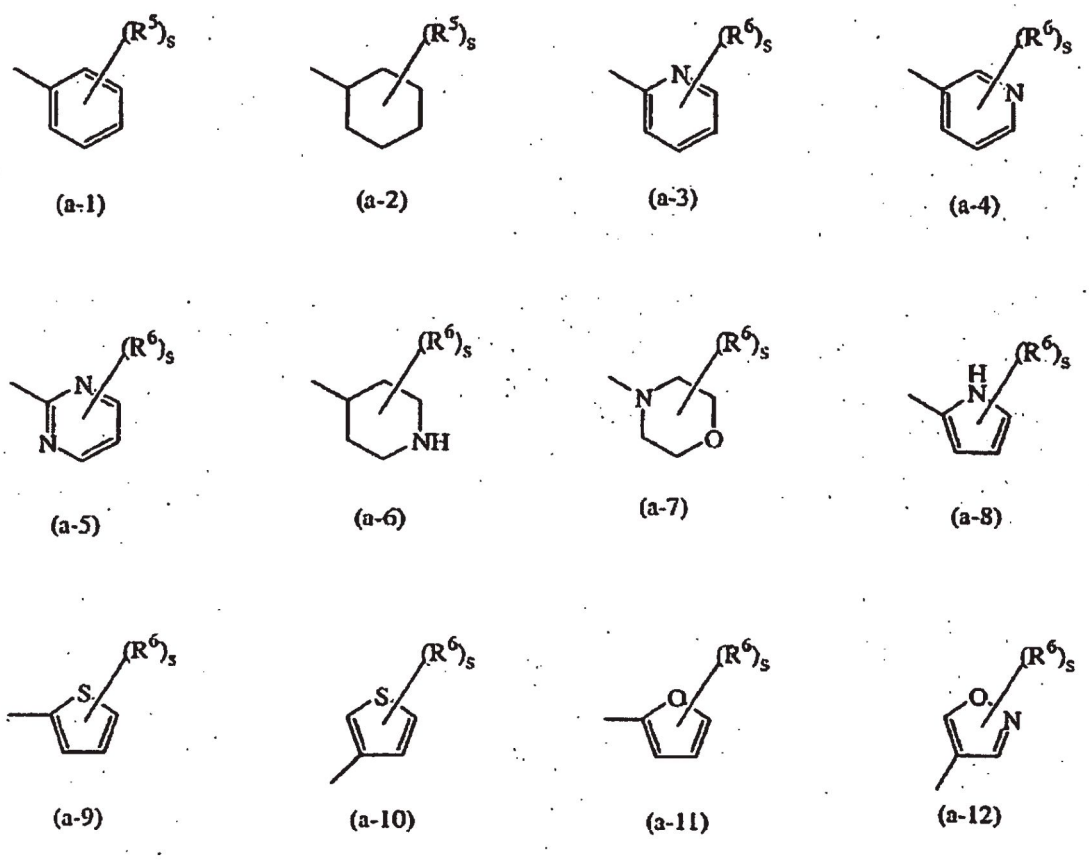
cada Y es nitrógeno o

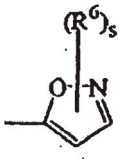
cada Z es nitrógeno o

R^1 es -C(O)NR^7R^8, -NHC(O)R^9, -C(O)-alcanodiil C_{1-6}-SR^9, -NR^{10}OC(O)N(OH)R^9, -NR^{10}C(O)alcanodiil C_{1-6}-SR^9, -NR^{10}C(O)C=N(OH)R^9 u otro grupo quelante de Zn, en el que cada uno de R^7 y R^8 se selecciona independientemente entre hidrógeno, hidroxi, alquilo C_{1-6}, hidroxialquilo C_{1-6}, aminoalquilo C_{1-6} o aminoarilo; R^9 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_{1-6}, alquilcarbonilo C_{1-6}, arilalquilo C_{1-6}, alquilpirazinilo C_{1-6}, piridinona, pirrolidinona o metilimidazolilo; R^{10} se selecciona independientemente entre hidrógeno o alquilo C_{1-6}; R^2 es hidrógeno, halo, hidroxi, amino, nitro, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, trifluorometilo, di(alquil C_{1-6})amino, hidroxiamino o naftalenilsulfonilpirazinilo; -L- es un enlace directo o un radical bivalente seleccionado entre alcanodiilo C_{1-6}, alcanodiiloxi C_{1-6}, amino, carbonilo o aminocarbonilo; cada R^3 representa independientemente un átomo de hidrógeno y un átomo de hidrógeno puede estar reemplazado por un sustituyente seleccionado entre arilo; R^4 es hidrógeno, hidroxi, amino, hidroxialquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, arilalquilo C_{1-6}, aminocarbonilo,

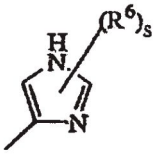
hidroxicarbonilo, aminoalquilo C_{1-6}, aminocarbonilalquilo C_{1-6}, hidroxicarbonilalquilo C_{1-6}, hidroxiaminocarbonilo, alquiloxicarbonilo C_{1-6}, alquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6} o di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6};

es un radical seleccionado entre

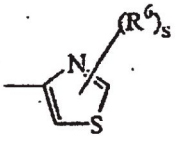




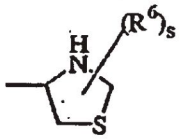
(a-13)



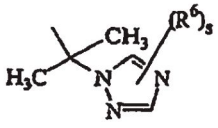
(a-14)



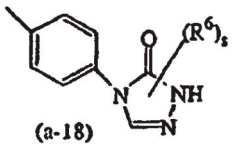
(a-15)



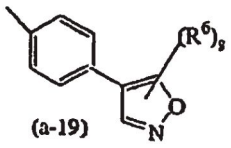
(a-16)



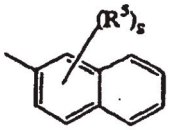
(a-17)



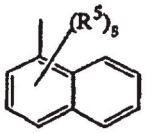
(a-18)



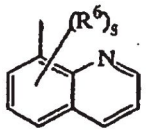
(a-19)



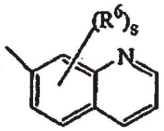
(a-20)



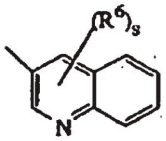
(a-21)



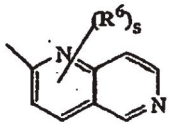
(a-22)



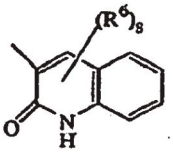
(a-23)



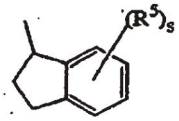
(a-24)



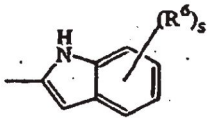
(a-25)



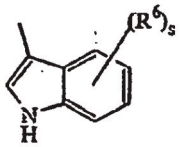
(a-26)



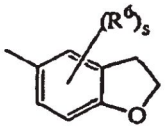
(a-27)



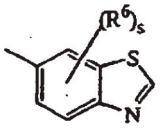
(a-28)



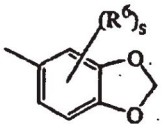
(a-29)



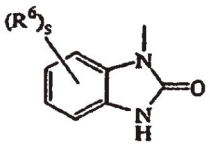
(a-30)



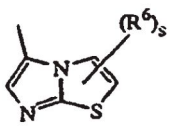
(a-31)



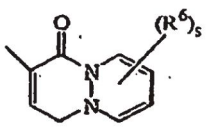
(a-32)



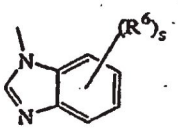
(a-33)



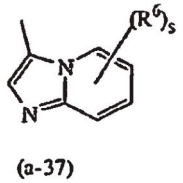
(a-34)

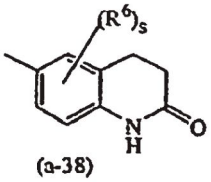


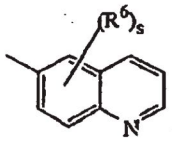
(a-35)

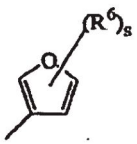


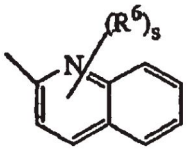
(a-36)

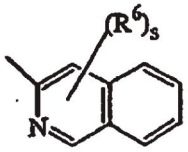

(a-37)

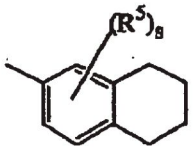

(a-38)

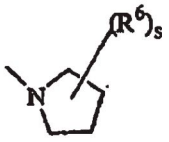

(a-39)

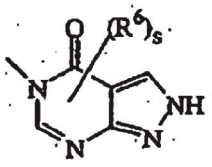

(a-40)

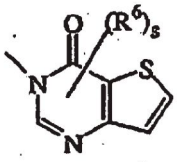

(a-41)

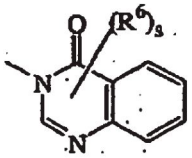

(a-42)

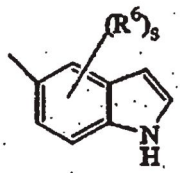

(a-43)

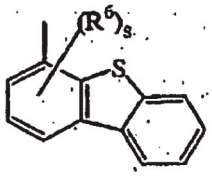

(a-44)

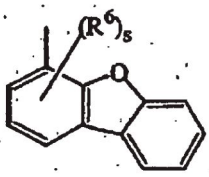

(a-45)

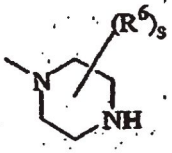

(a-46)


(a-47)


(a-48)


(a-49)

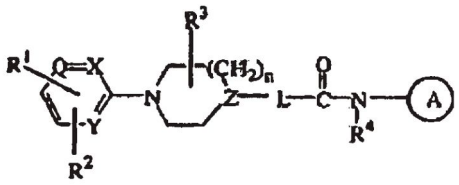

(a-50)


(a-51)

en el que cada s es independientemente 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; cada R^5 y R^6 se seleccionan independientemente entre hidrógeno; halo; hidroxi; amino; nitro; trihaloalquilo C_{1-6}; trihaloalquiloxi C_{1-6}; alquilo C_{1-6}; alquilo C_{1-6} sustituido con arilo y cicloalquilo C_{3-10}; alquiloxi C_{1-6}; alquiloxi C_{1-6}-alquiloxi C_{1-6}; alquilcarbonilo C_{1-6}; alquiloxicarbonilo C_{1-6}, alquilsulfonilo C_{1-6}; cianoalquilo C_{1-6}; hidroxialquilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}; hidroxialquilamino C_{1-6}; aminoalquiloxi C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminocarbonilo; di(hidroxialquil C_{1-6})amino; (aril)(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquiloxi C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; arilsulfonilo; arilsulfonilamino; ariloxi; ariloxialquilo C_{1-6}; arilalquenediilo C_{2-6}; di(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})amino(alquil C_{1-6})amino, di(alquil C_{1-6})amino(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; di(alquilamino C_{1-6}-alquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})amino; aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; ciano; tiofenilo; tiofenilo sustituido con di(alquil C_{1-6})aminoalquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, hidroxialquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}, alquiloxipiperidinilo C_{1-6}, alquiloxipiperidinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, morfolinilalquilo C_{1-6}, hidroxialquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, o di(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; furanilo; furanilo sustituido con hidroxialquilo C_{1-6}; benzofuranilo; imidazolilo; oxazolilo; oxazolilo sustituido con arilo y alquilo C_{1-6}; alquiltriazolilo C_{1-6}; tetrazolilo; pirrolidinilo; pirrolilo; piperidinilalquiloxi C_{1-6}; morfolinilo; alquilmorfolinilo C_{1-6}; morfolinilalquiloxi C_{1-6}; morfolinilalquilo C_{1-6}; morfolinilalquilamino C_{1-6}; morfolinilalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; piperazinilo; alquilpiperazinilo C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquiloxi C_{1-6}; piperazinilalquilo C_{1-6}; naftalenilsulfonilpiperazinilo; naftalenilsulfonilpiperidinilo; naftalenilsulfonilo; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilamino C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquilpiperazinilsulfonilo C_{1-6}; aminosulfonilpiperazinilalquiloxi C_{1-6};

aminosulfonilpiperazinilo; aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminosulfonillpiperazinilo; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}; hidroxialquilpiperazinilo C_{1-6}; hidroxialquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquiloxipiperidinilo C_{1-6}; alquiloxipiperidinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; piperidinilaminoalquilamino C_{1-6}; piperidinilaminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; : (alquilpiperidinil C_{1-6})(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}; (alquilpiperidinil C_{1-6})(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6};(hidroxialquil C_{1-6})(alquil C_{1-6})amino; (hidroxialquil C_{1-6})(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; hidroxialquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; di(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; pirrolidinilalquilo C_{1-6}; pirrolidinilalquiloxi C_{1-6}; pirazolilo; tiopirazolilo; pirazolilo sustituido con dos sustituyentes seleccionados entre alquilo C_{1-6} o trihaloalquilo C_{1-6}; piridinilo; piridinilo sustituido con alquiloxi C_{1-6}, ariloxi o arilo; pirimidinilo; tetrahidropirimidinilpiperazinilo; tetrahidropirimidinilpiperazinilalquilo C_{1-6}; quinolinilo; indol; fenilo; fenilo sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, amino, nitro, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, hidroxialquilo C_{1-4}, trifluorometilo, trifluorometiloxi, hidroxialquiloxi C_{1-4}, alquilsulfonilo C_{1-4}, alquiloxi C_{1-4}-alquiloxi C_{1-4}, alquiloxicarbonilo C_{1-4}, aminoalquiloxi C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquiloxi C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminocarbonilo, di(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})amino(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})amino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquil C_{1-4}-(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminoalquil C_{1-4}(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})amino, aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-6}, ciano, piperidinilalquiloxi C_{1-4}, pirrolidinilalquiloxi C_{1-4}, aminosulfonilpiperazinilo, aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilpiperazinilo, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-4}, hidroxialquilpiperazinilo C_{1-4}, hidroxialquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, alquiloxipiperidinilo C_{1-4}, alquiloxipiperidinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, hidroxialquiloxi C_{1-4}-alquilpiperazinilo C_{1-4}, hidroxialquiloxi C_{1-4}-alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, (hidroxialquil C_{1-4})(alquil C_{1-4})amino, (hidroxialquil C_{1-4})(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}; di(hidroxialquil C_{1-4})amino, di(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, furanilo, furanilo sustituido con -CH-CH-CH=CH-, pirrolidinilalquilo C_{1-4}, pirrolidinilalquiloxi C_{1-4}, morfolinilo, morfolinilalquiloxi C_{1-4}, morfolinilalquilo C_{1-4}, morfolinilalquilamino C_{1-4}, morfotinilalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, piperazinilo, alquilpiperazinilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquiloxi C_{1-4}, piperazinilalquilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilamino C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-6}, tetrahidropirimidinilpiperazinilo, tetrahidropirimidinilpiperazinilalquilo C_{1-4}, piperidinilaminoalquilamino C_{1-4}, piperidinilaminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, (alquilpiperidinil C_{1-4})(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}, (alquilpiperidinil C_{1-4})(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, piridinilalquiloxi C_{1-4}, hidroxialquilamino C_{1-4}, hidroxialquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}, aminotiadiazolilo, aminosulfonilpiperazinilalquiloxi C_{1-4}, o tiofenilalquilamino C_{1-4}; cada R^5 y R^6 puede estar situado en el nitrógeno en sustitución del hidrógeno; en los anteriores, arilo es fenilo o fenilo sustituido con uno o más sustituyentes seleccionado cada uno independientemente halo, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, trifluorometilo, ciano o hidroxicarbonilo. Véanse, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2003076400.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas pude ser un derivado de aminocarbonilo, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en el documento WO2003076421, que tienen la fórmula general:



las formas N-óxido, las sales de adición farmacéuticamente aceptables y las formas esteroquímicamente isoméricas de las mismas, en la que n es 0, 1, 2 ó 3 y cuando n es 0, entonces se pretende un enlace directo;

cada Q es nitrógeno o

;

cada X es nitrógeno o

;

cada Y es nitrógeno o

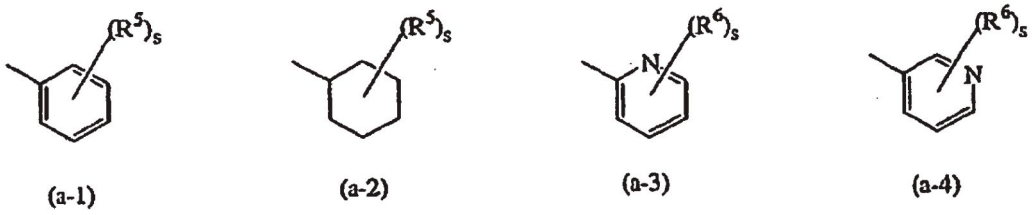
;

cada Z es nitrógeno o

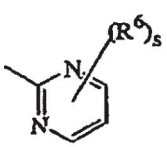
R^1 es -C(O)NR^7R^8, -N(H)C(O)R^9, -C(O)-alcanodiil C_{1-6}-SR^9, -NR^{10}C(O)N(OH)R^9, -NR^{10}C(O)alcanodiil C_{1-6}-SR^9,-NR^{10}C(O)C=N(OH)R^9 u otro grupo quelante de Zn, en el que cada uno de R^7 y R^8 se selecciona independientemente entre hidrógeno, hidroxi, alquilo C_{1-6}, hidroxialquilo C_{1-6}, aminoalquilo C_{1-6} o aminoarilo; R^9 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_{1-6}, alquilcarbonilo C_{1-6}, arilalquilo C_{1-6}, alquilpirazinilo C_{1-6}, piridinona, pirrolidinona o metilimidazolilo; R^{10} se selecciona independientemente entre hidrógeno o alquilo C_{1-6}; R^2 es hidrógeno, halo, hidroxi, amino, nitro, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, trifluorometilo, di(alquil C_{1-6})amino, hidroxiamino o naftalenilsulfonilpirazinilo; R^3 es hidrógeno, hidroxi, amino, hidroxialquilo C_{1-6}, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, arilalquilo C_{1-6}, aminocarbonilo, hidroxicarbonilo, aminoalquilo C_{1-6}, aminocarbonilalquilo C_{1-6}, hidroxicarbonilalquilo C_{1-6}, hidroxiaminocarbonilo, alquiloxicarbonilo C_{1-6}, alquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6} o di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; cuando Z es igual a nitrógeno, entonces -L- es un enlace directo; cuando Z es igual a

entonces -L- es -NH- o el radical bivalente -alcanodiil C_{1-6}-NH-; R^4 es hidrógeno, alquilo C_{1-6}, cicloalquilo C_{3-6}, hidroxialquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6} o arilo;

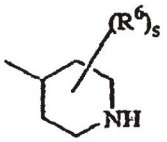
es un radical seleccionado entre



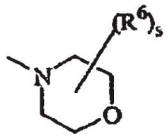
(a-1) (a-2) (a-3) (a-4)



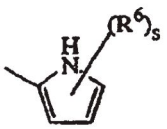
(a-5)



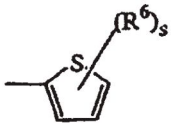
(a-6)



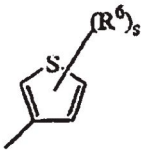
(a-7)



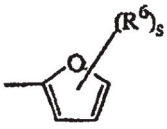
(a-8)



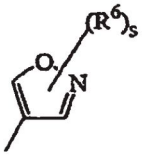
(a-9)



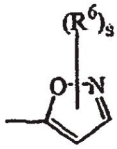
(a-10)



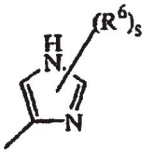
(a-11)



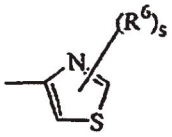
(a-12)



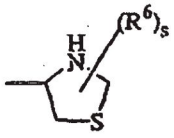
(a-13)



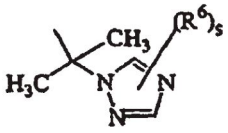
(a-14)



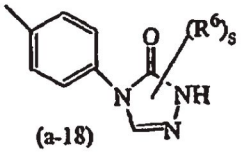
(a-15)



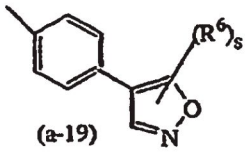
(a-16)



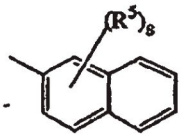
(a-17)



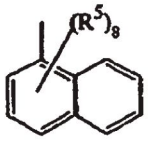
(a-18)



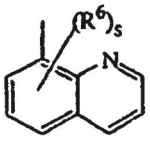
(a-19)



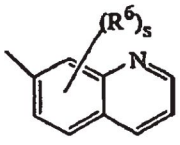
(a-20)



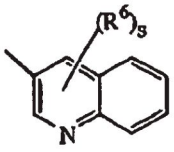
(a-21)



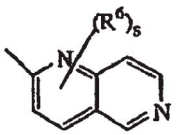
(a-22)

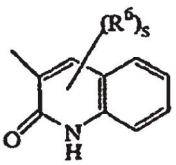


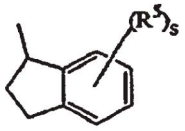
(a-23)

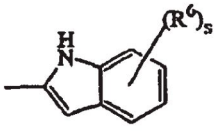


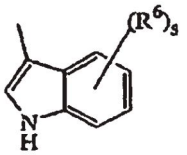
(a-24)

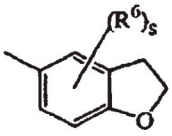

(a-25)

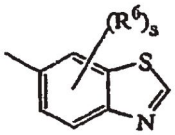

(a-26)

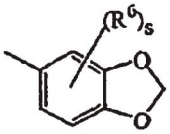

(a-27)

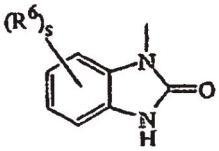

(a-28)

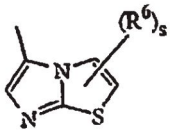

(a-29)

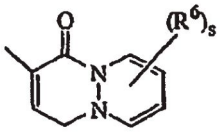

(a-30)

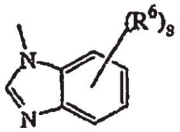

(a-31)

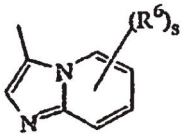

(a-32)

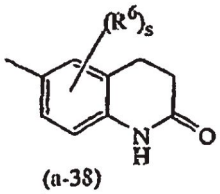

(a-33)

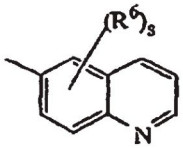

(a-34)

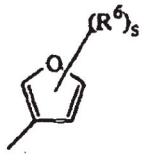

(a-35)

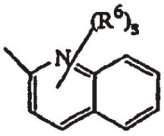

(a-36)

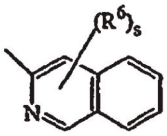

(a-37)

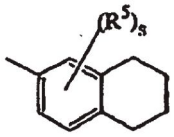

(a-38)

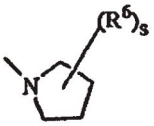

(a-39)

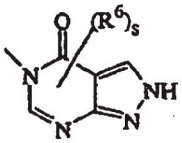

(a-40)

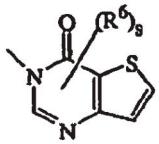

(a-41)

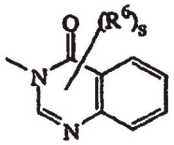

(a-42)

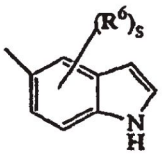

(a-43)

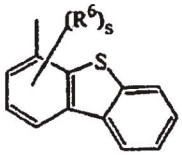

(a-44)


(a-45)

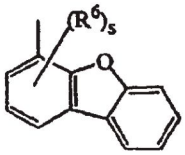

(a-46)


(a-47)

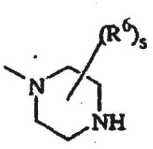

(a-48)



(a-49)



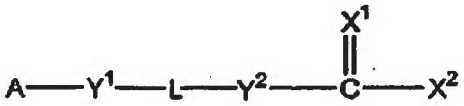
(a-50)



(a-51)

en el que cada s es independientemente 0,1, 2, 3, 4 ó 5: cada R^5 y R^6 se seleccionan independientemente entre hidrógeno; halo; hidroxi; amino; nitro; trihaloalquilo C_{1-6}; trihaloalquiloxi C_{1-6}; alquilo C_{1-6}; alquilo C_{1-6} sustituido con arilo y cicloalquilo C_{3-10}; alquiloxi C_{1-6}; alquiloxi C_{1-6}-alquiloxi C_{1-6}; alquilcarbonilo C_{1-6}; alquiloxicarbonilo C_{1-6}; alquilsulfonilo C_{1-6}; cianoalquilo C_{1-6}; hidroxialquilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}; hidroxialquilamino C_{1-6}; aminoalquiloxi C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminocarbonilo; di(hidroxialquil C_{1-6})amino; (aril)(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquiloxi C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; arilsulfonilo; arilsulfonilamino; ariloxi; ariloxialquilo C_{1-6}; arilalquenediilo C_{2-6}; di(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})amino(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})amino(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminoalquil C_{1-6}-(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminoalquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})amino; aminosulfonilamino(alquil C_{1-6}) aminoalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})amino; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilamino(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; ciano; tiofenilo; tiofenilo sustituido con di(alquil C_{1-6})aminoalquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}, alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, hidroxialquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}, alquiloxipiperidinilo C_{1-6}, alquiloxipiperidinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}, morfolinilalquilo C_{1-6}, hidroxialquil C_{1-6}(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6} o di(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; furanilo; furanilo sustituido con hidroxialquilo C_{1-6}; benzofuranilo; imidazolilo; oxazolilo; oxazolilo sustituido con arilo y alquilo C_{1-6}; alquiltriazolilo C_{1-6}; tetrazolilo; pirrolidinilo; pirrolilo; piperidinilalquiloxi C_{1-6}; morfolinilo; alquilmorfolinilo C_{1-6}; morfolinilalquiloxi C_{1-6}; morfolinilalquilo C_{1-6}; morfolinilalquilamino C_{1-6}; morfolinilalquilamino C_{1-6}- alquilo C_{1-6}; piperazinilo; alquilpiperazinilo C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquiloxi C_{1-6}; piperazinilalquilo C_{1-6}; naftalenilsulfonilpiperazinilo; naftalenilsulfonilpiperidinilo; naftalenilsulfonil: alquilpiperazinil- C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilamino C_{1-6}; alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquilpiperazinilsulfonilo C_{1-6}; aminosulfonilpiperazinilalquiloxi C_{1-6}; aminosulfonilpiperazinilo; aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilo; di(alquil C_{1-6})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-6}; hidroxialquilpiperazinilo C_{1-6}; hidroxialquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; alquiloxipiperidinilo C_{1-6}; alquiloxipiperidinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; piperidinilaminoalquilamino C_{1-6}; piperidinilaminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; (alquilpiperidinil C_{1-6})(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}; (alquilpiperidinil C_{1-6})(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinilo C_{1-6}; hidroxialquiloxi C_{1-6}-alquilpiperazinil C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; (hidroxialquil C_{1-6})(alquil C_{1-6})amino; (hidroxialquil C_{1-6})(alquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; hidroxialquilamino C_{1-6}-alquilo C_{1-6}; di(hidroxialquil C_{1-6})aminoalquilo C_{1-6}; pirrolidinilalquilo C_{1-6}; pirrolidinilalquiloxi C_{1-6}; pirazolilo; tiopirazolilo; pirazolilo sustituido con dos sustituyentes seleccionados entre alquilo C_{1-6} o trihaloalquilo C_{1-6}; piridinilo; piridinilo sustituido con alquiloxi C_{1-6}, ariloxi o arilo; pirimidinilo; tetrahidropirimidinilpiperazinilo; tetrahidropirimidinilpiperazinilalquilo C_{1-6}; quinolinilo; indolilo; fenilo; fenilo sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados independientemente entre halo, amino, nitro, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, hidroxialquilo C_{1-4}, trifluorometilo, trifluorometiloxi, hidroxialquiloxi C_{1-4}, alquilsulfonilo C_{1-4}, alquiloxi C_{1-4}-alquiloxi C_{1-4}, alquiloxicarbonilo C_{1-4}, aminoalquiloxi C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquiloxi C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminocarbonilo, di(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})amino(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})amino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquil C_{1-4}(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminoalquil C_{1-4}(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})amino, aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})amino, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilamino(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-6}, ciano, piperidinilalquiloxi C_{1-4}, pirrolidinilalquiloxi C_{1-4}, aminosulfonilpiperazinilo, aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilpiperazinilo, di(alquil C_{1-4})aminosulfonilpiperazinilalquilo C_{1-4}, hidroxialquilpiperazinilo C_{1-4}, hidroxialquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, alquiloxipiperidinilo C_{1-4}, alquiloxipiperidinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, hidroxialquiloxi C_{1-4}-alquilpiperazinilo C_{1-4}, hidroxialquiloxi C_{1-4}-alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, (hidroxialquil C_{1-4})(alquil C_{1-4})amino, (hidroxialquil C_{1-4})(alquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, di(hidroxialquil C_{1-4})amino, di(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilo C_{1-4}, furanilo, furanilo sustituido con -CH=CH-CH=CH-, pirrolidinilalquilo C_{1-4}, pirrolidinilalquiloxi C_{1-4}, morfolinilo, morfolinilalquiloxi C_{1-4}, morfolinilalquilo C_{1-4}, morfolinilalquilamino C_{1-4}, morfolinilalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, piperazinilo, alquilpiperazinilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquiloxi C_{1-4}, piperazinilalquilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilamino C_{1-4}, alquilpiperazinil C_{1-4}-alquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-6}, tetrahidropirimidinilpiperazinilo, tetrahidropirimidinilpiperazinilalquilo C_{1-4}, piperidinilaminoalquilamino C_{1-4}, piperidinilaminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, (alquilpiperidinil C_{1-4})(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}, (alquilpiperidinil C_{1-4})(hidroxialquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, piridinilalquiloxi C_{1-4}, hidroxialquilamino C_{1-4}, hidroxialquilamino C_{1-4}-alquilo C_{1-4}, di(alquil C_{1-4})aminoalquilamino C_{1-4}, aminotiadiazolilo, aminosulfonilpiperazinilalquiloxi C_{1-4} o tiofenilalquilamino C_{1-4}; cada R^5 y R^6 puede estar situado en el nitrógeno en sustitución del hidrógeno; en los anteriores, arilo es fenilo o fenilo sustituido con uno o más sustituyentes cada uno seleccionado independientemente entre halo, alquilo C_{1-6}, alquiloxi C_{1-6}, trifluorometilo, ciano o hidroxicarbonilo.

En un aspecto, el inhibidor de la actividad de histonas desacetilasas pude ser un compuesto que tiene la fórmula general:



en la que A es un resto cíclico seleccionado entre el grupo que consiste en cicloalquilo C_{3-14}, heterocicloalquilo de 3-14 miembros, cicloalquenilo C_{4-14}, heterocicloalquenilo de 3-8 miembros, arilo o heteroarilo; estando el resto cíclico opcionalmente sustituido con alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilo, hidroxilalquilo, halo, haloalquilo, amino, alquilcarboniloxi, alquiloxicarbonilo, alquilcarbonilo, alquilsulfonilamino, aminosulfonilo o alquilsulfonilo; o A es una cadena de hidrocarburo C_{3-12} saturada ramificada o una cadena de hidrocarburo C_{3-12} insaturada ramificada interrumpida opcionalmente por -O-, -S-, -N(R^a)-, -C(O)-, -N(R^a)-SO_2-, -SO_2-N(R^a)-, -N(R^a)-C(O)-O-, -O-C(O)-N(R^a)-, -N(R^a)-C(O)N(R^b)-, -O-C(O)-, -C(O)-O-, -O-SO_2-, -SO_2-O- o -O-C (O)-O-, en los que cada uno de R^a y R^b son independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilalquilo, hidroxilo o haloalquilo; estando cada una de las cadenas de hidrocarburo, saturadas e insaturadas, ramificadas opcionalmente sustituida con alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilo, hidroxilalquilo, halo, haloalquilo, amino, alquilcarboniloxi, alquiloxicarbonilo, alquilcarbonilo, alquilsulfonilamino, aminosulfonilo o alquilsulfonilo; cada uno de Y^1 e Y^2 es independientemente -CH_2-, -O-, -S-, -N(R)-, -N(R^c)-C(O)-O-, -O-C(O)-N(R^c)-, -N(R^c)-C(O)-N(R^d)-, -O-C(O)-O- o un enlace; siendo cada uno de R^c y R^d independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilalquilo, hidroxilo o haloalquilo; L es una cadena de hidrocarburo C_{2-12} lineal que contiene opcionalmente al menos un doble enlace, al menos un triple enlace o al menos un doble enlace y un triple enlace; estando dicha cadena de hidrocarburo opcionalmente sustituida con alquilo C_{1-4}, alquenilo C_{2-4}, alquinilo C_{2-4}, alcoxi C_{1-4}, hidroxilo, halo, amino, nitro, ciano, cicloalquilo C_{3-5}, heterocicloalquilo de 3-5 miembros, arilo monocíclico, heteroarilo de 5-6 miembros, alquilcarboniloxi C_{1-4}, alquiloxicarbonilo C_{1-4}, alquilcarbonilo C_{1-4} o formilo; y estando opcionalmente interrumpida por -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(O)-O-, -O-C(O)-N(R^e)-, -N(R^e)-C(O)-N(R^f)- o -O-C(O)-O-; siendo cada uno de R^e y R^f independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilalquilo, hidroxilo o haloalquilo; X^1 es O o S; y X^2 es - OR', -SR^1, -NR^1-OR^1, -NR-SR^1, -C(O)-OR_1, -CHR^4-OR^1, -N=N-C(O)-N(R^3)$_2$ o -O-CHR^4-O-C(O)-R^5, en los que cada uno de R^1 y R^2 es independientemente hidrógeno, alquilo, hidroxilalquilo, haloalquilo o un grupo protector hidroxilo; R^3 es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilalquilo, hidroxilo, haloalquilo o un grupo protector amino; R^4 es hidrógeno, alquilo, hidroxilalquilo o haloalquilo; R^5 es alquilo, hidroxilalquilo o haloalquilo; y con la condición de que cuando L es un hidrocarburo C_{2-3} que no contiene dobles enlaces y X^2 es -OR^1, Y^1 no es un enlace e Y^2 no es un enlace; o una sal del mismo.

Uso terapéutico de las células de la presente invención

La presente invención puede emplearse en un procedimiento para el tratamiento de un paciente que padece o corre riesgo de desarrollar diabetes de Tipo 1. Este procedimiento implica aislar y cultivar células madre o células progenitoras, aumentar la población de células aisladas, diferenciar las células cultivadas *in vitro* en un linaje pancreático o en una célula productora de hormonas pancreáticas o en un linaje de células β e implantar en el paciente las células diferenciadas bien directamente o bien en un vehículo farmacéutico. Si fuera apropiado, el paciente puede tratarse adicionalmente con agentes o productos bioactivos farmacéuticos que faciliten la supervivencia y función de las células transplantadas. Estos agentes pueden incluir, por ejemplo, insulina, miembros de la familia TGF-β, incluyendo TGF-β1, 2 y 3, proteínas óseas morfogénicas (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12, y -13), factores 1 y 2 de crecimiento de fibroblastos, factores AA y BB del crecimiento derivado de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de tipo insulina (FCI-I- II), factores de diferenciación de crecimiento (FDC-5, -6, -8, -10, -15), factor de crecimiento derivado de células endoteliales vasculares (FCDCEV), pleiotrofina, endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, péptido I de tipo glucagón (GLP-1) y II, mimetobody GLP-1 y 2, Exendina-4, ácido retinoico, hormona paratiroidea, inhibidores de MAPK tales como, por ejemplo, los compuestos descritos en las Solicitudes de los Estados Unidos Publicadas 2004/0209901 y 2004/0132729.

La presente invención también puede emplearse en un procedimiento para el tratamiento de un paciente que padece o corre riesgo de desarrollar diabetes de Tipo 2. El procedimiento implica aislar y cultivar células madre o células progenitoras, aumentar la población de células aisladas, diferenciar las células cultivadas *in vitro* en un linaje pancreático o en una célula productora de hormonas pancreáticas o en un linaje de células β e implantar en el paciente las células diferenciadas bien directamente o bien en un vehículo farmacéutico.

Las células de la presente invención pueden modificarse genéticamente. Por ejemplo, las células pueden modificarse por ingeniería genética para sobreexpresar marcadores característicos de una célula o de un linaje de células β, tal como por ejemplo, NGN-3 (neurogenina-3), Hlxb9, Nkx6, Isl1, Pax6, NeuroD, Hnfla, Hnf6, Hnf3 Beta y Mafa, o insulina. Las células pueden modificarse por ingeniería genética para sobreexpresarse con cualquier gen de interés adecuado. Las técnicas útiles para modificar por ingeniería genética las células derivadas de líquido amniótico de la presente invención pueden encontrarse, por ejemplo, en libros de texto convencionales y revistas de biología celular. Los procedimientos en genética molecular y modificación por ingeniería genética se describen, por

ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed. (Sambrook y col., 1989); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (I. M. Miller &M. P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition (F. M. Ausubel y col., eds., 1987 & 1995); and Recombinant DNA Methodology II (R. Wu ed. , Academic Press 1995).

La molécula de ácido nucleico, que codifica el gen de interés, puede integrarse establemente en el genoma de la célula, o la molécula de ácido nucleico puede estar presente como una molécula extracromosómica, tal como un vector o plásmido. Dicha molécula extracromosómica puede ser autrorreplicativa. El término “transfección”, como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso para introducir ácido nucleico heterólogo en la célula huésped.

Pueden usarse células no diferenciadas o de otra manera, como células dispersadas o formadas en agrupaciones que pueden infundirse en la vena porta hepática. Como alternativa, las células pueden proporcionarse en soportes poliméricos degradables biocompatibles, en dispositivos no degradables porosos o encapsularse para protegerlas de las respuestas inmunes de los huéspedes. Las células pueden implantarse en un sitio apropiado en un receptor. Los sitios de implante incluyen, por ejemplo, hígado, páncreas natural, espacio subcapsular renal, espacio o bolsa subcutánea omental, peritoneal, subserosal.

Para potenciar adicionalmente la diferenciación, supervivencia o actividad de las células implantadas, pueden administrarse otros factores, tales como factores de crecimiento, antioxidantes o agentes antiinflamatorios, antes, simultáneamente con o después de la administración de las células. En algunas realizaciones, se usan factores de crecimiento para diferenciar las células administradas *in vivo*. Estos factores pueden secretarse por células endógenas y exponerse a las células derivadas de líquido amniótico administradas *in situ*. Las células implantadas pueden inducirse para diferenciarse mediante cualquier combinación de factores de crecimiento administrados de manera endógena y exógena conocidos en la técnica.

La cantidad de células usadas en la implantación depende de diversos factores que incluyen el estado de paciente y la respuesta a la terapia y puede determinarse por un experto en la materia.

La presente invención puede emplearse en un procedimiento para el tratamiento de un paciente que padece o corre el riesgo de desarrollar diabetes. El procedimiento incluye aislar y cultivar células madre o células progenitoras, aumentar la población de células aislada, diferenciar *in vitro* las células cultivadas en un linaje pancreático o en una célula productora de hormonas pancreáticas o en un linaje de células β e incorporar las células en un soporte tridimensional. Las células pueden conservarse *in vitro* sobre este soporte antes del implante en el paciente. Como alternativa, el soporte que contiene las células puede implantarse directamente en el paciente sin cultivo adicional *in vitro*. El soporte puede opcionalmente incorporarse con al menos un agente farmacéutico que facilite la supervivencia y función de las células transplantadas.

Los materiales de soporte adecuados para su uso en los fines de la presente invención incluyen moldes tisulares, conductos, barreras y depósitos útiles para la reparación tisular. En particular, materiales sintéticos y naturales en forma de espumas, esponjas, geles, hidrogeles, textiles y estructuras no tejidas que se han usado *in vitro* e *in vivo* para reconstruir o regenerar tejido biológico, así como para administrar agentes quimiotácticos para inducir el crecimiento tisular, son adecuados para su uso en la realización práctica de los procedimientos de la presente invención. Véanse, por ejemplo, los materiales descritos en la Patente de Estados Unidos 5.770.417, Patente de Estados Unidos 6.022.743, Patente de Estados Unidos 5.567.612, Patente de Estados Unidos 5.759.830, Patente de Estados Unidos 6.626.950, Patente de Estados Unidos 6.534.084, Patente de Estados Unidos 6.306.424, Patente de Estados Unidos 6.365.149, Patente de Estados Unidos 6.599.323, Patente de Estados Unidos 6.656.488 y Patente de Estados Unidos 6.333.029. Los polímeros ejemplares adecuados para su uso en la presente invención se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos Publicada 2004/0062753 A1 y en la Patente de Estados Unidos 4.557.264. Para formar un soporte incorporado con un agente farmacéutico, el agente farmacéutico puede mezclarse con la solución polimérica antes de formar el soporte. Como alternativa, podría revestirse un agente farmacéutico sobre un soporte fabricado, preferentemente, en presencia de un vehículo farmacéutico. El agente farmacéutico puede presentarse como un líquido, un sólido finamente dividido o cualquier otra forma física apropiada. Como alternativa, al soporte pueden añadirse excipientes para modificar la tasa liberada del agente farmacéutico. En una realización alternativa, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto antiinflamatorio, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en la Patente de Estados Unidos 6.509.369.

En una realización, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto antiapoptótico, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en la Patente de Estados Unidos 6.793.945.

En otra realización, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacéutico que es un inhibidor de fibrosis tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en la Patente de Estados Unidos 6.331.298.

En una realización adicional, el soporte se incorpora con al menos un compuestos farmacéutico que es capaz de potenciar la angiogénesis, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en la de Estados Unidos Publicada

2004/0220393 y en la Solicitud de Estados Unidos Publicada 2004/0209901.

En otra realización más, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacéutico que es un compuesto inmunosupresor, tal como, por ejemplo, los compuestos descritos en la Solicitud de Estados Unidos Publicada 2004/0171623.

En una realización adicional, el soporte se incorpora con al menos un compuesto farmacológico que es un factor de crecimiento, tal como, por ejemplo, los miembros de la familia TGF-β, que incluyen TGF-β1, 2 y 3, proteínas morfogénicas óseas (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12, y -13), factores 1 y 2 de crecimiento de fibroblastos, factores AA y BB de crecimiento derivado de plaquetas, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento de insulina (FCI-I, II), factores de diferenciación de crecimiento (FDC-5, -6, -8, -10, -15), factor de crecimiento derivado de células endoteliales vasculares (FCDCEV), pleiotrofina, endotelina, entre otros. Otros compuestos farmacéuticos pueden incluir, por ejemplo, nicotinamida, factor 1-alfa inducible por hipoxia, péptido-I y II de tipo glucagón (GLP-1 y 2), mimetobody GLP-1 y GLP-2, Exendina-4, nodal, noggina, FCN, ácido retinoico, hormona paratiroidea, tenascina-C, tropoelastina, péptidos derivados de trombina, catelicidinas, defensinas, laminina, péptidos biológicos que contienen dominios de unión a células y a heparina de proteínas adhesivas de la matriz extracelular tales como fibronectina y vitronectina, inhibidores de MAPK, tales como, por ejemplo, los compuestos descritos en la Solicitud de Estados Unidos Publicada 2004/0209901 y en la Solicitud de Estados Unidos Publicada 2004/0132729.

La incorporación de las células de la presente invención en un armazón puede conseguirse mediante la deposición simple de células sobre el armazón. Las células pueden introducirse en el armazón por difusión simple (J. Pediatr. Surg. 23 (1 Pt 2): 3-9 (1988)). Para potenciar la eficacia del cultivo celular, se han desarrollado varias estrategias distintas. Por ejemplo, para sembrar condrocitos sobre armazones de ácido poliglicólico se han usado matraces centrifugadores (Biotechnol. Prog. 14(2): 193-202 (1998)). Otra estrategia para la siembra de células es el uso de centrifugación, que produce mínimo estrés a células sembradas y potencia la eficacia de la siembra. Por ejemplo, Yang y col. desarrollaron un procedimiento de siembra celular (J. Biomed. Mater. Res. 55(3): 379-86 (2001)), denominado Inmovilización Celular por Centrifugación (ICC).

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero sin limitación, mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

El Establecimiento de Líneas Celulares Pancreáticas Humanas

Preparación de Páncreas – Se obtuvieron páncreas humanos no adecuados para transplante clínico procedentes del National Disease Research Interchange (Philadelphia, PA) después de consentimiento apropiado para su uso en investigación. Los páncreas se transfirieron, con una solución de conservación de órganos, a una bandeja de acero inoxidable en hielo y se cortó todo el tejido extraño. El conducto pancreático se canuló con un catéter de calibre 18 y en los páncreas se inyectó una solución enzimática que contenía la enzima LIBERASE HI™ (Roche 0,5 mg/ml, Roche) y DNasa I (0,2 mg/ml) disuelta en solución salina tamponada con fosfato de Dubelcco (DPBS).

Disociación Mecánica Rápida Seguida de Digestion Enzimática – Los páncreas a los que se había inyectado la enzima se homogeneizaron en un procesador tisular, impulsado 3-5 veces durante 3-5 segundos/impulso y el tejido disociado se transfirió a dos matraces de tripsinización de 500 ml (Bellco) que contenían barras agitadoras magnéticas. Después de esto, a cada matraz, se añadieron 50-100 ml de la solución enzimática. Los matraces se colocaron en un baño con agua a 37 ºC sobre placas de agitación sumergibles y se dejaron incubando a una velocidad de agitación intermedia durante 10 minutos. La agitación se detuvo y el tejido finamente digerido se eliminó del matraz y se transfirió a un tubo de 250 ml que contenía DPBS, suero bovino fetal (SBF) al 5% y DNasa I 0,1 mg/ml (DPBS+) a 4ºC para inactivar el proceso de digestión. Los matraces se rellenaron con 50-100 ml de la solución enzimática y se colocaron de nuevo en el baño con agua y se reinició la agitación durante 10 minutos más. De nuevo, los matraces se retiraron y la digestión fina se recogió y se transfirió a los tubos de 250 ml en hielo. Este proceso se repitió durante 3-5 veces más hasta que el páncreas estuvo completamente digerido.

Disociación Mecánica Gradual con Digestión Enzimática Simultánea - Los páncreas a los que se había inyectado la enzima se procesaron de acuerdo con los procedimientos descritos en Diabetes 37:413-420 (1988). En resumen, los páncreas se limpiaron de tejido extraño y se les inyectó la solución enzimática como se ha descrito anteriormente. Los páncreas después se colocaron en una cámara Ricordi con perlas y se cubrieron con un tamiz con un tamaño de malla de 400-600 μm para retener agrupaciones tisulares más grandes. La cámara se cubrió; la solución enzimática se hizo pasar a través de la cámara a aproximadamente 37 ºC y la cámara se agitó para permitir que las perlas destruyesen el tejido pancreático durante la digestión enzimática. Una vez conseguida la disociación y la digestión adecuadas, la digestión finalizó y se recogió el tejido.

Separación tisular - El tejido recogido se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos a 4 ºC. El sobrenadante se aspiró y el tejido se lavó dos veces más en DPBS+. Después del lavado final, el tejido se aplicó a un gradiente discontinuo para purificación. El tejido digerido se suspendió en polisacarosa (Mediatech, VA) con una densidad de 1,108 g/ml a una proporción de 1-2 ml de sedimento tisular por 10 ml de solución de polisacarosa. La suspensión tisular se transfirió después a tubos de centrifugación de policarbonato de fondo redondeado y se aplicaron cuidadosamente a

los tubos soluciones de polisacarosa con densidades de 1,096 y 1,037. Una capa final de DMEM complementó el gradiente de purificación discontinuo. Los tubos de gradiente se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos a 4 ºC sin aplicar contención. Después de la centrifugación, el tejido se recogió de cada interfaz (en total tres interfaces), se lavó varias veces en DPBS+ ,como se ha descrito anteriormente y se recogió en un tubo de ensayo de 50 ml.

Disociación Adicional de Grupos de Células - Opcionalmente, las agrupaciones celulares grandes obtenidas usando el protocolo anterior, pueden disociarse en agrupaciones más pequeñas o en suspensiones celulares sencillas. Después del lavado final, el tejido de cada fracción se suspendió en una solución de 1 X tripsina/EDTA 10 ml que contenía DNasa I 200 U/ml. Los tubos se colocaron en el baño con agua, se aspiraron repetidamente y se vertieron a partir de una pipeta serológica de 10 ml durante 5-6 minutos hasta conseguir una suspensión celular casi sencilla. La digestión se inactivó con la adición de DPBS+ a 4 ºC y los tubos se centrifugaron a 800 rpm durante 5 minutos. Las suspensiones celulares se lavaron con DPBS+ y se cultivaron como se describe a continuación.

Cultivo de Células Pancreáticas - Después del lavado final, las células de cada interfaz se resuspendieron en DMEM, FBS al 2%, penicilina/estreptomicina 100 U/μg, ITS, L-Glutamina 2 mM, $ZnSO_4$ 0,0165 mM (Sigma) y 2-mercaptoetanol 0,38 μM (Invitrogen, CA) (en lo sucesivo en el presente documento “el medio de selección”). Se añadieron 6 ml de suspensión celular en matraces de cultivo tisular T-25 y 12 ml de la suspensión celular se sembraron en matraces T-75. Los matraces se colocaron en incubadoras a 37 ºC con CO_2 al 5%. Después de 2-4 semanas de cultivo, se realizó un cambio de medio completo y se reincorporaron células adherentes al cultivo en DMEM (D-glucosa 2750 mg/l, glutamina 862 mg/l) (Gibco, CA) con SBF al 5% (HyClone, UT), P/S al 1%, $ZnSO_4$ 0,0165 mM (en lo sucesivo en el presente documento “el medio de crecimiento”) y se dejó alcanzar casi confluencia (esta etapa se denomina “pase 0" o “P0”) punto en el que se realizó el pase. El cultivo posterior de las células fue a 5000 células/cm^2 en el medio de crecimiento. Se realizaron pases de cultivos cada 7-10 días a una confluencia de ~ 70-90%.

Ejemplo 2

El establecimiento de líneas celulares derivadas de líquido amniótico humano.

Para aislar las células de la presente invención se usó líquido amniótico extraído de muestras obtenidas mediante amniocentesis habitual realizada a las 17-22 semanas de gestación para determinación de cariotipo fetal (Drexel University). El líquido amniótico se centrifugó durante 7 minutos a 400 x g y se retiró el sobrenadante. El sedimento celular resultante se resuspendió en medio de crecimiento. Las células se cultivaron en placas cubiertas con colágeno de tipo IV (pacas de 1 mg/100 mm) o fibronectina (10 microgramos/ml). La producción de células de muestras de LA tuvo una gran variación (8000-300000 células/muestra) y en algunas muestras también contenían un grado significativo de contaminación eritrocítica. Los cultivos se dejaron sin cambios durante al menos 5-10 días en condiciones hipóxicas (O_2 al 3%). Después de esto, los cultivos se alimentaron con el mismo medio de crecimiento y se cultivaron hasta que las células alcanzaron una confluencia del 70-80%. En esta etapa las células se denominaron “P0”. En algunos cultivos, se aislaron colonias de células usando un anillo de clonación y se subcultivaron en una placa de cultivo diferente. Las células se eliminaron del cultivo P0 usando TrypLE Express™ (Invitrogen) y se sembraron en matraces/discos/placas cubiertos con fibronectina o colágeno de tipo IV a diversas densidades (50-10.000 células/cm^2). Algunas de las células P0 se usaron para clonación por dilución en serie. El tiempo para duplicar la población de las células de crecimiento más rápido fue de ~ 24 horas en los pases tempranos. Las células se dividieron típicamente a una confluencia del 60% y se volvieron a sembrar a 100-10000 células/cm^2.

Ejemplo 3

Análisis de células por PCR.

Se extrajo ARN de células cultivadas en el medio de crecimiento. Se incluyó ARN total de páncreas humano (Ambion, INC) como un control positivo.

Extracción, purificación de ARN y síntesis de ADNc. Se purificaron muestras de ARN mediante unión a una membrana de gel de sílice (Kit Rneasy Mini, Qiagen, CA) en presencia de etanol que contenía, tampón muy salino retirando al mismo tiempo los contaminantes por lavado. Después se eluyó en agua ARN de alta calidad. La producción y la pureza se valoraron por lecturas A260 y A280 en el espectrofotómetro. Se realizaron copias de ADNc a partir de ARN purificado usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad, CA).

Amplificación por PCR en tiempo real y análisis cuantitativo. A menos que se indique de otra manera, todos los reactivos de adquirieron de Applied Biosystems. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron usando el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM™ 7500. Se usó TAQMAN™ FAST UNIVERSAL PCR MASTER MIX™ (ABI, CA) con 20 ng de ARN transcrito inverso en un volumen de reacción total de 20 μl. Cada muestra de ADNc se procesó por duplicado para permitir la corrección de errores al realizar mediciones con pipeta. Se usaron cebadores y sondas TAQMANT™ marcadas con FAM a una concentración de 200 nM. El nivel de expresión para cada gen diana se normalizó usando el kit de control de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) endógeno humano previamente desarrollado por Applied Biosystem. Los cebadores y las sondas se diseñaron

usando el programa informático ABI PRISM PRIMER EXPRESS™ o un kit de análisis de genes previamente desarrollado por ABI. Para cada gen, cualquiera de uno de los cebadores o sondas se diseñó para ser el exón mediador. Esto eliminó la posibilidad de unión de los cebadores/sondas a cualquier ADN genómico presente. Los conjuntos de cebador y sonda se indican de la siguiente manera: Pdx-1 (Hs00426216), Insulina (Hs00355773), glucagón (Hs00174967) y FoxA2 (HNF 3-beta) (Hs00232764). Los cebadores restantes se diseñaron usando el programa PRIMERS (ABI, CA). Después de una incubación inicial a 95 ºC durante 20 segundos, las muestras se sometieron a ciclos 40 veces en dos etapas: una etapa de desnaturalización a 95 ºC durante 3 segundos, seguido de una etapa de hibridación/extensión a 60 ºC durante 30 segundos.

Para cada conjunto cebador/sonda, se determinó un valor de tiempo de ciclo como el número de ciclos al cual la intensidad de fluorescencia de la reacción PCR alcanzó un valor específico en el centro de la región exponencial de amplificación. Un aumento en la expresión de un gen correspondía a una disminución en la cantidad de ciclos necesarios para que la intensidad de fluorescencia alcanzase este valor.

Ejemplo 4

Análisis de Separación de Células Activadas por Fluorescencia (FACS).

Células adheridas se retiraron de placas de cultivo por incubación durante cinco minutos con la solución TRYPLE™ exprés (Gibco, CA). Las células liberadas se resuspendieron en DMEM complementado con FBS al 10% y se recuperaron por centrifugación, seguido por lavado y resuspensión de las células en un tampón de tinción que consistía en BSA al 2%, azida sódica 0,05% (Sigma, MO) en PBS. Si apropiado, las células se bloquearon con el receptor de Fc usando una solución de γ-globulina al 0,1% (Sigma) durante 15 minutos. Se incubaron alícuotas (aproximadamente 10^5 células) con anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina (PE) o con aloficocianina (APC) (5 μl de anticuerpo por 10^6 células), como se indica en la **Tabla I** o con un anticuerpo primario no conjugado. Los controles incluyeron anticuerpos acoplados a isotipos apropiados, células no teñidas y células únicamente teñidas con anticuerpos secundarios conjugados. Todas las incubaciones con anticuerpos se realizaron durante 30 minutos a 4 ºC después de lo cual las células se lavaron con el tampón de tinción. Las muestras que se tiñeron con anticuerpos primarios no conjugados se incubaron durante 30 minutos más a 4 ºC con anticuerpos secundarios marcados conjugados con PE o APC. Véase la **Tabla II** para un listado de anticuerpos secundarios usados. Las células lavadas se sedimentaron y se resuspendieron en el tampón de tinción y las moléculas de superficie celular se identificaron usando una matriz de FACS (BD Biosciences) recogiendo al menos 10.000 sucesos.

Para tinción intracelular, las células se fijaron primero durante 10 minutos con paraformaldehído al 4%, seguido de dos aclarados en el tampón de tinción, centrifugación de las células y la resuspensión de las células en un tampón de permeabilización que contenía Triton-X (Sigma) al 0,5 % en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Las células permeabilizadas se aclararon dos veces con un tampón de aclarado, se centrifugaron y resuspendieron en el tampón de tinción y se incubaron con un anticuerpo conjugado apropiado (5 μl de anticuerpo por 10^6 células) durante 30 minutos a 4ºC. Las muestras que se tiñeron con anticuerpos primarios no conjugados se incubaron durante 30 minutos más a 4 ºC con anticuerpos secundarios marcados conjugados con PE o APC. (**Tabla II**). Las células lavadas se sedimentaron y se resuspendieron en el tampón de tinción y las proteínas internas se identificaron usando una matriz de FACS (BD Biosciences) recogiendo al menos 10.000 sucesos.

Ejemplo 5

Inmunotinción de Células.

Se sembraron 10.000 células/cm^2 en placas de vidrio de micropocillos de 35 mm de base (Matek Corp, MA) en medio de crecimiento. Después de tres días en el cultivo, las células se fijaron durante 10 minutos con paraformaldehído al 4%, seguido de dos aclarados en PBS y adición de un tampón de permeabilización que contenía Triton-X (Sigma) al 0,5% durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA), seguido de tres aclarados adicionales con PBS. Las células fijadas y permeabilizadas se bloquearon con albúmina de suero bovina al 1% (BSA) o con suero de la especie al 4% en el que se aclaró el anticuerpo secundario (cabra, burro o conejo). Las muestras de control incluyeron reacciones con el anticuerpo primario omitido o en las que el anticuerpo primario se sustituyó con inmunoglobulinas correspondientes a la misma concentración a la de los anticuerpos primarios. Las muestras teñidas se aclararon con un reactivo antifade PROLONG® (Invitrogen, CA) que contenía diclorhidrato de diamidino-2-fenilindol (DAPI) para tinción de contraste del núcleo. Las imágenes se adquirieron usando un microscopio invertido Nikon Confocal Eclipse C-1 (Nikon, Japón) y un objetivo de 60X.

Ejemplo 6

Efectos del Tratamiento con Tricostatina A sobre la Expresión de Genes en Células Panc-1 y Fibroblastos Neonatales.

Los fibroblastos neonatales, denominados también Hs27, procedían de prepucios humanos y se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Las líneas Panc-1 eran una línea celular transformada procedente de un carcinoma epiteloide pancreático de origen ductal obtenido también de la ATCC.

Se sembraron fibroblastos o células Panc-1 en una placa de cultivo tisular de 6 pocillos a una densidad de 50.000 células/cm^2. Ambos tipos de células se cultivaron en medio que contenía FBS al 10% y DMEM en condiciones de cultivo celular convencional (37 ºC, CO_2 al 5%). Después de alcanzar la confluencia (2-3 días), a los cultivos se añadió tricostatina A diluida en dimetil sulfóxido (DMSO) y medio 2,5 μM o 5 μM. Como un control vehículo se trataron cultivos paralelos con una concentración de DMSO equivalente.

Se obtuvieron muestras de ARN de los cultivos tratados 48 horas después de la adición de tricostatina A o DMSO. El medio de cultivo se retiró, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se añadió tampón de Lisis RLT que contenía β-mercaptoetanol (Qiagen). Las muestras se homogenizaron columnas Qiashredder (Quiagen) y el ARN se purificó usando el Kit RNeasy Mini (Qiagen). La cantidad y calidad de ARN se determinó usando un espectrofotómetro y se preparó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad).

Los niveles de expresión de Sox17, HNF-3 beta, Pdx-1, insulina y glucagón se determinaron por PCR en tiempo real (RT-PCR), como se describe en el **Ejemplo 3**. Se usaron las muestras de ADNc 20 ng en cada reacción. Las reacciones RT-PCR se realizaron sobre el Applied Biosystems 7500 y los datos se analizaron usando el programa informático adjunto. Se incluyó ADNc de páncreas humano como un control positivo. Los resultados se normalizaron frente a niveles de expresión de GAPDH.

En células Panc-1 no tratadas se detectó un nivel de expresión basal para Sox17, HNF-3 beta, Pdx-1 y glucagón. Sin embargo, la expresión de estos genes no era detectable en fibroblastos neonatales no tratados. (**Tabla I**). El tratamiento de fibroblastos neonatales y células Panc-1 con el inhibidor de HDAC, tricostatina A, causó un aumento en la expresión de Sox17, HNF-3 beta, Pdx-1 y glucagón (**Figura 1, paneles a-d y Tabla III**). La expresión de insulina no cambió en relación con controles no tratados en muestras para cualquier tipo de célula en las condiciones ensayadas.

Los niveles de expresión basal de Sox17, HNF-3 beta, Pdx-1 y glucagón eran mayores en células Panc-1 no tratadas, en comparación con células de fibroblastos neonatales no tratadas. El tratamiento con tricostatina A suscitó una regulación positiva más fuerte de la expresión de genes pancreáticos en células Panc-1 con respecto a fibroblastos, como se mide para los genes endocrinos y pancreáticos representativos evaluados. La expresión de estos genes regulada positivamente también se correlacionó de una manera dependiente de la dosis con la concentración de tricostatina A usada durante el tratamiento, de nuevo con un efecto más fuerte observado en células Panc-1 de estos genes de interés. Las células Panc-1 tratadas durante 48 horas aumentaron la expresión de Sox-17 60 veces más, la expresión de Pdx-1 11 veces más y la expresión de glucagón 5 veces más con 5,0 μM frente a 2,5 μM de tricostatina A. Se observaron efectos de respuesta a dosis similares para fibroblastos aunque la regulación positiva fue en general menos pronunciada (**Figura 1, paneles a-d y Tabla III**).

Estos datos sugieren que la fuerza del inhibidor de HDAC, tricostatina A, con respecto al aumento de expresión de Sox17, HNF-3 beta, Pdx-1 y glucagón es mayor en células Panc-1 que en fibroblastos neonatales. Esto también puede sugerir que con un protocolo de tratamiento determinado, la expresión de genes de linaje específico puede mejorarse a un mayor grado en células previamente diferenciadas (o parcialmente diferenciadas) a lo largo de esta misma ruta de linaje. Sin embargo, el efecto del tratamiento no se limita a células diferenciadas (o parcialmente diferenciadas) de esta ruta sino que puede incluir células de otras rutas de linaje.

Ejemplo 7

Efectos de Tricostatina A sobre la Expresión de Genes en Células Derivadas de Líquido Amniótico.

Se sembraron células derivadas de líquido amniótico en placas de cultivo tisular de 24 pocillos a una densidad de 5000/cm^2 y se cultivaron en medio AMNIOMAX (Invitrogen) en condiciones de cultivo celular convencionales hasta alcanzar la confluencia. Las células se obtuvieron de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 2.** Después de alcanzar la confluencia, a los pocillos con la muestra se les añadió tricostatina A 1,25 μM diluida en DMSO y medio; a los pocillos de control se añadió una concentración equivalente de DMSO control como un control sin tratamiento.

Se obtuvieron muestras de ARN de cultivos tratados a los 30 minutos, 1,5 horas, 3 horas, 6 horas, 12 horas y 24 horas después de adición de tricostatina A o DMSO. El medio de cultivo se retiró, las células se lavaron con PBS y se añadió tampón de lisis RLT con β-mercaptoetanol (Qiagen). El ARN se purificó usando el Kit RNeasy Mini (Qiagen). La cantidad y calidad de ARN se determinó usando un espectrofotómetro y se preparó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad).

Se determinaron los niveles de expresión de Sox17, HNF-3 beta, Pdx-1, insulina y glucagón por PCR en tiempo real. Se usaron muestras de ADNc 20 ng en cada reacción, realizadas sobre Biosystems Applied 7500 de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 3.** El análisis de datos se realizó usando el programa informático adjunto. Se incluyó ADNc de páncreas humano como un control positivo y los resultados se normalizaron frente niveles de expresión de GAPDH.

En células no tratadas se detectó sistemáticamente expresión basal de insulina y Sox-17 mientras que en células no

tratadas se detectó intermitentemente nivel de expresión de HNF-3 beta bajo a diversos momentos. En células no tratadas los genes de expresión de glucagón y Pdx-1 fueron no detectables (**Tabla IV-A).**

El tratamiento de células derivadas de líquido amniótico con tricostatina A produjo una disminución en la expresión del gen de insulina, tuvo relativamente poco o ningún efecto sobre la expresión de Sox-17, aunque indujo un aumento en la expresión de genes de glucagón, HNF-3 beta y Pdx-1 a lo largo del tiempo (**Figura 2, paneles a-d y Tabla IV-B**). La expresión del gen HNF-3 beta en células derivadas de líquido amniótico fue detectable por RT-PCR a > de 35 ciclos a los 30 minutos después de la adición de tricostatina A, aumentado con el tiempo a < de 35 ciclos a las 24 horas. La expresión del gen Pdx-1 fue no detectable 30 minutos después de la adición de tricostatina A, primero detectable a > de 35 ciclos por RT-PCR a las 6 horas, aumentando a < de 35 ciclos o a ~0,1% de niveles pancreáticos humanos a las 24 horas. La expresión de glucagón fue no detectable 30 minutos después de la adición de tricostatina A, primero detectable a > de 35 ciclos por RT-PCR a las 12 horas, aumentando a < de 24 ciclos a las 24 horas (**Figura 2, paneles c-d**).

Estos resultados, junto con los resultados de las células Panc-1 en el **Ejemplo 6,** sugieren un patrón intrínseco en la regulación de conjuntos de genes en un programa de diferenciación de linaje celular particular. Las células diferenciadas tratadas con un agente de remodelación de cromatina pueden regular negativamente algunos genes y regular positivamente otros genes en respuesta a la presencia tanto del inhibidor de HDAC como a señales ambientales u otras señales estimuladoras.

Ejemplo 8

Efectos de Tricostatina A sobre la Expresión de Genes en Células Estromales Derivadas de Páncreas de Pases Tardíos (P14).

Se obtuvieron células estromales derivadas de páncreas humano de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 1.** Las células se sembraron en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos a una densidad de 5000/cm^2 y se cultivaron en DMEM que contenía suero bovino fetal al 10% en condiciones de cultivo celular convencionales hasta alcanzar la confluencia. Después de que las células alcanzasen la confluencia, a los pocillos se añadió tricostatina A 2,5 μM, diluida en DMSO y medio. Como control vehículo, se trataron cultivos paralelos con una concentración de DMSO equivalente.

Se obtuvieron muestras de ARN de cultivos tratados a los 30 minutos, 1,5 horas, 3 horas, 6 horas, 12 horas y 24 horas después de la adición de tricostatina A o DMSO. El medio de cultivo se retiró, las células se lavaron con PBS y se añadió tampón de lisis RLT con β-mercaptoetanol (Qiagen). El ARN se purificó usando el Kit RNeasy Mini (Qiagen). La cantidad y la calidad de ARN se determinaron usando un espectrofotómetro, y se preparó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad).

Los niveles de expresión de Sox17, HNF-3 beta, Pdx-1, insulina y glucagón se determinaron por PCR en tiempo real. Se usaron muestras de ADNc 20 ng en cada reacción, que se realizaron sobre Applied Biosystems 7500 de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 3**. Los datos se analizaron usando el programa informático adjunto. Se incluyó ADNc de páncreas humano como un control positivo y los resultados se normalizaron frente niveles de expresión de GAPDH.

La expresión de los genes de insulina, Pdx-1, glucagón o HNF-3 beta no se detectó en células estromales derivadas de páncreas de pases tardíos. Sin embargo, Sox-17, se detectó a bajos niveles intermitentemente en células no tratadas a diversos momentos en el transcurso del experimento (Tabla V-A). El tratamiento de células estromales derivadas de páncreas de pases tardíos con 2,5 μM de tricostatina A causó un aumento en la expresión de genes de los genes Sox-17, glucagón, HNF-3 beta y Pdx-1 a lo largo del tiempo. Sin embargo, no se observaron cambios en la expresión del gen de insulina (**Figura 3, paneles a-c y Tabla V-B**).

La expresión del gen Sox-17 en células estromales derivadas de páncreas de pases tardíos se detectó sistemáticamente a > de 35 ciclos por RT-PCR 3 horas después de la adición de tricostatina A, aumentando a lo largo del tiempo a niveles de <35 ciclos o ~3% de niveles de páncreas humano a las 24 horas (**Figura 3, panel a**). La expresión del gen HNF-3 beta fue detectable a > de 35 ciclos por RT-PCR a las 6 horas después de la adición de tricostatina A, aumentando a < de 35 ciclos o ~0,075% de páncreas humano a las 24 horas (**Figura 3, panel b**). La expresión del gen Pdx-1 fue detectable a > de 35 ciclos por RT-PCR a las 12 horas después de la adición de tricostatina A, aumentando a < de 35 ciclos o ~0,2% de niveles de páncreas humano a las 24 horas (**Figura 3, panel b**). La expresión de glucagón fue no detectable hasta 24 horas después de la adición de tricostatina A, alcanzando niveles detectables de 35-40 ciclos por RT-PCR en ese momento (**Figura 3, panel c**). Conjuntamente estos datos indican que el tratamiento con el agente inhibidor de HDAC, tricostatina A, puede inducir o potenciar la expresión de genes pancreáticos endocrinos en células que tienen proporciones de expresión basal bajas o que han perdido patrones de expresión previos a lo largo del tiempo en cultivos.

Ejemplo 9

Efectos del Tratamiento Crónico con Tricostatina A sobre la Expresión de Genes en Células Derivadas de

Líquido Amniótico.

Se sembraron células derivadas de líquido amniótico de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 2.** Las células se sembraron en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos una densidad de 5000/cm^2 y se cultivaron en AMNIOMAX (Invitrogen) en condiciones de cultivo celular convencionales hasta alcanzar la confluencia. Después de que las células alcanzasen la confluencia, los pocillos con la muestra se trataron con tricostatina A 500 nM o 1,0 μM diluida en DMSO y medio; los pocillos de control se trataron con una concentración equivalente de DMSO. A intervalos de 24 horas durante el periodo de incubación de tres días, los cultivos se sometieron a un cambio de medio completo y se añadió una dilución de tricostatina A o de DMSO recién preparada, según sea apropiado.

Se obtuvieron muestras de ARN de los cultivos tratados a intervalos de 24 horas después de la adición inicial de tricostatina A o DMSO. El medio de cultivo se retiró, las células se lavaron con PBS y se añadió tampón de lisis RLT con β-mercaptoetanol (Qiagen). El ARN se purificó usando el Kit RNeasy Mini (Qiagen); se determinó la cantidad y calidad de ARN usando un espectrofotómetro. Se preparó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad).

Se determinaron los niveles de expresión de Sox17, HNF-3 beta, Pdx-1, insulina y glucagón por RT-PCR. Se usaron muestras de ADNc 20 ng en cada reacción, realizadas sobre un Applied Biosystems 7500 de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 3.** Los datos se analizaron usando el programa informático adjunto. Como control se incluyó ADNc de páncreas humano. Los resultados se normalizaron frente niveles de expresión de GAPDH.

La expresión basal de los genes de insulina y Sox-17 fueron detectables en células no tratadas derivadas de líquido amniótico. Sin embargo, la expresión de los genes de glucagón y Pdx-1 fue no detectable en células no tratadas por RT-PCR hasta el ciclo 40. HNF-3 beta fue no detectable en células no tratadas a las 24 horas en cultivo pero se expresó débilmente a un tiempo de cultivo de 48 y 72 horas.

Después del tratamiento con tricostatina A, las células derivadas de líquido amniótico expresaron glucagón, HNF-3 beta y Pdx-1 por encima de niveles basales (**Figura 3, paneles a-e y Tabla VI**). La expresión de genes para glucagón y Pdx-1 aumentó de una manera dependiente de la dosis y del tiempo después del tratamiento con tricostatina A, observándose mayor expresión al final de un momento de 72 horas y con la mayor dosis de tratamiento 1 μM (**Figura 4, paneles a y d**). De manera similar, en este ejemplo, la expresión del gen HNF-3 beta también aumentó de una manera dependiente del tiempo observándose mayor expresión al final de un momento de de 72 horas. Sin embargo, la expresión de NHF-3 beta fue esencialmente equivalente con las dos dosis de tratamiento con tricostatina A, 1 μM y 500 nM (**Figura 4, panel b**). A diferencia, la expresión del gen de insulina disminuyó después del tratamiento a niveles no detectables a cualquier momento. La expresión de Sox-17 estaba afectada a un grado menos significativo en relación con niveles de expresión basales iniciales con las dos dosis de tratamiento de tricostatina A. Esto sugiere el grado de la expresión de genes inducida en respuesta a tratamiento con un inhibidor de HDAC puede ser variable.

Ejemplo 10

Efectos del tratamiento crónico con Tricostatina A sobre la expresión de genes en células estromales derivadas de páncreas de pases tardíos

Se obtuvieron células estromales derivadas de páncreas de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 1.** Las células se sembraron en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos a una densidad de 5000/cm^2 y se cultivaron en DMEM con FBS al 10% en condiciones de cultivo celular hasta alcanzar la confluencia. Después de que las células alcanzasen la confluencia, los pocillos con la muestra se trataron con tricostatina A 1,25 μM o 2,5 μM diluida en DMSO y medio, los pocillos de control recibieron DMSO a una concentración equivalente. A intervalos de 24 horas, a lo largo de un periodo de cultivo de tres días, los cultivos se sometieron a un cambio de medio completo y se añadió una dilución de tricostatina A o DMSO recién preparada, según sea apropiado. Se obtuvieron muestras de ARN de cultivos tratados diariamente después de la adición inicial de tricostatina A o DMSO. El medio de cultivo se retiró, las células se lavaron con PBS y se añadió tampón de lisis RLT con β-mercaptoetanol (Qiagen). El ARN se purificó usando el Kit Mini RNeasy (Qiagen) y la cantidad y calidad de ARN se determinó usando un espectrofotómetro. Se preparó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad).

Se determinaron los niveles de expresión de Sox17, HNF-3 beta, Pdx-1, insulina y glucagón por RT-PCR. Se usaron muestras de ADNc 20 ng en cada reacción, la cual se realizó en el Applied Biosystems 7500, de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 3**. Los datos se analizaron usando el programa informático adjunto. Se incluyó ADNc de páncreas humano como un control. Los resultados se normalizaron frente a niveles de expresión de GAPDH.

La expresión de los genes glucagón, HNF-3 beta, Pdx-1 y Sox-17 fue no detectable por RT-PCR en células estromales derivadas de páncreas de pases tardíos. Después de la adición de tricostatina A, la expresión de los genes fue detectable para todos los genes anteriormente mencionados. La expresión del gen de insulina fue no detectable antes del tratamiento y no aumentó después del tratamiento con tricostatina A. Todos los niveles de expresión de los genes glucagón, HNF-3 beta, Pdx-1 y Sox17 aumentaron de manera dependiente del tiempo

observándose mayor expresión para los tres genes a las 72 horas. En algunos casos podían observarse diferencias en los niveles de expresión al añadirse una mayor concentración de tricostatina A a las células (**Figura 5, paneles a-d y Tabla VII**). Los aumentos en la expresión de genes fueron equivalentes con esas dos concentraciones de tratamiento con tricostatina A 1,25 y 2,5 μM; las diferencias a cada momento para cada gen fueron mínimas o no parecieron ser significativas. Los datos implican que para un gen determinado, puede haber un nivel de umbral máximo para que el tratamiento por un inhibidor de HDAC tenga un efecto en la expresión de genes a un momento determinado y que el aumento de la concentración del inhibidor de HDAC no tiene beneficio añadido. Los datos también sugieren que la adición de recarga continua de tricostatina A durante el protocolo de tratamiento puede ser necesaria para mantener aumentos cada vez mayores en la expresión de genes a lo largo del tiempo.

Ejemplo 11

Efectos del tratamiento crónico con Tricostatina A sobre la expresión de genes en células de líquido amniótico y en células estromales derivadas de páncreas.

Se ensayaron varias líneas celulares obtenidas de diferentes donantes de especímenes de líquido amniótico (véase el **Ejemplo 2**) y de páncreas (véase el **Ejemplo 1**) con resultados similares. Para este ejemplo, en las **Tablas VIII-A** y **VIII-B** se muestran dos líneas a número de pases similares aunque derivadas de diferentes especímenes de líquido amniótico. En los ejemplos 2 y 4 anteriores también se usó una de estas líneas de células. Además, este ejemplo también contiene datos comparativos en la **Tabla VIII-C** y en la **Tabla VIII-D** para una sola línea estromal derivada de páncreas cultivada a un número de pases tempranos y tardíos.

Se sembraron células derivadas del líquido amniótico o células estromales derivadas de páncreas en placas de cultivo tisular de 24 pocillos a una densidad de 5000/cm^2 y se cultivaron en AMNIOMAX (Invitrogen) o DMEM con FBS al 10%, respectivamente, en condiciones de cultivo celular convencionales hasta la confluencia. Después de que las células alcanzasen la confluencia, las células derivadas de líquido amniótico se trataron una vez a las 0 horas con tricostatina A 500 nM. Las células estromales derivadas de páncreas se trataron una vez a las 0 horas con tricostatina A 1,25 μM. Se tomaron muestras diariamente para RT-PCR desde cero a seis días a los tiempos indicados en la **Tabla VIII.**

Se obtuvieron muestras de ARN de los cultivos tratados hasta 144 horas después de la adición inicial de tricostatina A o DMSO. El medio de cultivo se retiró, las células se lavaron con PBS y se añadió tampón de lisis RLT que contenía β-mercaptoetanol (Qiagen). Durante el cultivo, el medio no se cambió ni se añadió tricostatina A recién preparada. El ARN se purificó usando el Kit RNeasy Mini (Qiagen) y se determinó la cantidad y calidad de ARN usando un espectrofotómetro. Se preparó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad).

Se usaron muestras de ADNc 20 ng en cada reacción para determinar los niveles de expresión de los siguientes genes en células derivadas de líquido amniótico: Gata1, HNF-3 beta, Pdx-1, insulina y Sox17. De manera similar, se usaron muestras de ADNc 20 ng en cada reacción para determinar el nivel de expresión de los siguientes genes en células estromales derivadas de páncreas: glucagón, HNF-3 beta, insulina y Pdx-1. Se realizó PCR en tiempo real sobre el Applied Biosystems 7500 y los datos se analizaron usando el programa informático adjunto de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 3.**

Los análisis de las muestras obtenidas de la línea celular derivada de líquido amniótico sin tratar usada en los Ejemplos 2 y 4 anteriores mostraron que estas células no expresaban HNF-3 beta ni Gata1 pero expresaban Sox17 y niveles muy bajos de insulina y Pdx-1 (**Tabla VIII-A**). Después de la adición de tricostatina A, la expresión de HNF-3 beta aumentó, pero solamente durante las primeras 48 horas después del tratamiento inicial. Pdx-1 se expresó de manera continua durante 24 horas después del tratamiento, pero la expresión fue no detectable después de ese momento. El gen de insulina no se expresó durante 48 horas después del tratamiento inicial pero fue detectable después de 48 horas. No se observaron cambios en la expresión de Sox17 ni de Gata1 (**Tabla VIII-A**). Estos datos sugieren que, en estas células, la tricostatina puede inhibir la expresión del gen de insulina dentro de las primeras 24-48 horas de cultivo pero está asociado con la regulación positiva de la expresión de Pdx-1 y HNF-3 beta dentro del mismo periodo de tiempo, seguido de un retorno a una expresión no detectable o muy débil después de 48 horas. La tricostatina A puede degradarse en cultivo y puede no tener un impacto prolongado significativo sobre la expresión de genes posteriormente después de 24-48 horas. Por consiguiente, el efecto neto sobre periodos prolongados usando una sola dosis inicial de tricostatina A puede reflejar la naturaleza reversible de este reactivo.

Los análisis de las muestras obtenidos de una línea celular derivada de líquido amniótico no tratada mostraron que estas células no expresaban niveles basales de HNF-3 beta, Pdx-1 ni Gata-1 pero expresaban insulina y Sox-17. Después del tratamiento con tricostatina A, se detectó expresión de HNF-3 beta a las 48 horas, pero como se observa en la primera línea celular derivada de líquido amniótico, HNF-3 beta disminuyó a niveles de expresión muy débiles después de 48 horas (**Tabla VIII-B**). La expresión del gen Pdx-1 se detectó solamente a las 24 horas después del tratamiento con tricostatina A y regresó a niveles no detectables durante el resto del experimento. La expresión del gen de insulina llegó a niveles no detectables después de la adición de tricostatina A 500 nM y después regresó a niveles detectables comenzando a las 72 horas después de la adición de tricostatina A (**Tabla VIII-B**). La expresión de los genes Sox17 y Gata1 no cambió con la adición de tricostatina A. Estos datos sugieren que la tricostatina A puede metabolizarse a las 24-48 horas de la adición a las muestras de cultivo celular, que la

tricostatina A inhibe la expresión del gen de insulina en estas células pero tiene un efecto estimulador reversible sobre otros genes incluyendo HNF-3 beta y Pdx-1 (**Tabla VIII-B**).

Antes del tratamiento, las células estromales derivadas de páncreas de pases tempranos (P5) expresaron Pdx-1 mientras que la expresión de los genes de glucagón, HNF-3 beta e insulina fue no detectable. Veinticuatro horas después del tratamiento con tricostatina A 2,5 μM, todos los genes de HNF3-beta, Pdx-1 y glucagón demostraron expresión regulada positivamente, pero el efecto no se prolongó y solamente la expresión de glucagón fue aún detectable 48 horas después del tratamiento inicial, aunque disminuyó a un nivel inferior al observado a las 24 horas. La expresión del gen de insulina permaneció no detectable y sin cambios a lo largo del experimento (**Tabla VIII-C**). Estos datos sugieren que después del tratamiento con tricostatina A, la expresión de algunos genes, por ejemplo, factores de transcripción, puede ser efímera dependiendo de la inestabilidad intrínseca del ARNm correspondiente y/o de los efectos secundarios de un inhibidor de HDAC sobre la estabilidad del ARNm y/o de otras rutas reguladoras negativas que operan en estas células. La expresión más persistente de otros genes durante un periodo de tiempo similar puede reflejar mayor estabilidad de mensaje y/o efectos reguladores positivos adicionales.

Las células estromales derivadas de páncreas de pases tardíos no tratadas (P14) no expresaron ninguno de los genes de interés, lo que sugiere que la expresión de estos marcadores pancreáticos endocrinos disminuye con el tiempo durante el mantenimiento de cultivo *in vitro*. Después del tratamiento con tricostatina A, la expresión del gen de insulina permaneció no detectable y sin cambios durante el experimento (**Tabla VIII-D**). La expresión de los genes de glucagón, Pdx-1 y HNF-3 beta se detectó por RT-PCR a las 24 horas (**Tabla VIII-D**). Sin embargo, solamente la expresión de glucagón permaneció detectable 48 horas después del tratamiento inicial aunque a un nivel de expresión inferior al observado a las 24 horas y disminuyó a niveles no detectables después de esto. El gen de glucagón se expresó durante un periodo de tiempo más corto en estas células de pase tardío en comparación con células estromales derivadas de páncreas de pases tempranos lo cual puede reflejar una etapa de respuesta menos flexible para los efectos de inhibidores de HDAC.

Ejemplo 12

Efectos de dos tratamientos secuenciales con Tricostatina A a dosis bajas sobre la expresión de genes en células de líquido Amniótico y en células estromales derivadas de páncreas.

Se ensayaron varias líneas celulares obtenidas de diferentes donantes de especímenes de líquido amniótico (véase el **Ejemplo 2**) y de páncreas (véase el **Ejemplo 1**) con resultados similares. Para este ejemplo, en las **Tablas IX -A** y **IX B** se muestran dos líneas a número de pases similares aunque derivadas de diferentes especímenes de líquido amniótico. En los **ejemplos 7 y 9** anteriores también se usó una de estas líneas de células. Además, este ejemplo también contiene datos comparativos en las **Tablas IX-C** y **IX-D** para una sola línea estromal derivada de páncreas cultivada a un número de pases temprano y tardío.

Se sembraron células derivadas de líquido amniótico o células estromales derivadas de páncreas en placas de cultivo tisular de 24 pocillas a una densidad de 5000/cm^2 y se cultivaron en AMNIOMAX (Invitrogen) o DMEM con FBS al 10% respectivamente en condiciones de cultivo celular convencionales hasta alcanzar la confluencia. Después de que las células alcanzasen la confluencia, las células derivadas de líquido amniótico se trataron a las 0 horas con una dosis de tricostatina A 500 nM y las células estromales derivadas de páncreas se trataron con una dosis de tricostatina A 1,25 μM disuelta en DMSO y medio. A las 24 horas, los cultivos celulares se sometieron a un cambio de medio completo para eliminar cualquier resto de tricostatina A. A las 96 horas, los cultivos celulares se realimentaron con medio recién preparado y recibieron una segunda dosis de tricostatina A a la misma concentración a la usada anteriormente. A las 120 horas, los cultivos celulares se sometieron de nuevo a un cambio de medio completo y se cultivaron durante 24 horas más o durante un tiempo de incubación total de 148 horas.

Se tomaron muestras diariamente para RT-PCR a los tiempos indicados en la **Tablas IX-A a D**. El medio de cultivo se retiró y las muestras se aclararon en PBS y después se recogieron en RTL con β-mercaptoetanol (Qiagen). El ARN se purificó usando el Kit Mini RNeasy (Qiagen) y se determinó la cantidad y calidad de ARN usando un espectrofotómetro. Se preparó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad).

Se usaron muestras de ADNc 20 ng en cada reacción para determinar los niveles de expresión de los siguientes genes en células derivadas de líquido amniótico: Gata1, HNF-3 beta, Pdx-1, insulina y Sox17. De manera similar, se usaron muestras de ADNc 20 ng en cada reacción para determinar el nivel de expresión de los siguientes genes en células derivadas de páncreas: glucagón, HNF-3 beta, insulina y Pdx-1. Se realizó PCR en tiempo real en el Applied Biosystems 7500 y los datos se analizaron usando el programa informático adjunto de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 3.**

Antes del tratamiento con tricostatina A, la línea celular derivada de líquido amniótico en los **Ejemplos 7 y 9** no expresó Gata1 ni HNF-3 beta. Sin embargo, la expresión de los genes de insulina, Pdx-1 y Sox-17 se detectó por RT-PCR a los 37 ciclos y 27 ciclos respectivamente (**Tabla IX-A**). Después del tratamiento con tricostatina A 0,5 μM, los niveles de expresión de los genes de Sox-17 y Gata-1 no cambiaron a ningún momento posterior durante el experimento. La expresión de insulina se detectó por RT-PCR a los 36 ciclos antes del tratamiento con tricostatina A, disminuyó a niveles no detectables a las 24 horas después de la primera adición de tricostatina A, reapareciendo a

niveles detectables de 36 ciclos a las 48 horas y permaneciendo a 36 ciclos durante el experimento. Se detectó HNF-3 beta por RT-PCR a los 33 ciclos después del primer tratamiento con tricostatina A, disminuyendo a niveles no detectables después del primer cambio de medio, reapareciendo a los 37 ciclos después del segundo tratamiento con tricostatina A y permaneciendo durante el experimento. La expresión del gen Pdx-1 se detectó a los 37 ciclos por RT-PCR, continuando a este nivel durante 24 horas después de la adición de tricostatina A, pero fue no detectable después de ese momento durante el resto del experimento (**Tabla IX-A**).

Antes del tratamiento con tricostatina A, la línea celular derivada de líquido amniótico en el **Ejemplo 11** no expresó Gata-1, HNF-3 beta o Pdx-1. La expresión de insulina y Sox-17 se detectó por RT-PCR a 35 y 27 ciclos respectivamente (**Tabla IX-B**). Después del tratamiento con tricostatina A 0,5 μM, se expresó HNF-3 beta a 34 ciclos por RT-PCR hasta 72 horas; después de lo cual el nivel de expresión disminuyó durante el resto del experimento a 37 ciclos como se detecta por RT-PCR. Se detectó expresión del gen Pdx-1 a las 24 horas al ciclo 39 por RT-PCR después del tratamiento con tricostatina A, pero después de esto disminuyó y fue no detectable durante el resto del experimento. La expresión del gen de insulina fue no detectable durante las primeras 48 horas del experimento después del tratamiento con tricostatina A pero se detectó por RT-PCR al ciclo 34 a las 72 horas y durante el resto del experimento. Los niveles de expresión de los genes Sox-17 y Gata-1 no cambiaron durante el experimento (**Tabla IX-B**).

Las células estromales derivadas de páncreas de pases tempranos (P5) no expresaron glucagón, HNF-3 beta o insulina antes del tratamiento con tricostatina A. Sin embargo, se detectó expresión de Pdx-1 por RT-PCR en el ciclo 38. Después del tratamiento con tricostatina A 1,25 μM, no hubo cambios en la expresión de insulina. La expresión de los genes Pdx-1 y HNF-3 beta fue detectable por RT-PCR en el ciclo 34 para ambos genes 24 horas después de la adición de tricostatina A; después de esto la expresión cayó a niveles no detectables hasta después de la segunda adición de tricostatina A, después de lo cual la detección fue en el ciclo 33 para Pdx-1 y HNF-3 beta. La expresión del gen glucagón se detectó por RT-PCR en el ciclo 34 durante las primeras 48 horas después de la adición de tricostatina A pero cayó a niveles no detectables hasta después del segundo ciclo de tratamiento con tricostatina A, momento en el cual el nivel de expresión disminuyó al ciclo 37 por RT-PCR (**Tabla IX-C**).

Se observaron similares resultados para las células estromales derivadas de páncreas de pases tardíos (P11): glucagón, HNF-3 beta, insulina y Pdx-1 fueron no detectables antes del tratamiento. Después del tratamiento con tricostatina A a 1,25 μM no hubo cambios en la expresión del gen de insulina; sin embargo, la expresión de los genes glucagón, HNF-3 beta y Pdx-1 podía detectarse por RT-PCR en el ciclo 33 para los tres genes. La expresión de los genes disminuyó posteriormente o fue no detectable hasta después del segundo ciclo de tratamiento de tricostatina A, en el que los niveles de expresión se detectaron por RT-PCR al ciclo 36 para el gen glucagón y 34 para los genes HNF-3 beta y Pdx-1 (**Tabla IX-D**).

En su conjunto estos datos implican que los efectos de tricostatina A sobre la expresión de genes no se prolongan después de su retirada del cultivo. Sin embargo, aplicaciones repetidas de tricostatina A puede restablecer sus efectos sobre la expresión de genes. El patrón global de la expresión de genes suscitado por la tricostatina A puede depender en parte de la concentración de la dosis usada, de la duración del tratamiento y del intervalo entre periodos de tratamiento.

Ejemplo 13

Efectos de dos tratamientos secuenciales con Tricostatina A a dosis altas sobre la Expresión de Genes en células de líquido amniótico y en células estromales derivadas de páncreas.

Se ensayaron varias líneas celulares obtenidas de diferentes donantes de especímenes de líquido amniótico (véase el **Ejemplo 2**) y de páncreas (véase el **Ejemplo 1**) con resultados similares. Para este ejemplo, en las **Tablas X -A** y **X B** se muestran dos líneas a número de pases similares aunque derivadas de diferentes especímenes de líquido amniótico. En los ejemplos 2 y 4 anteriores también se usó una de estas líneas de células. Además, este ejemplo también contiene datos comparativos en las **Tablas X-C** y **X-D** para una sola línea estromal derivada de páncreas cultivada a un número de pases temprano y tardío

Se sembraron células derivadas de líquido amniótico o células estromales derivadas de páncreas en placas de cultivo tisular de 24 pocillos a una densidad de 5000/cm^2 y se cultivaron en AMNIOMAX (Invitrogen) o DMEM con FBS al 10% respectivamente en condiciones de cultivo celular convencionales hasta alcanzar la confluencia. Después de que las células alcanzasen la confluencia, las células derivadas de líquido amniótico se trataron a las 0 horas con una dosis de tricostatina A 1,25 μM y las células estromales derivadas de páncreas se trataron con una dosis de tricostatina A 5,0 μM disuelta en DMSO y medio. A las 24 horas, los cultivos celulares se sometieron a un cambio de medio completo para eliminar cualquier resto de tricostatina A. A las 96 horas, los cultivos celulares se realimentaron con medio recién preparado y recibieron una segunda dosis de tricostatina A a la misma concentración a la usada anteriormente. A las 120 horas, los cultivos celulares se sometieron de nuevo a un cambio de medio completo y se cultivaron durante 24 horas más o durante un tiempo de incubación total de 148 horas

Se tomaron muestras diariamente para RT-PCR a los tiempos indicados en la **Tablas X-A a D**. El medio de cultivo se retiró y las muestras se aclararon en PBS y después se recogieron en RTL con β-mercaptoetanol (Qiagen). El

ARN se purificó usando el Kit Mini RNeasy (Qiagen) y se determinó la cantidad y calidad de ARN usando un espectrofotómetro. Se preparó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad).

Se usaron muestras de ADNc 20 ng en cada reacción para determinar los niveles de expresión de los siguientes genes en células derivadas de líquido amniótico: Gata1, HNF-3 beta, Pdx-1, insulina y Sox17. De manera similar, se usaron muestras de ADNc 20 ng en cada reacción para determinar el nivel de expresión de los siguientes genes en células derivadas de páncreas: glucagón, HNF-3 beta, insulina y Pdx-1. Se realizó PCR en tiempo real en el Applied Biosystems 7500 y los datos se analizaron usando el programa informático adjunto de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 3.**

Antes del tratamiento con tricostatina A, la línea celular derivada de líquido amniótico usada en los **Ejemplos 7 y 9** no expresó Gata1 ni HNF-3 beta. La expresión del gen para insulina, Pdx-1 y Sox-17 se detectó por RT-PCR a los 36, 37 y 27 ciclos, respectivamente. El tratamiento con tricostatina A 1,25 μM produjo una expresión de HNF-3 beta, detectada a los 32 ciclos, sin embargo, esta expresión fue transitoria ya que los niveles de expresión del gen HNF-3 beta disminuyeron después del tratamiento inicial con tricostatina A 1,25 μM a niveles no detectables. Un segundo tratamiento con tricostatina A 1,25 μM produjo expresión del gen HNF-3 beta detectada a los 32 ciclos como se mide por RT-PCR (**Tabla X-A**). Se observaron resultados similares para la expresión del gen Pdx-1. El tratamiento con tricostatina A 1,25 μM produjo un aumento en Pdx-1 desde los ciclos 37 a 32 como se mide por RT-PCR. Sin embargo, este aumento fue transitorio ya que los niveles de expresión del gen Pdx-1 disminuyeron a niveles no detectables después del tratamiento inicial con tricostatina A 1,25 μM. Un segundo tratamiento con tricostatina A 1,25 μM produjo expresión del gen Pdx-1 detectada a los 34 ciclos como se mide por RT-PCR (**Tabla X-A**). La expresión de Gata-1 se detectó únicamente a los 37 ciclos por RT-PCR después de la primera adición de tricostatina A. La expresión de gen Sox-17 no cambió con la adición de tricostatina A. La expresión del gen de insulina fue no detectable después de tratamiento con tricostatina A 1,25 μM pero se detectó a los 36 ciclos como se mide por RT-PCR después del cambio de medio (**Tabla X-A**).

Antes del tratamiento con tricostatina A, la línea celular derivada del líquido amniótico usada en el **Ejemplo 11** no expresó Gata-1, HNF-3 beta ni Pdx-1. Sin embargo, la expresión de insulina y Sox-17 se detectó por RT-PCR a los 35 y 27 ciclos respectivamente. El tratamiento inicial con tricostatina A 1,25 μM estimuló la expresión de HNF-3 beta y Pdx-1. La expresión de HNF-3 beta se detectó a los 35 ciclos como se mide por RT-PCR pero este nivel de expresión disminuyó a 38 ciclos antes de la segunda adición de tricostatina A. Después del segundo tratamiento con tricostatina A a 1,25 μM la expresión del gen HNF-3 beta volvió a detectarse a los 32 ciclos como se mide por RT-PCR. La expresión de Pdx-1 se detectó por RT-PCR a los 33 ciclos después del tratamiento inicial con tricostatina A 1,25 μM. Este nivel de expresión fue no detectable después de retirar la tricostatina A del medio pero volvió a niveles detectables al ciclo 32 como se mide por RT-PCR, después del segundo tratamiento con tricostatina A 1,25 μM (**Tabla X-B**). La expresión del gen Gata-1 no cambió durante el experimento. Aunque la expresión del gen de insulina se detectó antes del tratamiento con tricostatina A a los 35 ciclos como se mide por RT-PCR, esta fue no detectable inmediatamente después del tratamiento. Después de eliminar por lavado la tricostatina A, volvió a detectarse la expresión del gen de insulina y fue detectable a los 36 ciclos como se mide por RT-PCR. Después de la segunda adición de tricostatina A, la expresión del gen de insulina fue de nuevo no detectable. La expresión del gen Sox-17 no cambió durante el experimento (**Tabla X-B**). Estos datos sugieren que la tricostatina A 1,25 μM es una mejor concentración para su uso que la tricostatina A 0,5 μM para aumentar la expresión de los genes HNF-3 beta y Pdx-1 en esta célula. Los efectos de tricostatina A 1,25 μM parecen tener un efecto prolongado después de un cambio de medio, lo que indica que el efecto sobre la expresión de genes persiste más allá del tiempo real que el compuesto está presente. También parece que la tricostatina A puede tener un efecto inhibidor sobre la expresión del gen de insulina.

La expresión de los genes de glucagón, HNF-3 beta e insulina no se detectó en células estromales derivadas de páncreas de pases tempranos (P5) antes del tratamiento con tricostatina A 5,0 μM aunque la expresión de Pdx-1 se observó a los 38 ciclos como se mide por RT-PCR (**Tabla X-C**). Después del tratamiento con tricostatina A 5,0 μM, la expresión de HNF-3 beta y glucagón se detectó a los 34 y 35 ciclos respectivamente como se mide por RT-PCR. La expresión del gen HNF-3 beta no fue detectable después de retirar la tricostatina A, pero la expresión del gen se restableció y fue detectable en el ciclo 36 por RT-PCR después de un segundo tratamiento con tricostatina A. El nivel de expresión del glucagón también disminuyó cuando se retiró la tricostatina A y fue no detectable después de la segunda adición de TSA hasta el final del experimento cuando esta se detectó a los 38 ciclos por RT-PCR. La expresión del gen Pdx-1 se detectó solamente después del segundo tratamiento de tricostatina A al ciclo 32 como se mide por RT-PCR. La expresión del gen de insulina no cambió durante el experimento (**Tabla X-C**). Estos datos sugieren que 24 horas de tratamiento con tricostatina A 5,0 μM fue suficiente para aumentar la expresión de genes de HNF-3 beta y Pdx-1 pero fue no suficiente para aumentar la expresión del gen de insulina en células estromales derivadas de páncreas de pases tempranos (P5).

Los resultados para las células estromales derivadas de páncreas de pases tardíos (P11) fueron similares a los observados para las células estromales derivadas de páncreas de pases tempranos (P5). Antes del tratamiento con tricostatina A, no se detectaron genes de interés, pero después del tratamiento con tricostatina A 5,0 μM, se detectó glucagón en el ciclo 33, se detectó HNF-beta en el ciclo 32 y se detectó Pdx-1 en el ciclo 31 como se mide por RT-PCR. Después del cambio de medio, la expresión de glucagón fue aún detectable por RT-PCR pero los niveles

observados disminuyeron a 38 ciclos como se mide por RT-PCR y no aumentaron con la segunda adición de tricostatina A. La expresión del gen HNF-3 beta fue detectable después del primer tratamiento con tricostatina A a los 32 ciclos pero fue no detectable después del cambio de medio; la expresión fue no detectable de nuevo hasta después del segundo tratamiento de tricostatina A a los 36 ciclos como se mide por RT-PCR. Pdx-1 se expresó a los 31 ciclos después del tratamiento inicial con tricostatina A, pero este nivel de expresión fue no detectable después de retirar la tricostatina A. La expresión del gen Pdx-1 se detectó por RT-PCR a los 34 ciclos después de la segunda adición de tricostatina A. No hubo cambios en la expresión del gen de insulina después del tratamiento con, o extracción de, tricostatina A (**Tabla X-D**). Estos datos sugieren que 24 horas de tratamiento con tricostatina A 5,0 μM no fue suficiente para aumentar la expresión del gen de insulina en células estromales derivadas de páncreas de pases tardíos (P 11), pero que la tricostatina A 5,0 μM fue suficiente para aumentar la expresión de los genes de HNF-3 beta y Pdx-1.

Ejemplo 14

Efectos de dos tratamientos con Tricostatina A a dosis altas sobre la expresión de genes en células de líquido amniótico y en células estromales derivadas de páncreas.

Se ensayaron varias líneas celulares obtenidas de diferentes donantes de especímenes de líquido amniótico (véase el **Ejemplo 2**) y de páncreas (véase el **Ejemplo 1**) con resultados similares. Para este ejemplo, en las **Tablas VIII-A** y **VIII-B** se muestran dos líneas a número de pases similares aunque derivadas de diferentes especímenes de líquido amniótico. En los ejemplos 2 y 4 anteriores también se usó una de estas líneas de células. Además, este ejemplo también contiene datos comparativos en las **Tablas X-C** y **X-D** para una sola línea estromal derivada de páncreas cultivada a un número de pases temprano y tardío

Se sembraron células derivadas de líquido amniótico o células estromales derivadas de páncreas en placas de cultivo tisular de 24 pocillos a una densidad de 5000/cm^2 y se cultivaron en AMNIOMAX (Invitrogen) o DMEM con FBS al 10% respectivamente en condiciones de cultivo celular convencionales hasta alcanzar la confluencia. Después de que las células alcanzasen la confluencia, las células derivadas de líquido amniótico se trataron a las 0 horas con una dosis de tricostatina A 1,25 μM y las células estromales derivadas de páncreas se trataron con una dosis de tricostatina A 5,0 μM disuelta en DMSO y medio. A las 48 horas, los cultivos celulares se sometieron a un cambio de medio completo para eliminar cualquier resto de tricostatina A. A las 96 horas, los cultivos celulares se realimentaron con medio recién preparado y recibieron una segunda dosis de tricostatina A a la misma concentración a la usada anteriormente. A las 120 horas, los cultivos celulares se sometieron de nuevo a un cambio de medio completo y se cultivaron durante 24 horas más o durante un tiempo de incubación total de 148 horas

Se tomaron muestras diariamente para RT-PCR a los tiempos indicados en la **Tablas XI-A a D**. Se obtuvieron muestras de ARN diariamente desde el inicio del experimento. El medio de cultivo se retiró y las muestras se lavaron con PBS y después se recogieron en RTL con β-mercaptoetanol (Qiagen). El ARN se purificó usando el Kit Mini RNeasy (Qiagen) y se determinó la cantidad y calidad de ARN usando un espectrofotómetro. Se preparó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad). Como control se incluyó ADNc de páncreas humano. Los resultados se normalizaron frente a niveles de expresión de GAPDH.

Los niveles de expresión de los genes de Sox17, HNF-3 beta, Pdx-1, insulina y glucagón se analizaron en células derivadas de líquido amniótico, mientras que los niveles de expresión de glucagón, insulina, HNF-3 beta y Pdx-1 se analizaron en células derivadas de páncreas. Se usaron muestras de ADNc 20 ng en cada reacción de PCR en tiempo real. Se realizó RT-PCR sobre el Applied Biosystems 7500, de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 3**. Los datos se analizaron usando el programa informático adjunto.

Antes del tratamiento con tricostatina A, la línea celular derivada de líquido amniótico usada en los **Ejemplos 7 y 9** no expresaron Gata1 ni HNF-3 beta. Los genes de insulina y Pdx-1 se expresaron en el ciclo 36 y 37, respectivamente, como se detecta por RT-PCR y la expresión de Sox-17 se detectó por RT-PCR en el ciclo 27. Después del tratamiento con tricostatina A 1,25 μM, la expresión del gen Gata-1 se detectó en el ciclo 37 por RT-PCR pero no se detectó durante el resto del experimento. La expresión del gen HNF-3 beta se detectó por RT-PCR en el ciclo 31 después de la adición de tricostatina A 1,25 μM pero este nivel de expresión disminuyó a niveles no detectables hasta la segunda adición de tricostatina A. Después del segundo tratamiento con tricostatina A, la expresión del gen HNF-3 beta aumentó a 35 ciclos como se detecta por RT-PCR. La expresión del gen de insulina fue no detectable por RT-PCR después de la adición inicial de tricostatina A 1,25 μM. La expresión del gen Pdx-1 se detectó por RT-PCR en el ciclo 32 después de la adición de tricostatina A 1,25 μM, que disminuyó después del cambio de medio pero aumentó de nuevo después del segundo tratamiento con tricostatina A a 37 ciclos como se detecta por RT-PCR. Los niveles de expresión del gen Sox-17 no cambiaron durante el experimento (**Tabla XI-A**). Estos datos proporcionan apoyo adicional de que el tratamiento continuado con tricostatina A produce el aumento de la expresión de los genes HNF-3 beta y Pdx-1, que puede medirse un efecto más fuerte sobre la expresión de genes con la exposición a una mayor concentración de tricostatina A durante un periodo de tiempo más largo y que la expresión del gen de insulina puede inhibirse en este tipo de célula mediante la adición de tricostatina A.

Antes del tratamiento con tricostatina A, la línea celular derivada de líquido amniótico usada en el **Ejemplo 11** no expresó Gata-1, HNF-3 beta ni Pdx-1 antes del tratamiento con tricostatina A. Sox-17 e insulina se expresaron en los

ciclos 27 y 35, respectivamente, como se detecta por RT-PCR, antes del tratamiento con tricostatina A. Después del tratamiento con tricostatina A 1,25 μM, se detectó la expresión de Gata-1 en el ciclo 38 por RT-PCR, aunque esto no duró más de 24 horas. La expresión de Gata-1 se detectó de nuevo en el ciclo 38 por RT-PCR después del segundo tratamiento con tricostatina A. La expresión de HNF-3 beta se detectó por RT-PCR en el ciclo 34 durante las primeras 72 horas con una disminución al ciclo 37 a las 96 horas y un aumento en el ciclo 33 después del segundo tratamiento con tricostatina A. La expresión de insulina fue no detectable después del tratamiento con tricostatina A 1,25 μM y la expresión no cambió durante el experimento. La expresión de Pdx-1 se detectó en el ciclo 35 por RT-PCR después del tratamiento inicial de 48 horas con tricostatina A 1,25 μM. Este nivel fue de nuevo no detectable después de retirar la tricostatina A pero se detectó por RT-PCR en el ciclo 34 después del segundo tratamiento de tricostatina A. Los niveles de expresión del gen Sox-17 no cambiaron durante el transcurso del experimento (**Tabla XI-B**). Estos datos proporcionan apoyo adicional de que el tratamiento continuado con tricostatina A produce un aumento de la expresión de los genes HNF-3 beta y Pdx-1, que puede medirse un efecto más fuerte sobre la expresión de genes con la exposición a una mayor concentración de tricostatina A durante un periodo de tiempo más largo y que la expresión del gen de insulina puede inhibirse en este tipo de célula mediante la adición de tricostatina A.

Las células estromales derivadas de páncreas de pases tempranos (P5) expresaron Pdc-1 en el ciclo 38 como se detecta por RT-PCR pero no expresaron glucagón, HNF-3 beta ni insulina antes del tratamiento con tricostatina A 5,0 μM. Después del tratamiento con tricostatina A, la expresión del gen glucagón se detectó por RT-PCR en el ciclo 35. Este nivel de expresión del gen aumentó al ciclo 33 como se detecta por RT-PCR a las 48 horas pero disminuyó a 38 ciclos después de retirar la tricostatina A. Después de la segunda adición de tricostatina A, la expresión del gen glucagón aumentó a 37 ciclos. La expresión del gen HNF-3 beta fue detectable a los 34 ciclos por RT-PCR después del tratamiento con tricostatina A y este nivel de expresión persistió hasta la retirada de tricostatina A. Cuando se añadió tricostatina A a las células, la expresión se detectó por RT-PCR en el ciclo 33. La expresión del gen Pdx-1 fue no detectable después del tratamiento inicial con tricostatina A pero se detectó por RT-PCR en el ciclo 32 a las 48 horas. Una vez retirada la tricostatina A del medio, la expresión del gen fue no detectable (**Tabla XI-C**). La expresión del gen Pdx-1 se detectó a los 32 ciclos después de la segunda adición de tricostatina como se mide por RT-PCR. La expresión del gen de insulina fue no detectable mientras que tricostatina A permaneciera en el medio pero se detectó a los 33 ciclos por RT-PCR después del cambio de medio. Después de añadir tricostatina A al medio de nuevo, la expresión del gen de insulina fue no detectable (**Tabla XI-C**). Estos datos proporcionan apoyo adicional de que el tratamiento continuado con tricostatina A produce un aumento de la expresión de los genes HNF-3 beta y Pdx-1, que puede medirse un efecto más fuerte sobre la expresión de genes con la exposición a una mayor concentración de tricostatina A durante un periodo de tiempo más largo y que la expresión del gen de insulina puede inhibirse en este tipo de célula mediante la adición de tricostatina A

Los resultados para las células estromales derivadas de páncreas de pases tardíos (P11) fueron similares a los registrados para las células estromales derivadas de páncreas de pases tempranos (P5). No se detectaron genes de interés antes del tratamiento de tricostatina A 5,0 μM, pero después de la adición de tricostatina A, se detectó glucagón en el ciclo 33 por RT-PCR y se detectó HNF-3 beta a los 32 ciclos por RT-PCR. Pdx-1 se detectó por RT-PCR en el ciclo 31. La expresión del gen de insulina no cambió a lo largo del experimento. La expresión del gen de glucagón se detectó a los 33 ciclos por RT-PCR durante 48 horas después del tratamiento inicial con tricostatina A 5,0 μM. Este nivel de expresión de gen de glucagón disminuyó a 37 ciclos después de la retirada de tricostatina A y fue no detectable antes del segundo tratamiento con tricostatina A momento en el cual se detectó en el ciclo 35 por RT-PCR. La expresión de los genes HNF-3 beta y Pdx-1 siguió el mismo patrón. La expresión se detectó durante 48 horas, después de la adición de tricostatina A 5,0 μM, a los 33 y 32 ciclos respectivamente pero fue no detectable por RT-PCR después del cambio de medio y la retirada de tricostatina A. Una vez que se añadió de nuevo la tricostatina A, la expresión del gen HNF-3 beta aumentó a 34 ciclos y la expresión del gen Pdx-1 aumentó a 33 ciclos como se detecta por RT-PCR (**Tabla XI-D**). Estos datos proporcionan apoyo adicional de que el tratamiento continuado con tricostatina A produce un aumento de la expresión de los genes HNF-3 beta y Pdx-1, que puede medirse un efecto más fuerte sobre la expresión de genes con la exposición a una mayor concentración de tricostatina A durante un periodo de tiempo más largo y que la expresión del gen de insulina puede inhibirse en este tipo de célula mediante la adición de tricostatina A.

Ejemplo 15

Efectos de un tratamiento de 6 horas con Tricostatina A sobre la expresión de genes en células de líquido amniótico y en células estromales derivadas de páncreas.

Se sembraron células derivadas de líquido amniótico o células estromales derivadas de páncreas en placas de cultivo tisular de 24 pocillos a una densidad de 5000/cm^2 y se cultivaron en AMNIOMAX (Invitrogen) o DMEM con FBS al 10% respectivamente en condiciones de cultivo celular convencionales hasta alcanzar la confluencia. Después de que las células alcanzasen la confluencia, las células derivadas de líquido amniótico se trataron con tricostatina A 1,25 μM y las células estromales derivadas de páncreas se trataron con tricostatina A 5,0 μM. El medio se cambió 6 horas después de la adición de tricostatina A y los cultivos se mantuvieron durante el resto del experimento. Se ensayaron diversas líneas celulares obtenidas de líquido amniótico (véase el **Ejemplo 2**) y páncreas (véase el **Ejemplo 1**). Se tomaron muestras se extrajeron para RT-PCR a los tiempos indicados en la

Tabla XII-A-D.

Se obtuvieron muestras de ARN en el momento de eliminar la tricostatina A y a las 24 horas desde el inicio del experimento. Los medios de cultivo se retiraron y las células se lavaron con PBS y después se recogieron en tampón de lisis RLT con β-mercaptoetanol (Qiagen). Se purificó ARN usando el Kit RNeasy Mini (Qiagen) y se determinó la cantidad y calidad de ARN usando un espectrofotómetro. Se preparó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad). Como control, se incluyó ADNc de páncreas humano. Los resultados se normalizaron frente a niveles de expresión de GAPDH.

Se analizaron los niveles de expresión de Sox17, HNF-3 beta, Pdx-1, insulina y Gata-1 en células derivadas de líquido amniótico mientras que los niveles de expresión de glucagón, insulina, Pdx-1 y HNF-3 beta se analizaron en células derivadas de páncreas. Se usó ADNc 20 ng en cada reacción RT-PCR, que se realizó sobre el Applied Biosystems 7500, de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 3.** Los datos se analizaron usando el programa informático adjunto.

Antes del tratamiento con tricostatina A, la línea celular derivada de líquido amniótico usada en los **Ejemplos 7 y 9** no expresó Gata-1, ni HNF-3 beta. Después del tratamiento con tricostatina A 1,25 μM, se detectó la expresión de HNF-3 beta por RT-PCR en el ciclo 32, pero después del lavado, aumentó a 35 ciclos. La expresión del gen de insulina disminuyó de 36 ciclos a niveles no detectables como se determina por RT-PCR después de la adición de tricostatina A (**Tabla XII-A**). La expresión de Pdx-1 se detectó en el ciclo 37 por RT-PCR antes del tratamiento con tricostatina A. Este nivel de expresión disminuyó a 35 ciclos después del tratamiento con tricostatina A pero fue no detectable después de retirar la tricostatina A. La expresión de Gata-1 y Sox-17 permaneció sin cambios con la adición de tricostatina A (**Tabla XII-A**).

Antes del tratamiento con tricostatina A, la línea celular derivada de líquido amniótico usada en el **Ejemplo 11** no expresó Gata-1, HNF-3 beta ni Pdx-1. La insulina y Sox-17 se expresaron en el ciclo 35 y en el ciclo 27 respectivamente por RT-PCR. Fueron suficientes 6 horas de tratamiento con tricostatina A 1,25 μM para aumentar la expresión de HNF-3 beta y Pdx-1 a ciclos 31 y 35 respectivamente, como se detecta por RT-PCR. Después de la retirada de tricostatina A, la expresión de HNF-3 beta se detectó en el ciclo 37 por RT-PCR y Pdx-1 fue no detectable. La expresión del gen de insulina fue no detectable después de la adición de tricostatina A. Los niveles de expresión de los genes Gata-1 y Sox-17 permanecieron sin cambios después del tratamiento de tricostatina A 1,25 μM (**Tabla XII-B**). Estos datos proporcionan apoyo de que la expresión del gen de insulina puede inhibirse mediante el tratamiento con tricostatina A en estas células y que 6 horas de tratamiento fueron suficientes para observar un aumento en la expresión de genes de HNF-3 beta y Pdx-1.

Las células estromales derivadas de páncreas de pases tempranos (P5) no expresaron glucagón, HNF-3 beta ni insulina antes de la adición de tricostatina A 5,0 μM. Después del tratamiento con tricostatina A la expresión del gen glucagón se detectó por RT-PCR en el ciclo 37, la expresión del gen HNF-3 beta se detectó por RT-PCR en el ciclo 35. Después de retirar la tricostatina A, la expresión del gen glucagón permaneció igual pero HNF-3 beta fue no detectable. La expresión del gen insulina permaneció no detectable hasta retirar la tricostatina A del medio, en el que este se detectó después en el ciclo 32 por RT-PCR. La expresión del gen Pdx-1 se detectó a los 38 ciclos por RT-PCR antes del tratamiento con tricostatina, pero después del tratamiento este nivel de expresión aumentó a 35 ciclos (**Tabla XII-C**). Estos datos sugieren que el tratamiento con tricostatina A 5,0 μM durante 6 horas no fue suficiente para aumentar la expresión de Pdx-1, pero continúa suprimiendo la expresión del gen de insulina como se ha indicado anteriormente.

Las células estromales derivadas de páncreas de pases tardíos (P11) no expresaron ninguno de los genes de interés antes del tratamiento con tricostatina A 5,0 μM. Después del tratamiento con tricostatina A, se detectó glucagón a 37 ciclos, HNF-3 beta se detectó a 36 ciclos y Pdx-1 se detectó a 37 ciclos por RT-PCR. No hubo cambios en la expresión del gen de insulina después de la adición de tricostatina A. Después de la retirada de tricostatina A, la expresión del gen de glucagón se detectó a los 35 ciclos por RT-PCR, mientras que la expresión de los genes HNF-3 beta y Pdx-1 fue no detectable (**Tabla XII-D**). Estos datos sugieren la tricostatina A es necesaria para regular positivamente la expresión de los genes de HNF-3 beta y Pdx-1.

Ejemplo 16

Exploración del inhibidor de HDAC para la diferenciación celular

Se puso a disposición una biblioteca de inhibidores de moléculas pequeñas para los fines de exploración. La biblioteca representaba un conjunto de estructuras químicas específico diseñado para determinar una posible inhibición enzimática. Los compuestos se disolvieron en DMSO y se diluyeron a reservas 1 mM en DMSO al 30%/HEPES 50 mM, se sembraron en placas de formato de 96 pocillos y se desecaron por congelación a -80ºC antes de su uso.

Se sembraron células derivadas de líquido amniótico en placas de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo plano a una densidad de 15000 células/pocillo y se cultivaron hasta alcanzar la confluencia en AMNIOMAX (Invitrogen) totalmente complementado en condiciones de cultivo celular convencionales. Después de confluencia, las células se

trataron a las 0 horas con inhibidor de HDAC 5 μM diluido en medio de cultivo (concentración de ensayo final de DMSO al 0,5%). Los pocillos de control negativo recibieron solo diluyente. Los pocillos de control positivo recibieron TSA 5 μM. A las 24 horas, se extrajeron muestras para RT-PCR. El medio de cultivo se retiró, las células se lavaron con PBS, y se recogió un lisado en RLT con β-mercaptoetanol (Qiagen). Se purificó ARN usando el Kit RNeasy Mini (Qiagen) y se determinó la cantidad y calidad de ARN usando un espectrofotómetro. Se preparó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad). Como control se incluyó ADNc de páncreas humano. Los resultados se normalizaron frente a niveles de expresión de GAPDH.

En cada reacción de PCR en tiempo real, se analizaron los niveles de expresión del gen de Pdx-1, usando ADNc 20 ng. La RT-PCR se realizó sobre el Applied Biosystems 7500 de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 15**. El análisis de los datos se realizó usando el programa informático adjunto. En la **Tabla XIII-A** se presentan los resultados para todas las primeras exploraciones.

Los compuestos que produjeron un aumento en la expresión del gen Pdx-1 a un nivel al menos el 80% del inducido por TSA se consideraron "aciertos" y se volvieron a ensayar en el protocolo anterior. De 572 compuestos ensayados, 56 se consideraron "aciertos" (índice de acierto del 9,8%). En los ensayos de confirmación, todos los 56 aciertos pudieron aumentar la expresión del gen Pdx-1 a un nivel al menos el 80% del producido por TSA (índice de confirmación del 100%). En la **Tabla XIII-B** se presentan los resultados para la exploración de la confirmación.

Los compuestos confirmados también se exploraron por triplicado para determinar efectos citotóxicos usando un ensayo MTS tetrazolio (Promega; Cell Titer 96 AQ_{ueous}). En placas de 96 pocillos, se expusieron cultivos paralelos de células derivadas de líquido amniótico al compuesto 5 μM durante 24 o 72 horas en condiciones de cultivo convencionales. Se añadió reactivo MTS a cada pocillo siguiendo las instrucciones del fabricante y se cultivó a 37 ºC durante una hora y después se realizó la lectura a 490 nm sobre un espectrofotómetro convencional. Las lecturas numéricas de los pocillos tratados se compararon con las de los pocillos de control no tratados y se usaron para calcular un índice de % de viabilidad en correlación con la actividad metabólica celular. En las **Figuras 6 y 7** se presenta un resumen de los resultados para todos los compuestos comparando medidas de viabilidad para los dos tiempos de exposición.

Se seleccionaron los diez primeros compuestos más eficaces basándose en la mayor inducción de la expresión del gen Pdx-1 y en la menor toxicidad. Estos compuestos se ensayaron adicionalmente en un ensayo de ajuste de dosis doble usando células derivadas de líquido amniótico (**Tabla XIII-C y Figura 8**) o células derivadas de páncreas (**Tabla XIII-D y Figura 9**). Las concentraciones de los compuestos se ensayaron sobre un intervalo de 0,15 a 10 μM para un tiempo de exposición de 24 horas antes del análisis de la expresión del gen Pdx-1. También se repitió por triplicado un ensayo de citotoxicidad MTS con un ajuste de dosis de cada compuesto en los dos tipos de células. En las **Figuras 10 y 11** se presenta un resumen de resultados. La **Figura 12** compara la fuerza de la inhibición enzimática para un ajuste de dosis de éxitos seleccionados frente a TSA, un conocido inhibidor de HDAC.

Ejemplo 17

Efectos de un tratamiento de combinación del Inhibidor de HDAC y MG-132 sobre la expresión de genes en una línea celular derivada de páncreas adulto.

Se trataron células derivadas de páncreas con tricostatina A (TSA), a diversas concentraciones en solitario o en combinación secuencial con un inhibidor proteosómico permeable a células, MG-132, también añadido a diversas concentraciones. En resumen, las células se sembraron en placas y se cultivaron hasta una confluencia monocapa en placas de grupos de 6 pocillos en medio de cultivo normal compuesto por glucosa con alto contenido en DMEM con FCS al 10%. A las 0 horas, se recogió una muestra de células no tratadas para un control basal. Se diluyó MG-132 (EMD Biosciences) disuelto en DMSO a una concentración final de 1 μM o 10 μM en medio recién preparado y se dejó incubar con las células durante 24 horas en condiciones de cultivo convencionales. Después de 24 horas, el medio de cultivo se retiró, se sustituyó por medio recién preparado que contenía una dilución final TSA 1,25 μM o 2,5 μM y se dejó incubar durante 24 horas más. Los pocillos de control negativo contenían un volumen equivalente de medio y diluyente DMSO pero no se trataron con compuesto.

Se obtuvieron muestras de ARN de los cultivos tratados 48 horas después de iniciar el tratamiento. El medio de cultivo se retiró, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se añadió tampón de lisis RLT que contenía β-mercaptoetanol (Qiagen). Las muestras se homogeneizaron usando columnas Qiasheredder (Qiagen) y se purificó ARN usando el Kit RNeasy Mini (Qiagen). Se determinó la cantidad y calidad de ARN usando un espectrofotómetro y se preparó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad).

Se determinaron los niveles de expresión de Pdx-1, HNF-3 beta, insulina y Nkx6.1 por PCR en tiempo real (RT-PCR) usando ADNc 20 ng por reacción, como se describe en el **Ejemplo 3**. Las reacciones de RT-PCR se realizaron sobre el Applied Biosystems 7500 usando el programa informático adjunto para el análisis de los datos. Como control positivo se incluyó ADNc de páncreas humano. Los resultados se normalizaron frente a niveles de expresión de GAPDH.

Los resultados en la **Tabla XIV - Tabla XVI** demuestran que la TSA puede inducir un nivel bajo de expresión de

genes para Pdx-1, HNF-3 beta y Nkx6.1 en células derivadas de páncreas adulto después de 24 horas de tratamiento. Las células no tratadas demostraron sistemáticamente que no existía nivel de expresión basal de estos genes. El inhibidor proteosómico MG-132 no pudo inducir la expresión de genes cuando se añadió en solitario a los cultivos (con la excepción de MG-132 10 μM que indujo un nivel bajo de expresión de Nkx6.1) ni el tratamiento previo con el compuesto MG-132 antes de la adición de TSA potenció los niveles de expresión de genes. La expresión de gen de insulina no se produjo en células derivadas de páncreas adulto y no cambió con respecto a los controles no tratados en ninguna de las muestras ensayadas.

La secuencia de la adición de MG-132 y TSA a las células en el cultivo invirtió los resultados mostrados en la **Tabla XV.** La TSA en solitario pudo inducir un nivel bajo de expresión del gen para Pdx-1, HNF-3 beta y Nkx6.1 en células derivadas de páncreas adulto y esta expresión de genes observada no se potenció mediante el tratamiento previo o posterior de las células con el compuesto MG-132. En algunos casos, la expresión de genes inducida disminuyó si se eliminaba la TSA en las 24 horas finales de cultivo, lo que sugiere que los efectos de un inhibidor de HDAC sobre la remodelación de la cromatina son reversibles a lo largo del tiempo después de eliminación y recuperación.

La capacidad de la TSA para inducir la expresión de genes se ensayó en diferentes pases de células derivadas de páncreas adulto, en solitario o en combinación con MG-132, para determinar si la duración del tiempo en cultivo es un factor en su susceptibilidad con respecto a un estímulo de diferenciación. Los resultados de la **Tabla XVI** muestran niveles de expresión de genes para células de pase 10 y pase 19 después de tratamiento con TSA, en solitario o combinación con MG-132. En global, en este ejemplo, las células de pases tardíos (P19) demostraron una expresión de genes ligeramente mejor en comparación con las células de pases tempranos (P10), pero los resultados no eran coherentes o estadísticamente significativos para genes o tratamientos individuales.

Se ensayó un intervalo de concentraciones de dosis y tiempos de exposición para el tratamiento con el compuesto MG-132 seguido por adición secuencial de TSA (1,25 μM o 2,5 μM durante 24 horas) para detectar la inducción mejorada de la expresión de genes en células derivadas de páncreas adulto. Los resultados se muestran en la **Tabla XVII** y en la **Tabla XVIII.** Se observó un ligero efecto aditivo para las condiciones de tratamiento de combinación, pero no hubo fuerte mejora en la expresión de genes durante el tratamiento con TSA en solitario para Pdx-1, HNF-3 beta o Nkx6.1. No hubo expresión del gen de insulina en células derivadas de páncreas adulto y no hubo cambios con respecto a controles no tratados en ninguna de las muestras ensayadas.

Se expusieron también células derivadas de páncreas adulto a tratamientos secuenciales con MG-132 seguido de TSA seguido de un medio de diferenciación en un esfuerzo para mejorar la diferenciación y la expresión de genes específicos de linaje. Los resultados para la expresión del gen Pdx-1 en células derivadas de páncreas adulto se muestran en la **Tabla XVIII** para un intervalo de dosis de compuestos y tiempos de exposición en un medio de diferenciación ejemplar. El medio de diferenciación nº 2 contenía DMEM con bajo contenido en glucosa, FCS al 1%, activina A 20 ng/ml, betacelulina 10 ng/ml, bFGF 20 ng/ml, nicotinamida 10 mM y agonista del receptor de GLP-1 50 nM. Como se ha observado anteriormente (**Tabla XVII**), la expresión de genes inducida disminuyó después de retirar TSA del cultivo, lo que sugiere que los efectos de un inhibidor de HDAC en la remodelación de cromatina son reversibles a lo largo del tiempo después de eliminación y la recuperación. La expresión de genes no mejoró durante el tratamiento con TSA en solitario para todas las categorías de tratamiento.

Se ensayaron agentes de diferenciación adicionales en combinación con TSA en un intento para mejorar la diferenciación y la expresión de genes específicos de linaje. GSI-IX y GSI-X (EMD Biosciences) son dos inhibidores de gamma secretasa que bloquean la activación y señalización de Notch, modulando por lo tanto la diferenciación celular. La **Tabla XIX** muestra los resultados de la expresión de genes para células tratadas con diversas concentraciones de cada inhibidor de gamma secretasa, en solitario y en combinación secuencial con TSA. Ni GSI-IX ni GSI-X pudieron inducir la expresión de los genes Pdx-1, HNF-3 beta o Nkx6.1 cuando se añadieron en solitario a cultivos de células derivadas de páncreas adulto ni el tratamiento previo con cualquier compuesto GSI, antes de la adición de TSA, mejoró los niveles de expresión. No hubo expresión del gen insulina en células derivadas de páncreas adulto y no hubo cambios con respecto a controles no tratados en ninguna de las muestras ensayadas.

Se identificó una serie de inhibidores exclusivos de HDAC a partir de una exploración basada en células que tenía capacidad significativa para inducir la expresión de genes con respecto a TSA (**Ejemplo 16**). Estos compuestos se ensayaron en células derivadas de páncreas adulto, en solitario o en adición secuencial con el inhibidor proteosómico MG-132. En la **Tabla XX** se muestran los resultados para el gen Pdx-1 y en la **Tabla XXI** los del gen de insulina. En células derivadas de páncreas adulto sin tratar se demostró sistemáticamente nivel de expresión no basal de Pdx-1. Cada inhibidor de HDAC indujo un nivel de expresión bajo del gen Pdx-1. Sin embargo, el tratamiento previo con MG-132 no mejoró significativamente la expresión del gen Pdx-1 más allá de la observada con inhibidores de HDAC individuales en solitario. No hubo expresión del gen insulina en células derivadas de páncreas adulto y no hubo cambios con respecto a controles no tratados en ninguna de las muestras ensayadas.

Ejemplo 18

Ajuste de la dosis de agentes de remodelación de cromatina o desmetilantes de ADN a diversos tiempos.

Se sembraron células de líquido amniótico en placas de cultivo duplicadas con conjuntos de copias múltiples.

Después de alcanzar la confluencia (2-3 días), se añadió 5-azacitidina (5-Aza-2'-desoxicitidina; EMD Biosciences) a cada conjunto de copias a un intervalo de concentración final de 0,156 μM a 2,5 μM. Se añadió una cantidad equivalente de disolvente a los cultivos de control sin tratamiento. Las células regresaron a condiciones de cultivo convencional durante 24 horas después de lo cual se retiró el medio, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y a cada pocillo se añadió tampón de lisis RLT que contenía β-mercaptoetanol (Qiagen). Las muestras se homogeneizaron usando columnas Qiasheredder (Qiagen) y se purificó ARN usando el Kit RNeasy Mini (Qiagen), se determinó la cantidad y calidad de ARN usando un espectrofotómetro y se preparó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad). Se usaron muestras de ADNc 20 ng en cada reacción para determinar los niveles de expresión de Pdx-1 o HNF-3 beta. Se realizó PCR en tiempo real sobre un sistema Applied Biosystems 7500 y los datos se analizaron usando el programa informático adjunto.

La **Tabla XXIII** muestra que las células de líquido amniótico no tratadas no tienen nivel de expresión basal de Pdx-1 ni de HNF-3 beta. La 5-Aza-2'desoxicitidina (5-Aza) es un inhibidor de ADN metiltransferasas que puede influir en la remodelación de la cromatina. El tratamiento de células de líquido amniótico solo con 5-Aza no indujo Pdx-1 ni HNF-3 beta. Sin embargo, el tratamiento con TSA, inhibidor de HDAC, pudo inducir la expresión de los genes Pdx-1 y HNF-3 beta.

Ejemplo 19

Cambios en la expresión de genes por la adición simultánea de un inhibidor de Histona Desacetilasa y un agente desmetilante de ADN.

Se sembraron en placas células de líquido amniótico y se dejó que alcanzasen la confluencia (2-3 días). Se añadió tricostatina A y 5-aza-2'-desoxicitidina al cultivo a un ajuste de dosis óptimo, no tóxico, durante 24 horas. Al final de periodo de tratamiento, el medio se retiró, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y a cada pocillo se añadió tampón de lisis RLT que contenía β-mercaptoetanol (Qiagen). Las muestras se homogeneizaron usando columnas Qiasheredder (Qiagen) y se purificó ARN usando el Kit RNeasy Mini (Qiagen). Se determinó la cantidad y calidad de ARN usando un espectrofotómetro y se preparó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad). En cada reacción se usaron muestras de ADNc 20 ng para determinar niveles de expresión de Pdx-1 y HNF-3 beta. Se realizó PCR en tiempo real sobre un sistema Applied Biosystems 7500 y los datos se analizaron usando el programa informático adjunto.

La **Tabla XXIV** muestra que las células de líquido amniótico no tratadas no tienen expresión basal de Pdx-1 ni de HNF-3 beta, pero la expresión de genes puede inducirse después de tratamiento 24 horas con TSA 1,25 μM. El tratamiento de células de líquido amniótico con 5-Aza en solitario no indujo Pdx-1 ni HNF-3 beta ni mejoró la expresión de genes cuando se usó en combinación con TSA, el inhibidor de HDAC.

Para inducir la expresión de genes en células de líquido amniótico también se usó un tratamiento secuencial con 5-Aza-2'-desoxicitidina seguido de TSA. Las monocapas confluentes se trataron previamente durante 6 horas con 5-Aza después de lo cual se añadió TSA en combinación durante las últimas 18 horas de cultivo. Se realizaron lisados celulares, extracción de ARN, síntesis de ADNc y PCR como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la **Tabla XXV** los resultados también **i**ndican que 5-Aza en solitario no indujo la expresión de los genes Pdx-1 ni HNF-3 beta ni demostró un efecto aditivo cuando se usó como un tratamiento previo en combinación con TSA, el inhibidor de HDAC.

Ejemplo 20

Los efectos del Tratamiento con Tricostatina A e Inhibición de la Ruta del Erizo Sónico sobre la Expresión de Genes en Células Estromales Derivadas de Páncreas de Pases Tempranos (P5) y en Células Derivadas de Líquido Amniótico.

De acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 1** se obtuvieron células estromales derivadas de páncreas. Las células se sembraron en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos a una densidad de 5000/cm^2/pocillo y se cultivaron en DMEM con FBS al 10% en condiciones de cultivo celular convencionales hasta alcanzar la confluencia. El líquido amniótico obtenido del National Disease Research Interchange (NDRI) se procesó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 2**. Las células se sembraron en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos a una densidad de 5000/cm^2/pocillo y se cultivaron en AMNIOMAX (Invitrogen) en condiciones de cultivo celular convencionales hasta alcanzar la confluencia. Después de que las células alcanzasen la confluencia, los pocillos con la muestra se trataron con tricostatina A 1,25 mM diluida en DMSO y medio; los pocillos de control recibieron DMSO a una concentración equivalente. A las 24 horas, los pocillos con la muestra recibieron otra dosis de tricostatina A 1,25 μM. Al medio de cultivo celular se añadió una dosis de Ciclopamina (Sigma) 10 μM y Nicotinamida (Sigma) 10mM.Al día siguiente, el medio se retiró y las células se lavaron con PBS. Se añadió nuevo medio una vez cada dos días incluyendo dosis similares de Nicotinamida y Ciclopamina. El día 7, las células se recogieron para análisis por PCR en tiempo real como se describe en el **Ejemplo 3.**

Ejemplo 21

El Efecto de Tricostatina A sobre la Expresión de Genes en Células Mononucleares de Sangre Periférica.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica por sedimentación en gradiente de densidad y se sembraron en placas de cultivo a una densidad de 0,5-2 x 10^6 por ml. Se añadió un mitógeno de activación, tal como por ejemplo PHA, a una concentración final de 10 μg/ml. Los controles excluían la adición de PHA. Las células se cultivaron durante 3 días después de lo cual se recogieron, se lavaron, se contaron se resuspendieron y se volvieron a sembrar en placa a una densidad de 1-2 x 10^6 por ml. Al cultivo se añadió tricostatina A (o un inhibidor de histona desacetilasa alternativo) y/o 5-azacitidina (o un agente desmetilante alternativo) a una concentración óptima, no tóxica y durante un periodo de tiempo preferido para inducir expresión de genes apropiada, como se determina en los **Ejemplos 5-15** anteriores. Los pocillos de control no tratados recibieron una dilución similar de vehículo o diluyente. Al final del periodo del tiempo de cultivo (por ejemplo, 24 horas), el medio se retiró y las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). A cada pocillo se añadió tampón de lisis RLT que contenía β-mercaptoetanol (Qiagen). Las muestras se homogenizaron usando columnas Qiasheredder (Qiagen) y el ARN se purificó usando el Kit RNeasy Mini (Qiagen). Se determinó la cantidad y cualidad de ARN usando un espectrofotómetro y se preparó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad). Se usaron muestras de ADNc 20 ng en cada reacción para determinar los niveles de expresión de PDX-1, insulina, glucagón, somatostatina, sox17, gata4, globina, beta-2-microgobulina. Se realizó PCR en tiempo real sobre un sistema Applied Biosystems 7500 y los datos se analizaron usando el programa informático adjunto.

Ejemplo 22

Diferenciación de células en tipos de células no pancreáticas.

Se sembraron en placas células progenitoras de líquido amniótico o pancreáticas o fibroblastos neonatales y se dejó alcanzar la confluencia (2-3 días). Como alternativa, se aislaron células mononucleares de sangre periférica por sedimentación en gradiente de densidad y se sembraron en placas de cultivo a una densidad de 1-2 x 10^6 por ml. Al cultivo se añadió tricostatina A (o in inhibidor de histona desacetilasa alternativo) y/o 5-azacitidina (o un agente desmetilante alternativo) a una concentración óptima, no tóxica y durante un periodo de tiempo preferido para inducir expresión de genes apropiada, como se determina en los **Ejemplos 5-15** anteriores. Al final de periodo de tiempo (por ejemplo, 24 horas), se retiró el medio, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) se resuspendieron y se sembraron en placa a una densidad de siembra como se ha indicado anteriormente. A las células cultivadas se aplicó un protocolo de diferenciación para adipocitos, conocido por los expertos en la materia (Chemicon nº de cat. ECM950), durante un periodo de tiempo de 7 días o el que fuera apropiado. Después de finalizar el cultivo, las células se tiñeron con Oil Red O para detectar gotitas lipídicas en adipocitos diferenciados. Como alternativa, a cada pocillo se añadió tampón de lisis RLT que contenía β-mercaptoetanol (Qiagen). Las muestras se homogenizaron usando columnas Qiasheredder (Qiagen) y se purificó el ARN usando el Kit RNeasy Mini (Qiagen). La cantidad y calidad de ARN se determinó usando un espectrofotómetro y se preparó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad). Se usaron muestras de ADNc 20 ng en cada reacción para determinar los niveles de expresión de PPARγ. Se realizó PCR en tiempo real sobre un sistema Applied Biosystems 7500 y los datos se analizaron usando el programa informático adjunto.

TABLA I-A. ANTICUERPOS CONTRA RECEPTORES DE SUPERFICIE

Anticuerpo	Proveedor	Isotipo	Clon
Fosfatasa alcalina	R&D systems (MN)	IgG1 de ratón	B4-78
Transportador del casete de unión a ATP (ABCG2)	BD Pharmingen (CA)	IgG2b de ratón, Kappa	5D3
CD10	BD Pharmingen (CA)	IgG1 de ratón, Kappa	HI10a
CD29 (integrina beta I)	BD Pharmingen (CA)	IgG1 de ratón, Kappa	MAR4
CD44	BD Pharmingen (CA)	IgG2b de ratón, Kappa	G44-26
CD45	BD Pharmingen (CA)	IgG1 de ratón, Kappa	Hi30
CD49f	BD Pharmingen (CA)	IgG2A de rata, Kappa	G0H3
CD49b (integrina alfa 2)	BD Pharmingen (CA)	RatónIgG2a, Kappa	121-H6
CD56 (NCAM)	BD Pharmingen (CA)	IgG1 de ratón, Kappa	B 159
CD73	BD Pharmingen (CA)	IgG1 de ratón, Kappa	AD2
CD90	BD Pharmingen (CA)	IgG1 de ratón, kappa	5E10
CD95	BD Pharmingen (CA)	IgG1 de ratón, Kappa	DX2
CD105 (endoglina)	Santa Cruz Biotechnology (CA)	IgG1 de ratón	P3D1
CD117 (c-Kit)	BD Pharmingen (CA)	IgG1 de ratón, kappa	YB5,B8
CD133	Miltenyi Biotec (CA)	IgG1 de ratón	Ac133
Molécula de adhesión epitelial (EpCAM)	BD Pharmingen (CA)	IgG1 de ratón	EBA-1
Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF o c-Met)	R&D systems (MN)	IgG2A de ratón	95309
Molécula-1 de adhesión celular de plaquetas/endotelial (PECAM-1)	Santa Cruz Biotechnology (CA)	IgG1 de ratón	WM-59
CD49b (integrina alfa 2)	BD Pharmingen (CA)	IgG2a de ratón, Kappa	121-H6
Integrina alfa 3	Santa Cruz (CA)	IgG1 de ratón	P1B5
Integrina alfa 5	Santa Cruz (CA)	IgG3 de ratón	P1D6
Integrina beta 3	Santa Cruz (CA)	IgG1 de ratón	Y2/51
Integrina beta 3 alfa V (CD51/61)	BD Pharmingen (CA)	IgG1 de ratón, Kappa	23C6
SSEA-3	Chemicon (CA)	IgG3 de ratón	MC-631
SSEA-4	Chemicon (CA)	IgM de rata	MC-813-70
TRA 1-60	Chemicon (CA)	IgM de ratón	TRA 1-60
TRA 1-81	Chemicon (CA)	IgM de ratón	TRA 1-81
TRA 1-85	Chemicon (CA)	IgG1 de ratón	TRA 1-85
TRA 2-54	Chemicon (CA)	IgG1 de ratón	TRA 2-54
EGF r	BD Pharmingen (CA)	IgG2b de ratón, Kappa	EGFR1
HLA ABC	BD Pharmingen (CA)	IgG1 de ratón, Kappa	G46-2,6
HLA DR	BD Pharmingen (CA)	IgG2b de ratón, Kappa	TU36

TABLA I-B. LISTADO DE ANTICUERPOS USADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES INTRACELULARES

Anticuerpo	Proveedor	Isotipo	Clon
Nestina	R&D systems (MN)	IgG1 de ratón	HSG02
Citoqueratina 5/8	Santa Cruz Biotechnology (CA)	IgG1 de ratón	C50
Vimentina	Santa Cruz Biotechnology (CA)	IgG1 de ratón	V9
Pan-Citoqueratina (4, 5, 6, 8, 10, 13, 18)	Santa Cruz Biotechnology (CA)	Ratón IgG 1	C11
Periferina	Santa Cruz Biotechnology (CA)	Policlonal de cabra	C 19
Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	Santa Cruz Biotechnology (CA)	Policlonal de cabra	N-18
Pan-Citoqueratina (14, 15, 16, and 19)	BD Pharmingen (CA)	IgG1 de ratón, Kappa	KA4
Tubulina beta III	Chemicon International (CA)	IgG1 de ratón	TU-20

TABLA II. LISTADO DE ANTICUERPOS SECUNDARIOS CONJUGADOS USADOS PARA ANÁLISIS FACS E INMUNOTINCIÓN

Anticuerpo secundario conjugado	Proveedor	Dilución
anti IgG de ratón de cabra conjugado con APC	Jackson ImmunoResearch (PA)	1:200
anti IgG de ratón de cabra conjugado con PE	Jackson ImmunoResearch (PA)	1:200
Anticuerpo secundario conjugado	Proveedor	Dilución
Anti-conejo de burro conjugado con PE o APC	Jackson ImmunoResearch (PA)	1:200
Anti-cabra de burro conjugado con PE o APC	Jackson ImmunoResearch (PA)	1:200
IgM anti-ratón de cabra con PE	SouthernBiotech (AL)	1:200
IgM anti-rata de cabra con PE	SouthernBiotech (AL)	1:200
IgG3 anti-ratón de cabra con PE	SouthernBiotech (AL)	1:200

TABLA III. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE HISTONA DESACETILASA EN LA EXPRESIÓN DE GENES CON CÉLULAS PANC-1 Y FIBROBLASTOS NEONATALES

	GAPDH	glucagón	HNF-3beta	Insulina	pdx-1	Sox17
fibroblastos no tratados	+++	nd	nd	nd	nd	nd
fibroblastos con tricostatina A 2,5 mM después de 48 horas	+++	+++	+++	nd	+	+++
Fibroblastos con tricostatina A 5,0 mM después de 48 horas	+++	+++	+++	nd	+	+++
Panc-1 no tratadas	+++	nd	+++	nd	+++	+++
Panc-1 con tricostatina A 2,5 mM después de 48 horas	+++	+++	+++	+	+++	+++
panc-1 con tricostatina A 5,0 mM después de 48 horas	+++	+++	+++	+	+++	+++
Páncreas humano	+++	+++	+++	++	+++	+++
		nd	no detectable a > de 40 ciclos por RT-PCR			
		+	detectable a más de 35-40 ciclos por RT-PCR			
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET (error típico) mayor de 0,9			
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9			
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real						

TABLA IV-A. EXPRESIÓN DE GENES EN LA LÍNEA CELULAR AFCA009-A DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO NO TRATADA

	Sin tratamiento				
Tiempo (horas)	glucagón	HNF-3beta	Insulina	pdx-1	Sox17
0	nd	nd	+	nd	+++
0,5	nd	+	+	nd	+++
1,5	nd	nd	+	nd	+++
3	nd	nd	+++	nd	+++
6	nd	+	+++	nd	+++
12	nd	nd	+++	nd	+++
24	nd	nd	+++	nd	+++
nd	no detectable a > de 40 ciclos por RT-PCR				
+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR				
++	detectable a menos 35 ciclos por RT-PCR con un error típico mayor de 0,9				
+++	detectable a menos 35 ciclos por RT-PCR con un error típico menor de 0,9				
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real					

TABLA IV-B. EXPRESIÓN DE GENES EN LA LÍNEA CELULAR AFCA009-A DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO TRATADA CON TRICOSTATINA A DURANTE 24 HORAS,

	Con tratamiento				
Tiempo (horas)	glucagón	HNF-3beta	Insulina	pdx-1	Sox17
0,5	nd	+	+	nd	+++
1,5	nd	+	+	nd	+++
3	nd	+++	+	nd	+++
6	nd	+++	nd	+	+++
12	+	+++	+	+++	+++
24	+++	+++	+	+++	+++
nd	no detectable a >de 40 ciclos por RT-PCR				
+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR				
++	detectable a menos 35 ciclos por RT-PCR con un error típico mayor de 0,9				
+++	detectable a menos 35 ciclos por RT-PCR con un error típico menor de 0,9				
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real					

TABLA V-A. EXPRESIÓN DE GENES EN CÉLULAS ESTROMALES DERIVADAS DE PÁNCREAS DE PASES TARDÍOS

	Sin tratamiento				
Tiempo (horas)	glucagón	HNF-3beta	Insulina	pdx-1	Sox17
0	nd	nd	nd	nd	+
0,5	nd	nd	nd	nd	nd
1,5	nd	nd	nd	nd	nd
3	nd	nd	nd	nd	+
6	nd	nd	nd	nd	+
12	nd	nd	nd	nd	nd
24	nd	nd	nd	nd	+
nd	no detectable a > de 40 ciclos por RT-PCR				
+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR				
++	detectable a menos 35 ciclos por RT-PCR con un error típico mayor de 0,9				
+++	detectable a menos 35 ciclos por RT-PCR con un error típico menor de 0,9				
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real					

TABLA V-B. EXPRESIÓN DE GENES EN CÉLULAS ESTROMALES DERIVADAS DE PÁNCREAS DE PASES TARDÍOS TRATADAS CON TRICOSTATINA A DURANTE 24 HORAS,

	Con tratamiento				
Tiempo (horas)	glucagón	HNF-3beta	Insulina	pdx-1	Sox17
0,5	nd	nd	nd	nd	+
1,5	nd	nd	nd	nd	nd
3	nd	nd	nd	nd	+
6	nd	+	nd	nd	+
12	nd	+	nd	+	+
24	+	+++	nd	+++	+++
nd	no detectable a >de 40 ciclos por RT-PCR				
+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR				
++	detectable a menos 35 ciclos por RT-PCR con un error típico mayor de 0,9				
+++	detectable a menos 35 ciclos por RT-PCR con un error típico menor de 0,9				
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real					

TABLA VI. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON TRISCOSTATINA A SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN CÉLULAS DERIVADAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

24 horas	glucagón	HNF-3beta	Insulina	pdx-1	Soxl7	
Sin tratamiento	nd	nd	+	nd	+++	
500 nM	+	+++	nd	+++	+++	
1 μM	+++	+++	nd	+++	+++	
48 horas	glucagón	HNF-3b	Insulina	PDX-1	Sox17	
Sin tratamiento	nd	+	+++	nd	+++	
500 nM	+	+++	nd	+	+++	
1 μM	++	+++	nd	+++	+++	
72 horas	glucagón	HNF-3b	Insulina	PDX-1	Sox17	
Sin tratamiento	nd	+	+++	nd	+++	
500 nM	+	+++	nd	+++	+++	
1 μM	+++	+++	nd	+++	+++	
nd	no detectable a > de 40 ciclos por RT-PCR					
+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR					
++	detectable a menos 35 ciclos por RT-PCR con un error típico mayor de 0,9					
+++	detectable a menos 35 ciclos por RT-PCR con un error típico menor de 0,9					
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real						

TABLA VII. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON TRICOSTATINA A SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN CÉLULAS ESTROMALES DERIVADAS DE PÁNCREAS DE PASES TARDÍOS

24 horas	glucagón	HNF-3beta	Insulina	pdx-1	Sox17
Sin tratamiento	nd	nd	nd	nd	nd
1,25 μM	+	+++	nd	+	+++
2,5 μM	nd	+	nd	+++	+++
48 horas	glucagón	HNF-3b	Insulina	PDX-1	Sox17
Sin tratamiento	nd	nd	nd	nd	+
1,25 μM	+	++	nd	+++	+++
2,5 μM	+	+	nd	+++	+++
72 horas	glucagón	HNF-3b	Insulina	PDX-1	Soxl7
Sin tratamiento	nd	nd	nd	nd	+
1,25 μM	+	+++	nd	+++	+++
2,5 μM	nd	+++	nd	+	+++
nd	no detectable a >de 40 ciclos por RT-PCR				
+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR				
++	detectable a menos 35 ciclos por RT-PCR con un error típico mayor de 0,9				
+++	detectable a menos 35 ciclos por RT-PCR con un error típico menor de 0,9				
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real					

TABLA VIII-A. EFECTO DE UN TRATAMIENTO CRÓNICO CON UNA SOLA DOSIS DE TRICOSTATINA A SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

muestra	Gata 1	HNF	insulina	Pdx-1	sox17
Sin tratamiento	nd	nd	+	+	+++
24 h	nd	+++	nd	+	+++
48 h	nd	+++	nd	nd	+++
72 h	nd	+	+	nd	+++
96 h	nd	nd	+	nd	+++
120 h	nd	+	+	nd	+++
144 h	nd	nd	+	nd	+++
		nd	no detectable a >de 40 ciclos por RT-PCR		
		+	detectable entre 35 ciclos y 40 ciclos por RT-PCR		
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9		
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9		
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real					

TABLA VIII-B. EFECTO DE UN TRATAMIENTO CRÓNICO CON UNA SOLA DOSIS DE TRICOSTATINA A SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA SEGUNDA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO.

muestra	Gata1	HNF	insulina	Pdx-1	sox17
Sin tratamiento	nd	nd	+++	nd	+++
24 h	nd	+++	nd	+	+++
48 h	nd	+++	nd	nd	+++
72 h	nd	+	+	nd	+++
96 h	nd	+	++	nd	+++
120 h	nd	+	++	nd	+++
144 h	nd	+	++	nd	+++
		nd	no detectable a >de 40 ciclos por RT-PCR		
		+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR		
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9		
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9		
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real					

TABLA VIII-C. EFECTO DE UN TRATAMIENTO CRÓNICO CON UNA SOLA DOSIS DE TRICOSTATINA A SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR ESTROMAL DERIVADA DE PÁNCREAS DE PASES TEMPRANOS (P5)

muestra	glucagón	HNF	Insulina	Pdx-1
Sin tratamiento	nd	nd	nd	+
24 h	+++	+++	nd	+++
48 h	+	nd	nd	nd
72 h	+	nd	nd	nd
96 h	+++	nd	nd	nd
120 h	nd	nd	nd	nd
144 h	nd	nd	nd	nd
		nd	no detectable a > de40 ciclos por RT-PCR	
		+	detectable entre 35 y 40 ciclos por RT-PCR	
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9	
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9	
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real				

TABLA VIII-D. EFECTO DE UN TRATAMIENTO CRÓNICO CON UNA SOLA DOSIS DE TRICOSTATINA A SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR ESTROMAL DERIVADA DE PÁNCREAS DE PASES TARDÍOS (P14)

muestra	glucagón	HNF	Insulina	Pdx-1
Sin tratamiento	nd	nd	nd	nd
24 h	+++	+	nd	+++
48 h	+	nd	nd	nd
72 h	nd	nd	nd	nd
96 h	nd	nd	nd	nd
120 h	nd	nd	nd	nd
144 h	nd	nd	nd	nd
		nd	no detectable a > de 40 ciclos por RT-PCR	
		+	detectable entre 35 y40 ciclos por RT-PCR	
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9	
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9	
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real				

TABLA IX-A. EFECTO DE DOS DOSIS DE TRICOSTATINA A 500 NM SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

muestra	Gata 1	HNF	insulina	Pdx-1	sox17
Sin tratamiento	nd	nd	+	+	+++
24 h	nd	+++	nd	+	+++
48 h	nd	+++	+	nd	+++
72 h	nd	+	+	nd	+++
96 h	nd	nd	+	nd	+++
120 h	nd	+	+	nd	+++
144 h	nd	+	+	nd	+++
		nd	no detectable a > de 40 ciclos por RT-PCR		
		+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR		
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9		
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9		
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real					

TABLA IX-B. EFECTO DE DOS DOSIS DE TRICOSTATINA A 500 NM SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA SEGUNDA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

muestra	Gata 1	HNF	insulina	Pdx-1	sox17
Sin tratamiento	nd	nd	+++	nd	+++
24 h	nd	+++	nd	+	+++
48 h	nd	+++	nd	nd	+++
72 h	nd	+++	+++	nd	+++
96 h	nd	+	+++	nd	+++
120 h	nd	+	+	nd	+++
144 h	nd	+	+++	nd	+++
		nd	no detectable a >de 40 ciclos por RT-PCR		
		+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR		
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9		
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9		
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real					

TABLA IX-C. EFECTO DE DOS DOSIS DE TRICOSTATINA A 1,25 μM SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR ESTROMAL DERIVADA DE PÁNCREAS DE PASES TEMPRANOS (P5)

muestra	glucagón	HNF	Insulina	Pdx-1
Sin tratamiento	nd	nd	nd	+
24 h	+++	+++	nd	+++
48 h	+	nd	nd	nd
72 h	nd	nd	nd	nd
96 h	nd	nd	nd	nd
120 h	+	+++	nd	+++
144 h	+	nd	nd	nd
		nd	no detectable a >40 ciclos por RT-PCR	
		+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR	
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9	
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9	
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real				

TABLA IX-D. EFECTO DE DOS DOSIS DE TRICOSTATINA A 1,25 μM SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR ESTROMAL DERIVADA DE PÁNCREAS DE PASES TARDÍOS (P14)

muestra	glucagón	HNF	Insulina	Pdx-1
Sin tratamiento	nd	nd	nd	nd
24 h	+++	+	nd	+++
48 h	+++	nd	+-	nd
72 h	+	nd	nd	nd
96 h	nd	nd	nd	nd
120 h	=	+++	nd	++
144 h	+	nd	nd	nd
		nd	no detectable a >40 ciclos por RT-PCR	
		+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR	
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9	
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9	
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real				

TABLA X-A. EFECTO DE DOS DOSIS DE TRICOSTATINA A 1,25 μM SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

muestra	Gatal	HNF-3 beta	insulina	Pdx-1	sox17
Sin tratamiento	nd	nd	+	+	+++
24 h	+	+++	nd	+++	+++
48 h	nd	+++	nd	nd	+++
72 h	nd	+	+	nd	+++
96 h	nd	+	+	nd	+++
120 h	nd	+++	nd	+++	+++
144 h	nd	+++	nd	nd	+++
		nd	no detectable a >40 ciclos por RT-PCR		
		+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR		
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9		
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9		
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real					

TABLA X-B. EFECTO DE DOS DOSIS DE TRICOSTATINA A 1,25 μM SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA SEGUNDA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

muestra	Gata1	HNF-3 beta	insulina	Pdx-1	sox17
Sin tratamiento	nd	nd	+++	nd	+++
24 h	+	+++	nd	+++	+++
48 h	nd	+++	nd	nd	+++
72 h	nd	+++	+	nd	+++
96 h	nd	+	+	nd	+++
120 h	+	+++	nd	+++	+++
144 h	nd	+++	nd	nd	+++
		nd	no detectable a >40 ciclos por RT-PCR		
		+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR		
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9		
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9		
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real					

TABLA X-C. EFECTO DE DOS DOSIS DE TRICOSTATINA A 5 μM SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR ESTROMAL DERIVADA DE PÁNCREAS DE PASES TEMPRANOS (P5)

muestra	glucagón	HNF-3 beta	Insulina	Pdx-1
Sin tratamiento	nd	nd	nd	+
24 h	+++	+++	nd	++
48 h	+	nd	nd	nd
72 h	+	nd	nd	nd
96 h	nd	nd	nd	nd
120 h	nd	+	nd	+++
144 h	+	nd	nd	nd
		nd	no detectable a >40 ciclos por RT-PCR	
		+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR	
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9	
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9	
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real				

TABLA X-D. EFECTO DE DOS DOSIS DE TRICOSTATINA A 5 μM SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR ESTROMAL DERIVADA DE PÁNCREAS DE PASES TARDÍOS (P11)

muestra	glucagón	HNF-3 beta	Insulina	Pdx-1
Sin tratamiento	nd	nd	nd	nd
24 h	+++	+++	nd	+
48 h	+	nd	+	nd
72 h	+	nd	nd	nd
96 h	+	nd	nd	nd
120 h	+	+	nd	+++
144 h	+	nd	nd	nd
		nd	no detectable	
		-	detectable a mayor de 35 ciclos	
		+	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9	
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9	
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real				

TABLA XI-A EFECTO DE DOS DOSIS DE TRICOSTATINA A 1,25 μM SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

muestra	Gatal	HNF-3 beta	insulina	Pdx-1	sox17
Sin tratamiento	nd	nd	+	+	+++
24 h	+	+++	nd	+++	+++
48 h	nd	+++	nd	+++	+++
72 h	nd	+	nd	nd	+++
96 h	nd	nd	nd	nd	+++
120 h	nd	+	nd	+	+++
		nd	no detectable a >40 ciclos por RT-PCR		
		+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR		
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9		
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9		
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real					

TABLA XI-B EFECTO DE DOS DOSIS DE TRICOSTATINA A 1,25 μM SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO,

muestra	Gata1	HNF-3 beta	insulina	Pdx-1	sox17
Sin tratamiento	nd	nd	+++	nd	+++
24 h	+	+++	nd	++	+++
48 h	nd	+++	nd	+	+++
72 h	nd	+++	nd	nd	+++
96 h	nd	+	nd	nd	+++
120 h	+	+++	nd	+++	+++
		nd	no detectable a >40 ciclos por RT-PCR		
		+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR		
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9		
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9		
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real					

TABLA XI-C. EFECTO DE DOS DOSIS DE TRICOSTATINA A 5 μM SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR ESTROMAL DERIVADA DE PÁNCREAS DE PASES TEMPRANOS (P5)

muestra	glucagón	HNF-3 beta	Insulina	Pdx-1
Sin tratamiento	nd	nd	nd	+
24 h	+++	+++	nd	+++
48 h	+++	+++	nd	+++
72 h	+	nd	+++	nd
96 h	+	nd	nd	nd
120 h	+	+++	nd	+++
		nd	no detectable a >40 ciclos por RT-PCR	
		+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR	
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9	
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9	
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real				

TABLA XI-D. EFECTO DE DOS DOSIS DE TRICOSTATINA A 5 μM SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR ESTROMAL DERIVADA DE PÁNCREAS DE PASES TARDÍOS (P11)

muestra	glucagón	HNF-3 beta	Insulina	Pdx-1
Sin tratamiento	nd	nd	nd	Nd
24 h	+++	+++	nd	+
48 h	+++	+++	nd	+++
72 h	+	nd	nd	Nd
96 h	nd	nd	nd	Nd
120 h	+	+++	+	+++
		nd	no detectable a >40 ciclos por RT-PCR	
		+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR	
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9	
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9	
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real				

TABLA XII-A EFECTO DE UN TRATAMIENTO DE 6 HORAS CON TRICOSTATINA A 1,25 μM SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO,

muestra	Gatal	HNF-3 beta	insulina	Pdx-1	sox17
Sin tratamiento	nd	nd	+	+	+++
6 h	nd	+++	nd	+	+++
24 h	nd	+++	nd	nd	+++
		nd	no detectable a >40 ciclos por RT-PCR		
		+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR		
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9		
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9		
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real					

TABLA XII-B. EFECTO DE UN TRATAMIENTO DE 6 HORAS CON TRICOSTATINA A 1,25 μM SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA SEGUNDA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

muestra	Gatal	HNF-3 beta	insulina	Pdx-1	sox17
Sin tratamiento	nd	nd	+++	nd	+++
6 h	nd	+++	nd	+++	+++
24 h	nd	+	nd	nd	+++
		nd	no detectable a >40 ciclos por RT-PCR		
		+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR		
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9		
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9		
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real					

TABLA XII-C. EFECTO DE UN TRATAMIENTO DE 6 HORAS CON TRICOSTATINA A 5 μM SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR ESTROMAL DERIVADA DE PÁNCREAS DE PASES TEMPRANOS (P5)

muestra	glucagón	HNF-3 beta	Insulina	Pdx-1
Sin tratamiento	nd	nd	Nd	+
6 h	+	+++	Nd	+
24 h	+	nd	+++	nd
		nd	no detectable a >40 ciclos por RT-PCR	
		+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR	
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9	
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9	
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real				

TABLA XII-D. EFECTO DE UN TRATAMIENTO DE 6 HORAS CON TRICOSTATINA A 5 μM SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR ESTROMAL DERIVADA DE PÁNCREAS DE PASES TARDÍOS (P11)

muestra	glucagón	HNF-3 beta	Insulina	Pdx-1
Sin tratamiento	nd	nd	Nd	nd
6 h	+	+	Nd	+
24 h	+	nd	Nd	nd
		nd	no detectable a >40 ciclos por RT-PCR	
		+	detectable entre 35-40 ciclos por RT-PCR	
		++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET mayor de 0,9	
		+++	detectable a menos de 35 ciclos por RT-PCR con un ET menor de 0,9	
Todas las RT-PCR se realizaron sobre el Sistema Applied Biosystems 7500 para PCR en tiempo real				

TABLA XIII-A. EFECTO DE UN TRATAMIENTO DE 24 HORAS CON INHIBIDOR DE HDAC 5 μm SOBRE LA EPXRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN (Cantidades Notificables)
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
26996723	24,260	23,821	23,707	23,929	0,169	34,809	35,903	35,334	35,349	0,316	0,4
18042557	23,212	23,018	22,979	23,070	0,072	sin det.	Sin det.	Sin det.			
26979355	23,319	23,349	23,400	23,356	0,023	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
18042583	23,638	22,907	22,955	23,167	0,236	Sin det.	Sin det.		Sin det.		
27019850	23,187	23,108	23,388	23,228	0,083	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27054313	23,844	23,374	23,754	23,657	0,144	Sin det.	37,615	Sin det.	37,615		0,1
27129986	22,500	22,395	22,720	22,539	0,096	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28635932	23,066	23,193	22,783	23,014	0,121	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27140191	22,741	22,310	23,831	22,961	0,452	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28543944	23,396	23,309	24,072	23,592	0,241	33,558	33,199	34,116	33,624	0,267	1,0
37271637	22,937	22,716	23,892	23,182	0,361	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28596555	24,069	23,590	24,194	23,951	0,184	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
37271559	23,616	22,356	23,402	23,125	0,389	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26972088	23,138	22,635	23,270	23,014	0,194	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
37271650	23,544	22,678	23,153	23,125	0,251	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26977808	23,451	22,408	23,290	23,050	0,324	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26142415	23,215	23,242	23,298	23,251	0,024	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	23,521	23,394	22,812	23,242	0,218	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27422863	23,729	23,950	23,895	23,858	0,066	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
TSA	23,783	23,132	23,772	23,562	0,215	33,408	33,067	34,151	33,542	0,320	1,0
27652677	23,799	23,698	24,276	23,924	0,178	33,890	33,157	34,960	34,002	0,524	0,9
28507193	23,845	23,847	23,292	23,661	0,185	34,271	35,198	34,328	34,599	0,300	0,5
37653265	23,047	23,007	23,298	23,118	0,091	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28571699	23,474	23,664	23,202	23,447	0,134	33,700	34,438	33,901	34,013	0,220	0,7
37791156	24,088	23,389	24,155	23,877	0,245	34,803	33,520	34,063	34,129	0,372	0,8
28584842	23,796	23,644	23,524	23,655	0,079	38,374	38,530	Sin det.	38,452	0,078	0,0
37791104	23,669	23,319	23,563	23,517	0,104	34,057	34,571	34,617	34,415	0,180	0,5
28649465	24,300	23,501	23,729	23,844	0,238	37,693	36,510	37,504	37,236	0,367	0,1
27027026	23,856	24,250	23,063	23,723	0,349	34,025	34,238	33,121	33,795	0,342	0,9
29232073	23,800	23,643	23,260	23,568	0,160	33,011	32,785	33,056	32,951	0,084	1,5
27059331	23,980	23,479	23,577	23,679	0,153	34,639	35,004	35,340	34,994	0,202	0,4

ES 2 369 240 T3

(continuación)

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
32404580	23,398	23,067	23,213	23,226	0,096	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27628250	24,575	24,101	23,936	24,204	0,192	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27051895	23,535	Sin det.	23,851	23,693	0,158	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27075945	25,120	24,170	24,520	24,604	0,277	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27070160	23,647	Sin det.	23,682	23,665	0,018	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27083537	23,952	23,591	23,511	23,685	0,136	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27263366	23,251	Sin det.	23,128	23,189	0,061	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27132391	24,200	23,126	22,964	23,430	0,388	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28571530	22,535	Sin det.	23,435	22,985	0,450	33,766	33,452	34,341	33,853	0,260	0,6
27554553	23,624	22,718	24,634	23,659	0,553	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28596503	22,792	Sin det.	24,440	23,616	0,824	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26900289	23,948	23,001	23,988	23,645	0,322	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28600650	22,837	Sin det.	23,425	23,131	0,294	34,063	34,555	35,507	34,708	0,424	0,3
26994461	23,777	23,129	23,634	23,514	0,197	34,337	34,593	35,308	34,746	0,291	0,4
37791065	23,222	Sin det.	23,680	23,451	0,229	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28549118	23,725	23,522	23,683	23,643	0,062	33,354	34,022	33,765	33,714	0,194	1,0
28427139	23,377	Sin det.	23,768	23,572	0,195	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
33300943	26,317	25,666	25,677	25,887	0,215	35,984	34,695	36,702	35,794	0,587	1,1
Sin tratamiento	25,963	24,642	24,596	25,067	0,448	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
33297888	25,322	24,894	25,139	25,118	0,124	34,115	34,145	35,206	34,489	0,359	1,6
TSA	25,224	24,046	25,952	25,074	0,555	34,884	33,285	37,095	35,088	1,104	1,0
27617655	24,911	24,921	24,659	24,830	0,086	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
37653330	25,412	24,899	25,249	25,186	0,151	34,251	34,336	37,049	35,212	0,919	1,0
28427113	23,593	25,653	24,239	24,495	0,608	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
37804806	25,101	24,947	24,651	24,899	0,132	34,074	34,378	33,528	33,993	0,249	1,9
29784001	25,297	23,826	25,277	24,800	0,487	34,381	33,130	35,162	34,224	0,592	1,5
37786138	25,704	24,545	25,075	25,108	0,335	36,068	35,269	35,080	35,473	0,303	0,8
33300839	24,859	24,349	25,424	24,878	0,311	34,667	34,031	34,291	34,330	0,184	1,5
38117820	25,256	25,088	25,574	25,306	0,142	37,712	38,096	Sin det.	37,904		0,2
26960167	25,043	24,157	26,281	25,160	0,616	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
38117859	25,102	24,401	24,947	24,816	0,213	34,452	33,525	34,524	34,167	0,322	1,6
27263158	25,050	25,327	26,236	25,538	0,358	Sin det.	Sin det.	Sin det.			

(continuación)

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
38134395	26,227	24,421	24,750	25,133	0,555	35,286	34,709	34,664	34,886	0,200	1,2
27018576	25,059	26,422	26,338	25,939	0,441	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26988312	Sin det.	25,334	25,043	25,188	0,145	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27019590	24,966	25,597	25,371	25,311	0,184	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27121120	Sin det.	25,838	24,550	25,194	0,644	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
37398855	25,106	25,585	25,667	25,453	0,175	34,258	35,682	36,410	35,450	0,632	1,1
27527305	Sin det.	24,701	24,457	24,579	0,122	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
37398920	24,880	24,721	25,962	25,187	0,390	34,095	34,318	38,141	35,518	1,313	0,9
28540954	Sin det.	24,599	25,218	24,909	0,309	Sin det.	34,346	35,022	34,684	0,338	1,3
37398803	24,882	24,801	25,211	24,965	0,125	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
38153895	Sin det.	24,610	25,201	24,906	0,296	Sin det.	34,806	33,621	34,213	0,592	1,7
26989664	24,773	25,105	24,903	24,927	0,096	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
38153882	Sin det.	26,274	25,062	25,668	0,606	Sin det.	37,247	38,152	37,700	0,452	0,3
26981149	24,448	24,504	24,713	24,555	0,081	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
38151243	Sin det.	24,350	24,916	24,633	0,283	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26980174	24,031	24,519	24,410	24,320	0,148	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27151813	Sin det.	24,158	24,158	24,158	0,000	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28557425	25,178	26,164	25,943	25,762	0,299	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	25,006	25,206	24,299	24,837	0,275	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28427165	25,814	25,849	25,246	25,636	0,196	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
TSA	24,505	24,926	25,230	24,887	0,210	34,728	35,053	35,205	34,995	0,141	1,0
31046587	25,779	26,267	25,659	25,901	0,186	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27147133	24,411	24,561	24,534	24,502	0,046	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
29776266	24,154	24,116	24,860	24,376	0,242	35,133	35,538	36,006	35,559	0,252	0,5
28296463	24,977	24,747	24,891	24,872	0,067	34,283	34,543	34,843	34,556	0,162	1,3
31051462	24,556	26,036	25,128	25,240	0,431	34,094	35,728	35,226	35,016	0,483	1,3
37804793	24,852	24,631	25,010	24,831	0,110	36,305	35,229	37,367	36,300	0,617	0,4
31046626	25,476	25,949	25,315	25,580	0,190	34,367	36,453	34,852	35,224	0,630	1,4
37786151	24,284	24,435	24,630	24,450	0,100	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26913757	24,957	25,645	25,250	25,284	0,199	34,973	37,589	36,757	36,440	0,772	0,5
26949403	24,466	24,798	25,277	24,847	0,235	34,294	34,565	35,856	34,905	0,482	1,0
26949481	25,813	24,921	25,412	25,382	0,258	Sin det.	36,352	37,228	36,790	0,438	0,4

(continuación)

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
26949312	24,320	24,803	24,744	24,622	0,152	35,021	34,216	34,846	34,694	0,245	1,0
38134330	24,475	24,365	24,648	24,496	0,082	34,122	34,272	34,485	34,293	0,105	1,0
27054729	24,948	23,766	24,321	24,345	0,341	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26949273	24,375	24,987	24,188	24,517	0,241	Sin det.	Sin det.	38,272	38,272	13,756	0,1
27032057	24,798	23,366	23,645	23,936	0,438	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26949338	23,566	24,222	24,548	24,112	0,289	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27137032	23,410	23,417	23,655	23,494	0,080	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26949442	22,969	23,638	23,092	23,233	0,206	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27136863	23,630	23,623	23,350	23,534	0,092	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26949455	23,411	23,404	23,496	23,437	0,029	38,003	Sin det.	Sin det.	38,003	14,566	0,0
27136889	23,470	23,073	23,395	23,313	0,122	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26949416	23,911	24,119	24,837	24,289	0,280	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27136993	22,996	23,892	23,618	23,502	0,265	39,778	Sin det.	Sin det.			
26949390	24,275	24,257	24,422	24,318	0,052	Sin det.	38,129	Sin det.	38,129	13,811	0,1
27131546	23,753	23,765	23,305	23,608	0,151	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28571504	23,541	23,601	24,039	23,727	0,157	33,308	33,000	33,285	33,198	0,099	1,2
38222964	24,179	24,730	23,718	24,209	0,292	36,820	37,173	35,371	36,454	0,551	0,2
26909636	25,050	24,647	25,047	24,915	0,134	Sin det.	37,496	Sin det.	37,496	12,581	0,1
Sin tratamiento	24,256	24,568	23,648	24,157	0,270	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27142674	24,391	24,247	24,322	24,320	0,042	33,969	33,143	34,450	33,854	0,382	1,2
TSA	23,984	24,219	24,240	24,148	0,082	34,305	33,750	33,714	33,923	0,191	1,0
27142401	24,025	23,977	24,376	24,126	0,126	33,905	33,759	33,382	33,682	0,156	1,2
26951249	24,389	24,749	24,816	24,651	0,133	Sin det.	38,406	Sin det.	38,406	13,755	0,1
26910897	23,739	23,279	23,606	23,541	0,137	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28584777	23,515	24,366	23,736	23,872	0,255	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27122225	23,209	23,726	24,422	23,786	0,351	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27147081	23,214	24,310	23,750	23,758	0,317	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
29232541	24,254	24,722	23,970	24,315	0,219	35,196	36,290	35,380	35,622	0,338	0,3
27142323	23,457	24,960	23,902	24,106	0,446	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
29381378	24,546	24,326	23,773	24,215	0,230	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27621126	23,510	24,315	23,849	23,892	0,233	34,405	36,442	35,120	35,322	0,597	0,3
35807343	24,368	24,136	24,203	24,236	0,069	Sin det.	Sin det.	Sin det.			

(continuación)

ID muestra						PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
28577068	24,063	24,943	23,943	24,316	0,315	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27580670	23,352	23,782	23,059	23,398	0,210	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27018225	23,053	22,978	23,054	23,028	0,025	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
36278853	22,947	23,720	23,930	23,532	0,299	34,557	35,220	35,618	35,132	0,310	0,3
27018199	23,661	23,099	23,405	23,388	0,162	36,020	Sin det.	35,971	35,995	0,024	0,2
27274468	22,037	23,412	23,484	22,978	0,471	33,015	34,377	34,210	33,868	0,429	0,6
27017159	22,920	23,738	23,472	23,377	0,241	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27267279	22,643	22,592	22,679	22,638	0,025	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27017198	23,103	23,130	22,990	23,074	0,043	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27266343	23,106	23,736	23,830	23,558	0,227	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27019291	24,182	24,023	23,403	23,869	0,238	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27385098	23,383	23,388	23,347	23,372	0,013	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28313220	22,945	23,484	23,016	23,148	0,169	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26633763	22,814	23,950	23,333	23,366	0,328	34,310	34,330	34,681	34,440	0,120	0,5
27059357	23,035	23,341	23,262	23,213	0,092	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27018212	23,303	23,834	23,869	23,669	0,183	35,327	36,291	36,004	35,874	0,286	0,2
29380936	24,078	23,260	23,143	23,494	0,294	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26933374	22,736	23,306	22,857	22,967	0,173	38,795	37,135	Sin det.	37,965	0,830	0,0
Sin tratamiento	22,489	23,195	22,871	22,852	0,204	37,202	Sin det.	Sin det.	37,202		0,1
26933296	23,747	23,482	23,207	23,479	0,156	38,026	36,423	38,190	37,546	0,564	0,1
TSA	23,044	23,134	22,950	23,043	0,053	33,199	32,871	33,190	33,087	0,108	1,0
26984152	24,221	23,739	23,754	23,905	0,158	36,175	35,407	Sin det.	35,791	0,384	0,3
28658149	23,203	23,604	23,657	23,488	0,143	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27418183	23,324	24,440	23,318	23,694	0,373	36,060	Sin det.	35,063	35,561	0,499	0,3
27136811	23,266	23,336	23,615	23,406	0,106	37,985	Sin det.	Sin det.	37,985		0,0
27557478	23,593	23,572	23,836	23,667	0,085	34,039	35,024	33,497	34,187	0,447	0,7
38171757	23,458	23,471	23,592	23,507	0,042	33,467	33,686	33,451	33,535	0,076	1,0
27587807	23,431	24,064	23,991	23,829	0,200	33,198	34,015	34,464	33,892	0,371	1,0
38176073	23,276	23,870	24,020	23,722	0,227	34,055	34,403	34,346	34,268	0,107	0,7
37851398	23,690	23,464	23,981	23,712	0,150	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27136668	23,367	23,216	23,431	23,338	0,064	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27447654	23,027	23,724	23,329	23,360	0,202	Sin det.	Sin det.	Sin det.			

(continuación)

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
26956163	25,497	25,072	24,804	25,124	0,201	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28309411	24,832	24,120	25,468	24,807	0,389	37,671	Sin det.	Sin det.	37,671		0,3
27570972	25,572	37,680	25,164	29,472	4,106	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28576860	25,598	26,164	24,807	25,523	0,393	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28313272	24,416	35,980	25,458	28,618	3,693	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28571868	24,355	24,539	25,931	24,941	0,498	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28315326	23,921	35,649	24,443	28,004	3,825	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28587208	23,747	24,105	24,690	24,181	0,275	Sin det.	39,157	Sin det.	39,157		0,1
28314000	24,075	24,004	24,521	24,200	0,162	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28536118	24,526	24,904	25,315	24,915	0,228	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26949299	23,771	24,068	24,483	24,107	0,206	38,670	Sin det.	Sin det.	38,670		0,1
28536157	24,000	23,824	24,423	24,082	0,178	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27669330	24,327	24,087	24,542	24,319	0,131	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27347892	24,539	24,615	23,645	24,266	0,311	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28536092	23,794	24,954	25,249	24,666	0,444	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27520155	24,100	23,580	24,579	24,087	0,288	35,568	34,329	36,791	35,563	0,711	0,7
27522482	24,761	24,913	25,147	24,940	0,112	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	25,264	24,183	24,749	24,732	0,312	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27522703	25,332	25,431	24,898	25,220	0,164	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
TSA	25,183	24,692	25,296	25,057	0,185	35,293	36,354	36,306	35,984	0,346	1,0
27522378	25,032	24,780	24,553	24,788	0,138	38,019	36,490	37,004	37,171	0,449	0,4
27527383	25,080	24,931	25,157	25,056	0,066	Sin det.	Sin det.	38,764	38,764		0,1
27522716	24,724	24,145	24,981	24,616	0,247	Sin det.	38,139	Sin det.	38,139		0,2
28557555	25,237	24,088	24,799	24,708	0,335	Sin det.	39,126	38,095	38,611	0,515	0,1
27522612	25,272	23,862	25,055	24,729	0,438	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
29232515	25,033	24,774	24,774	24,860	0,086	37,030	35,977	35,802	36,270	0,383	0,7
26909584	24,014	24,215	25,134	24,454	0,345	35,777	37,044	37,375	36,732	0,487	0,4
28978209	25,070	24,805	25,000	24,958	0,079	36,014	36,358	36,036	36,136	0,111	0,8
28427152	25,599	25,110	24,974	25,228	0,190	36,227	37,351	36,245	36,608	0,372	0,7
28297919	24,506	23,866	24,850	24,407	0,288	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28831777	25,136	25,295	25,699	25,377	0,168	37,044	36,832	38,013	37,297	0,363	0,5
26980395	24,611	24,138	25,222	24,657	0,314	39,393	38,003	Sin det.	38,698		0,1

(continuaciòn)

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
27625156	25,349	25,726	25,303	25,459	0,134	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	25,801	25,810	24,698	25,436	0,369	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27639573	23,900	25,355	24,942	24,732	0,433	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
TSA	25,220	25,127	25,504	25,284	0,113	34,288	33,753	33,952	33,997	0,156	1,0
28641171	24,440	24,748	25,337	24,842	0,263	33,387	33,788	34,383	33,852	0,289	0,8
28629822	24,933	25,202	25,199	25,112	0,089	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
32681584	23,907	24,326	24,567	24,267	0,193	33,154	34,016	33,469	33,546	0,252	0,7
35772893	24,988	25,125	25,294	25,136	0,089	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
33300852	25,032	25,190	24,345	24,855	0,259	34,273	34,816	33,615	34,235	0,347	0,6
38134356	25,588	25,085	24,635	25,102	0,275	34,633	33,744	33,952	34,110	0,269	0,8
27643148	24,420	25,258	25,184	24,954	0,268	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27632709	24,923	24,174	24,470	24,522	0,218	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27643330	25,370	25,206	24,466	25,014	0,278	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27632891	24,657	24,099	25,055	24,603	0,277	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28439970	24,294	25,096	24,570	24,653	0,235	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28309346	25,621	25,246	25,551	25,473	0,115	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26913679	23,366	24,257	24,610	24,078	0,370	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27447589	24,177	24,302	23,512	23,997	0,245	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26951691	23,534	24,481	24,633	24,216	0,344	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27291030	23,754	24,116	23,847	23,905	0,108	33,526	34,257	34,041	33,941	0,217	0,4
27142687	24,349	24,083	24,865	24,432	0,230	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27136720	23,685	24,244	23,653	23,860	0,192	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27667250	22,955	23,025	23,809	23,263	0,274	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27136798	23,505	23,978	23,863	23,782	0,142	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28309294	24,163	23,419	23,525	23,702	0,232	Sin det.	39,313	Sin det.	39,313		0,0
27571024	24,241	24,288	24,038	24,189	0,077	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27122160	23,067	23,603	23,803	23,491	0,220	39,409	Sin det.	Sin det.	39,409		0,0
28576808	23,808	23,752	23,531	23,697	0,084	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28407028	23,820	23,592	24,291	23,901	0,206	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27528566	23,499	23,324	23,521	23,448	0,062	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
35278321	24,524	24,128	24,400	24,351	0,117	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27632982	24,483	24,300	25,170	24,651	0,265	34,941	35,332	35,065	35,113	0,115	0,3

(continuación)

ID muestra	GAPDH					PDX1					
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	CN
37125335	25,400	25,753	25,171	25,441	0,169	36,379	37,855	36,226	36,820	0,519	0,7
28606643	25,577	25,336	25,026	25,313	0,159	36,854	Sin det.	37,622	37,238	0,384	0,5
26975390	24,244	24,642	24,569	24,485	0,122	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27039857	24,096	25,170	24,919	24,728	0,324	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27136772	23,531	24,142	24,691	24,121	0,335	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28315300	25,210	24,255	24,285	24,583	0,313	37,049	35,189	35,295	35,844	0,603	0,8
27580501	22,909	24,055	23,447	23,470	0,331	36,408	37,492	38,392	37,431	0,574	0,1
28338089	24,651	23,823	24,375	24,283	0,243	36,158	34,465	35,045	35,223	0,497	1,0
27580566	24,085	23,855	25,288	24,409	0,444	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28345213	24,095	24,166	25,308	24,523	0,393	36,572	38,152	39,734	38,153	0,913	0,2
26906997	23,873	24,037	25,062	24,324	0,372	36,113	36,913	36,674	36,567	0,237	0,4
28376686	23,841	24,449	24,781	24,357	0,275	34,588	37,510	37,156	36,418	0,921	0,5
27017406	24,003	24,700	24,430	24,377	0,203	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28407275	25,100	24,919	25,010	25,010	0,052	38,940	38,991	38,011	38,648	0,319	0,2
27025583	24,295	24,049	24,476	24,273	0,124	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28427087	25,151	24,365	24,577	24,698	0,235	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28518919	25,348	26,388	25,303	25,680	0,354	37,862	37,800	37,565	37,742	0,090	0,5
Sin tratamiento	25,642	25,490	24,786	25,306	0,264	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27122147	25,551	25,801	25,514	25,622	0,090	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
TSA	25,742	24,269	25,113	25,041	0,427	36,363	35,589	35,919	35,957	0,224	1,0
28616289	24,986	25,793	25,125	25,301	0,249	Sin det.	Sin det.	39,841	39,841		0,1
27191021	24,613	24,822	24,770	24,735	0,063	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28296424	24,516	24,286	24,612	24,471	0,097	38,876	Sin det.	Sin det.	38,876		0,1
31040217	25,833	25,010	24,614	25,152	0,359	36,613	36,255	35,410	36,093	0,357	1,0
31035940	24,718	25,087	24,753	24,853	0,118	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26960674	25,234	24,897	25,346	25,159	0,135	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31040776	25,467	25,545	25,078	25,363	0,144	38,215	Sin det.	38,619	38,417	0,202	0,2
27639677	24,960	24,639	24,662	24,754	0,103	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31040763	24,456	25,210	25,013	24,893	0,226	34,445	37,223	36,715	36,128	0,854	0,8
26930943	25,188	25,187	24,711	25,029	0,159	Sin det.	39,275	Sin det.	39,275		0,1
31040074	24,736	24,986	25,398	25,040	0,193	35,196	35,623	35,911	35,577	0,208	1,3
27589328	25,622	25,004	24,638	25,088	0,287	Sin det.	Sin det.	Sin det.			

(continuación)

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
27136980	24,727	24,850	24,967	24,848	0,069	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	24,474	25,112	23,651	24,412	0,423	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27136967	24,620	25,024	24,796	24,813	0,117	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
TSA	25,524	24,816	24,525	24,955	0,297	34,079	34,137	34,838	34,351	0,244	1,0
27136941	24,103	24,558	24,049	24,237	0,162	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27552421	24,033	24,462	23,705	24,066	0,219	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27136915	23,741	24,085	24,156	23,994	0,128	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28549144	23,835	24,102	23,953	23,964	0,077	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27137045	24,891	24,158	24,374	24,474	0,218	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31002439	24,376	24,549	24,140	24,355	0,118	34,143	34,913	33,826	34,294	0,323	0,7
27136759	25,201	24,229	24,374	24,602	0,303	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28338102	25,329	25,197	24,361	24,962	0,303	34,412	35,402	34,838	34,884	0,287	0,7
27263379	24,560	24,145	24,388	24,364	0,120	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28427100	24,269	24,822	24,783	24,625	0,178	34,893	34,936	36,372	35,400	0,486	0,4
27263392	24,642	24,421	24,629	24,564	0,071	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28549079	24,907	24,903	25,208	25,006	0,101	34,961	35,212	36,292	35,488	0,409	0,5
37827634	25,598	24,690	25,369	25,219	0,273	Sin det.	39,182	Sin det.	39,182		0,0
26996710	25,215	25,482	25,429	25,375	0,082	35,942	35,427	35,921	35,763	0,168	0,5
37844664	24,908	25,119	25,158	25,062	0,078	Sin det.	39,783	39,602	39,693	0,091	0,0
26996736	25,125	25,864	25,606	25,532	0,217	38,536	37,573	38,540	38,216	0,322	0,1
26996645	24,567	25,174	25,949	25,230	0,400	34,780	35,082	37,356	35,739	0,813	0,5
26996749	24,563	24,917	25,081	24,854	0,153	37,187	36,188	38,134	37,170	0,562	0,1
26996866	24,168	24,633	25,345	24,716	0,342	36,779	37,676	37,350	37,268	0,262	0,1
28651012	24,177	25,858	25,082	25,039	0,486	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26996892	24,733	25,659	25,230	25,207	0,268	Sin det.	38,929	Sin det.	38,929		0,1
28663973	25,447	24,777	25,495	25,240	0,232	36,413	35,620	37,239	36,424	0,468	0,3
26996905	24,717	24,767	26,120	25,201	0,460	37,053	38,627	Sin det.	37,840		0,1
28324036	24,445	25,078	24,774	24,765	0,183	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26996671	25,088	24,652	25,361	25,034	0,206	34,953	34,577	35,472	35,001	0,259	0,7
31046600	25,059	25,378	25,243	25,227	0,092	35,053	34,542	35,433	35,009	0,258	0,8
26996918	24,998	24,642	25,391	25,010	0,216	36,120	39,263	37,122	37,501	0,927	0,1
26977847	25,343	25,159	25,020	25,174	0,093	36,414	35,872	36,448	36,245	0,187	0,3

(continuación)

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
27632917	25,292	25,074	24,977	25,114	0,093	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	24,567	24,317	24,320	24,401	0,083	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
36721698	24,869	24,496	25,066	24,810	0,167	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
TSA	25,242	24,688	24,362	24,764	0,257	34,017	33,986	34,600	34,201	0,200	1,0
26909688	24,749	24,470	24,655	24,624	0,082	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27190124	24,170	24,162	24,112	24,148	0,018	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27628198	23,994	23,750	23,435	23,726	0,162	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27213719	23,657	24,136	24,006	23,933	0,143	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27625182	25,294	24,715	24,419	24,809	0,257	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27633073	24,361	24,411	24,020	24,264	0,123	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27632670	24,416	23,905	24,541	24,287	0,194	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26909727	23,951	24,121	23,907	23,993	0,065	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27625260	25,338	24,521	25,385	25,081	0,280	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26909753	24,241	24,759	24,811	24,604	0,182	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
33297914	24,778	24,863	25,238	24,960	0,141	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26909766	24,152	24,337	24,474	24,321	0,093	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31069415	26,046	25,168	25,487	25,567	0,257	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28518568	25,205	25,745	24,773	25,241	0,281	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
37804546	25,980	25,100	25,904	25,661	0,282	Sin det.	37,203	37,663	37,433	0,230	0,2
31064072	24,451	25,196	24,636	24,761	0,224	38,184	Sin det.	Sin det.	38,184		0,1
27477788	24,889	25,131	25,142	25,054	0,083	34,645	33,999	35,341	34,662	0,387	0,9
28309385	24,313	23,666	23,861	23,947	0,192	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28557464	24,010	24,051	24,259	24,107	0,077	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28309320	23,977	24,768	24,233	24,326	0,233	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31053828	25,368	24,710	25,074	25,050	0,190	35,482	34,909	35,035	35,142	0,174	0,6
28309242	24,936	24,196	25,256	24,796	0,314	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31056792	25,531	24,944	25,251	25,242	0,170	34,006	34,183	35,584	34,591	0,499	1,1
27635556	23,806	24,328	24,648	24,261	0,246	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28531516	24,913	25,111	24,518	24,847	0,174	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26963105	24,191	25,137	24,288	24,539	0,300	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28309255	24,481	24,642	24,879	24,667	0,116	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26986076	24,344	25,435	25,115	24,965	0,324	Sin det.	Sin det.	Sin det.			

(continuación)

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
35772568	25,492	24,814	25,236	25,181	0,198	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
33155811	Sin det.	25,223	24,620	24,922	0,301	Sin det.	34,716	34,473	34,594	0,122	1,2
28404844	25,613	25,084	24,326	25,007	0,373	33,790	34,994	33,859	34,214	0,390	1,6
27016223	24,120	24,419	24,296	24,278	0,087	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27137006	24,342	24,182	23,564	24,029	0,237	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27022307	23,655	23,699	23,532	23,629	0,050	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28507271	23,898	24,106	23,715	23,906	0,113	34,305	34,073	33,170	33,849	0,346	1,0
27534455	23,609	24,152	23,101	23,621	0,303	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27136733	23,810	24,356	24,478	24,214	0,205	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27422889	23,609	23,523	24,619	23,917	0,352	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27136850	23,687	24,632	24,870	24,396	0,361	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28532946	24,465	24,924	25,496	24,962	0,298	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27136824	23,913	24,738	23,786	24,146	0,299	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27482286	24,941	25,019	24,783	24,914	0,069	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27136785	23,789	24,405	24,810	24,335	0,297	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27513252	23,440	25,004	24,486	24,310	0,460	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27519635	24,468	24,346	24,049	24,288	0,124	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27016236	24,552	24,527	24,409	24,496	0,044	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	23,644	24,704	23,909	24,085	0,319	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27570933	25,399	25,309	25,590	25,433	0,083	Sin det.	39,987	Sin det.	39,987		0,1
TSA	23,550	24,827	25,394	24,590	0,545	33,973	35,214	36,156	35,115	0,632	1,0
38113595	25,447	25,194	25,985	25,542	0,233	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28547103	23,600	24,933	24,122	24,218	0,388	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
38107862	24,508	24,397	25,429	24,778	0,327	35,763	34,588	35,360	35,237	0,345	1,0
27572441	24,503	24,497	24,826	24,609	0,108	37,178	36,165	Sin det.	36,671		0,3
37125426	24,243	26,276	25,208	25,242	0,587	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27587781	23,711	24,806	24,422	24,313	0,321	34,627	35,384	35,423	35,145	0,259	0,8
37827803	24,882	26,378	25,923	25,728	0,443	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27580449	24,246	24,694	24,624	24,522	0,139	39,133	39,534	Sin det.	39,334		0,1
27151787	24,130	24,315	24,967	24,471	0,254	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27643356	23,498	23,871	24,253	23,874	0,218	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27151696	24,762	26,717	26,051	25,843	0,574	Sin det.	Sin det.	Sin det.			

(continuación)

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
28577055	24,660	25,028	25,290	24,993	0,183	36,317	38,005	38,243	37,522	0,606	0,2
27039935	25,747	25,241	25,546	25,511	0,147	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
5526079	24,378	24,744	24,253	24,458	0,147	38,468	Sin det.	Sin det.	38,468		0,1
27054586	25,661	24,876	26,091	25,543	0,356	Sin det.	35,540	36,810	36,175	0,635	0,9
28663986	25,660	25,063	24,651	25,125	0,293	35,763	36,539	37,168	36,490	0,406	0,6
27643317	24,596	24,477	25,159	24,744	0,210	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27122173	25,897	24,232	24,055	24,728	0,587	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26962962	24,519	25,148	25,253	24,973	0,229	35,172	36,500	35,870	35,847	0,384	0,8
28846740	24,635	24,978	24,362	24,658	0,178	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27054547	24,505	25,174	25,158	24,946	0,220	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28846870	25,841	25,207	24,813	25,287	0,299	38,785	Sin det.	38,368	38,577	0,208	0,1
27075750	25,220	26,054	24,696	25,324	0,395	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28847052	25,234	25,158	25,346	25,246	0,054	37,174	39,129	37,205	37,836	0,647	0,2
26981201	25,062	26,784	25,954	25,933	0,497	34,594	39,419	37,627	37,213	1,408	0,6
26996684	25,765	25,868	25,291	25,641	0,178	36,277	38,770	Sin det.	37,523		0,4
26163605	24,085	26,517	24,262	24,955	0,783	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26996840	24,788	24,936	24,829	24,851	0,044	37,526	38,023	Sin det.	37,774		0,2
28625207	26,500	26,148	25,262	25,970	0,368	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26996762	26,116	25,977	25,417	25,837	0,214	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26962923	25,212	24,611	24,295	24,706	0,269	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28543983	24,136	24,752	25,596	24,828	0,423	34,584	35,008	36,088	35,227	0,448	0,6
27117259	23,577	24,012	24,643	24,078	0,309	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26996775	24,312	24,521	25,027	24,620	0,212	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27062698	24,055	23,029	24,546	23,877	0,447	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28540863	24,266	24,013	24,682	24,320	0,195	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27558414	25,079	24,977	25,312	25,123	0,099	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28625207	26,500	26,148	25,262	25,970	0,368	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26996762	26,116	25,977	25,417	25,837	0,214	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26962923	25,212	24,611	24,295	24,706	0,269	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28543996	24,371	24,567	25,262	24,733	0,270	35,957	35,930	38,742	36,876	0,933	0,2
27620710	25,632	25,183	24,982	25,265	0,192	36,320	35,495	37,583	36,466	0,607	0,3
31013086	23,843	24,466	24,015	24,108	0,186	Sin det.	Sin det.	Sin det.			

(continuación)

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
27639287	26,097	25,083	24,981	25,387	0,356	37,354	35,099	36,341	36,265	0,652	0,4
27570946	25,740	25,036	24,087	24,954	0,479	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31012904	26,105	25,203	26,042	25,783	0,291	Sin det.	36,764	39,046	37,905	1,141	0,2
27580657	25,303	25,266	24,355	24,975	0,310	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26996853	25,404	26,458	26,147	26,003	0,313	37,940	Sin det.	36,666	37,303	0,637	0,3
Sin tratamiento	25,027	25,201	24,805	25,011	0,115	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27014377	25,373	26,058	25,358	25,596	0,231	36,538	Sin det.	Sin det.	36,538		0,4
TSA	25,625	24,740	25,526	25,297	0,280	34,243	34,713	35,604	34,853	0,399	1,0
27422746	24,376	25,133	24,956	24,822	0,229	Sin det.	Sin det.	38,571	38,571		0,1
27580592	24,154	24,132	24,715	24,333	0,191	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27572428	23,983	23,999	23,941	23,974	0,017	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
30999683	23,961	23,904	24,853	24,239	0,307	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31005871	25,092	25,266	24,433	24,930	0,253	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
30997824	24,736	25,301	25,304	25,114	0,189	38,106	Sin det.	Sin det.	38,106		0,1
26909714	25,747	25,089	24,654	25,163	0,318	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
30997915	24,016	23,826	25,500	24,447	0,529	35,120	34,484	38,055	35,886	1,100	0,3
26933283	24,967	25,399	25,611	25,326	0,189	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
38222951	24,001	24,253	24,267	24,174	0,086	34,263	35,078	35,148	34,829	0,284	0,5
31053854	24,259	24,657	25,685	24,867	0,425	34,290	34,889	34,671	34,617	0,175	0,9
31068778	24,068	23,556	25,024	24,216	0,430	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28315365	24,320	24,653	24,780	24,584	0,137	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	23,910	23,797	24,101	23,936	0,089	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28313207	24,002	23,687	24,403	24,031	0,207	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
TSA	23,623	23,860	24,215	23,899	0,172	33,638	33,531	34,048	33,739	0,158	1,0
28323906	23,687	24,909	24,801	24,466	0,391	34,367	35,284	35,552	35,068	0,359	0,6
31069428	23,493	24,477	24,423	24,131	0,319	34,340	35,238	34,369	34,649	0,294	0,6
33300969	23,168	23,676	23,517	23,454	0,150	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27387373	23,898	24,070	24,399	24,122	0,147	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
38163957	25,357	26,004	25,081	25,481	0,273	35,864	36,126	35,613	35,868	0,148	0,7
31064020	24,732	24,652	24,144	24,509	0,184	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
38168078	27,754	27,511	27,049	27,438	0,207	39,974	36,909	Sin det.	38,442		0,4
26988858	25,779	26,112	24,955	25,615	0,344	Sin det.	Sin det.	Sin det.			

(continuación)

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
28631590	27,344	26,515	26,052	26,637	0,378	35,928	35,746	35,839	35,838	0,053	1,6
26988884	26,272	26,550	26,196	26,339	0,107	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28848469	27,748	27,488	26,734	27,323	0,304	38,450	37,563	36,819	37,610	0,471	0,7
28323945	27,625	27,522	26,844	27,330	0,245	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27117480	25,467	Sin det.	25,406	25,436	0,030	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28502240	23,784	Sin det.	24,697	24,241	0,457	34,980	Sin det.	34,441	34,710	0,269	0,6
27217333	24,447	25,299	25,554	25,100	0,335	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
38107849	24,724	23,958	24,695	24,459	0,251	36,717	34,464	35,626	35,602	0,650	0,4
27217541	24,459	24,017	25,843	24,773	0,550	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
38107992	26,261	25,144	23,985	25,130	0,657	35,134	34,835	34,154	34,707	0,290	1,2
26986453	24,457	24,750	24,861	24,689	0,120	34,993	35,054	34,562	34,870	0,155	0,8
28540902	24,714	23,666	24,235	24,205	0,303	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27132352	25,096	24,767	25,817	25,227	0,310	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28600871	25,439	25,562	25,282	25,427	0,081	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28532933	26,627	26,705	27,149	26,827	0,163	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27599728	25,695	26,209	25,925	25,943	0,149	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
37852763	30,123	29,119	29,119	29,119	0,000	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31064111	28,294	27,951	26,350	27,532	0,599	Sin det.	Sin det.	39,010	39,010		0,3
28502435	28,975	28,291	26,821	28,029	0,635	Sin det.	39,597	38,139	38,868	0,729	0,5
27635465	26,206	26,620	26,167	26,331	0,145	38,682	Sin det.	38,220	38,451	0,231	0,2
27589315	25,450	24,672	24,901	25,008	0,231	Sin det.	Sin det.	36,379	36,379		0,2
Sin tratamiento	24,029	24,992	23,594	24,205	0,413	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28323984	24,654	26,129	25,638	25,474	0,434	34,091	36,059	35,084	35,078	0,568	0,7
TSA	24,014	24,850	24,240	24,368	0,250	33,284	33,710	33,332	33,442	0,135	1,0
28414061	23,654	24,116	24,593	24,121	0,271	35,522	33,277	33,701	34,167	0,689	0,5
38163983	24,587	24,897	24,382	24,622	0,150	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28482285	23,943	23,882	24,218	24,014	0,104	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
38163970	24,030	24,092	24,096	24,073	0,021	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27147406	24,134	24,401	25,040	24,525	0,269	35,747	36,206	36,608	36,187	0,249	0,2
30999670	24,431	24,134	23,965	24,177	0,136	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27521052	24,472	24,650	25,097	24,740	0,186	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27075607	24,055	24,648	23,970	24,224	0,213	Sin det.	Sin det.	Sin det.			

(continuación)

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
27521533	24,063	23,796	24,721	24,193	0,275	33,516	33,076	33,208	33,267	0,130	1,0
27274260	24,185	23,504	23,583	23,757	0,215	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27580709	24,897	24,378	25,523	24,933	0,331	35,794	33,983	39,014	36,264	1,471	0,2
27267292	23,461	23,517	24,181	23,720	0,231	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28324010	25,433	25,572	25,040	25,348	0,159	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27142765	25,437	24,838	24,863	25,046	0,196	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28606656	25,074	24,740	24,497	24,770	0,167	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27143272	24,408	23,986	24,879	24,424	0,258	35,276	33,385	37,026	35,229	1,051	0,3
27482559	23,841	24,003	23,997	23,947	0,053	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27143246	25,112	24,525	24,891	24,843	0,171	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27557374	23,926	23,923	24,054	23,968	0,043	Sin det.	Sin det.	37,020	37,020		0,1
28635919	24,710	24,515	24,508	24,578	0,066	33,726	33,326	33,992	33,681	0,193	1,0
28439905	24,137	24,009	24,235	24,127	0,065	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
36722621	23,753	24,563	24,280	24,199	0,237	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26142428	24,903	24,792	24,548	24,748	0,105	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26933387	25,084	24,556	24,950	24,863	0,159	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27131169	24,427	25,309	24,194	24,643	0,339	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
38168052	24,136	24,915	25,218	24,756	0,322	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27143441	25,343	25,314	24,262	25,329	0,014	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28553720	24,815	24,094	24,503	24,471	0,209	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28658071	25,281	25,598	24,812	25,230	0,228	37,497	37,936	Sin det.	37,716		0,1
Sin tratamiento	24,387	24,309	24,265	24,320	0,036	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27244529	24,884	25,074	24,298	24,752	0,233	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
TSA	24,628	24,966	24,373	24,656	0,172	33,969	34,009	33,683	33,887	0,103	1,0
28571751	25,372	24,185	24,093	24,550	0,412	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26909662	25,180	24,673	24,269	24,707	0,264	Sin det.	36,055	35,932	35,993	0,061	0,2
28407340	25,068	25,649	25,037	25,251	0,199	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26909675	26,118	24,533	24,626	25,092	0,513	37,641	34,960	33,868	35,489	1,121	0,4
28407054	23,938	24,905	25,185	24,676	0,378	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27576770	24,828	25,195	24,257	24,760	0,273	Sin det.	Sin det.	38,592	38,592		0,0
26949429	25,408	25,469	25,470	25,449	0,020	Sin det.	Sin det.	38,613	38,613		0,1
37853842	24,449	24,559	24,622	24,543	0,050	35,513	35,069	35,341	35,308	0,129	0,3

(continuación)

ID muestra	GAPDH										CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
27120171	25,299	23,545	23,554	24,133	0,583	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27136902	24,747	23,931	23,997	24,225	0,262	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27632683	24,762	25,095	23,968	24,608	0,334	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27136681	25,169	24,614	24,131	24,638	0,300	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27265004	Sin det.	25,264	25,439	25,352	0,087	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26905008	24,664	25,278	25,048	24,997	0,179	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27418144	Sin det.	24,947	26,084	25,516	0,569	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27527552	24,880	25,556	23,546	24,661	0,590	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27413854	Sin det.	24,643	25,382	25,013	0,370	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27556971	25,449	24,362	24,318	24,710	0,370	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27418612	23,997	24,979	25,410	24,795	0,418	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27632722	24,629	23,710	24,122	24,154	0,266	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
34661913	25,498	24,633	25,360	25,164	0,268	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27392703	25,526	25,245	25,312	25,361	0,085	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
34661848	26,227	24,864	25,535	25,542	0,393	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28841982	25,344	26,234	25,035	25,538	0,359	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27478867	25,568	25,563	25,118	25,416	0,149	36,495	33,605	34,360	34,820	0,865	0,9
27392612	24,422	25,385	24,544	24,783	0,303	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27059409	25,222	25,057	25,501	25,260	0,129	34,569	33,627	36,027	34,741	0,698	0,8
27418404	23,728	24,229	24,549	24,169	0,239	Sin det.	Sin det.	Sin det.			

TABLA XIII-B. CONFIRMACIÓN DEL EFECTO DE UN TRATAMIENTO DE 24 HORAS CON INIHBIDOR DE HDAC 5 μM SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia1	copia2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
37398920	25,420	25,256	25,038	25,238	0,111	34,787	35,062	35,895	35,248	0,333	1,0
27142401	24,445	24,541	23,877	24,288	0,207	33,966	34,259	33,941	34,055	0,102	1,2
28540954	24,890	25,342	25,265	25,166	0,139	35,228	36,267	36,141	35,879	0,327	0,6
38171757	24,268	24,387	24,016	24,224	0,109	34,805	35,029	35,087	34,974	0,086	0,6
38153895	24,200	24,280	25,079	24,520	0,281	34,173	34,383	35,762	34,773	0,498	0,9
27587807	23,876	24,208	23,798	23,961	0,126	33,965	34,302	33,760	34,009	0,158	1,0
28641171	23,773	24,227	24,073	24,024	0,133	34,095	34,477	34,528	34,367	0,136	0,8
27418378	24,342	24,198	24,202	24,247	0,047	33,631	34,547	34,349	34,176	0,278	1,1
38134356	24,419	24,312	24,273	24,335	0,044	34,489	34,059	33,708	34,085	0,226	1,2
31017090	24,113	23,911	23,722	23,916	0,113	34,240	34,105	33,911	34,085	0,096	0,9
38134330	24,507	23,751	24,189	24,149	0,219	34,412	34,092	34,241	34,248	0,093	1,0
31034679	24,344	24,604	23,901	24,283	0,205	34,516	35,932	33,805	34,751	0,625	0,7
28571504	24,909	24,076	24,204	24,397	0,259	35,080	34,224	34,253	34,519	0,281	0,9
Sin tratamiento	23,912	24,202	22,841	23,652	0,414	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27142674	25,358	24,614	24,272	24,748	0,321	36,420	37,104	35,083	36,202	0,594	0,4
TSA	24,046	24,166	23,900	24,037	0,077	33,642	34,068	34,487	34,066	0,244	1,0
28543944	25,532	24,894	24,619	25,015	0,270	34,071	35,442	33,854	34,456	0,497	1,5
33297888	25,068	25,317	24,260	24,882	0,319	35,468	35,794	34,191	35,151	0,489	0,8
27652677	25,472	26,026	25,114	25,537	0,265	35,421	35,305	35,791	35,506	0,147	1,0
29784001	24,145	25,498	24,319	24,654	0,425	34,405	35,296	34,552	34,751	0,276	1,0
37791156	24,846	24,772	24,478	24,699	0,112	34,664	34,717	35,086	34,822	0,132	0,9
33300839	23,936	24,567	23,526	24,009	0,303	34,030	35,349	33,397	34,259	0,575	0,9
27027026	24,178	24,228	24,189	24,198	0,015	35,047	34,665	35,347	35,020	0,198	0,6
37653330	24,026	23,846	24,328	24,067	0,141	35,112	34,216	34,437	34,588	0,269	0,7
28296463	24,339	25,009	24,222	24,524	0,245	34,855	35,179	33,676	34,570	0,457	1,0
37804806	23,630	24,794	24,507	24,311	0,350	33,884	34,958	34,779	34,540	0,332	0,9
29232073	25,770	24,392	24,032	24,732	0,530	35,296	34,031	33,856	34,394	0,454	1,3
38117859	24,117	24,224	23,792	24,044	0,130	34,275	35,254	33,985	34,505	0,384	0,7
28549118	24,647	25,288	24,014	24,649	0,368	34,570	34,475	33,335	34,127	0,397	1,5
38134395	24,930	25,053	24,326	24,770	0,225	34,916	35,775	34,018	34,903	0,507	0,9

ES 2 369 240 T3

(continuación)

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia1	copia2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
33300943	24,701	24,984	24,613	24,766	0,112	35,194	34,126	34,677	34,666	0,308	1,1
37398855	24,503	24,532	24,188	24,408	0,110	34,466	35,210	34,656	34,777	0,223	0,8
27477788	25,097	24,453	24,659	24,736	0,190	36,412	37,169	36,231	36,604	0,287	0,5
28978209	24,641	24,285	25,099	24,675	0,236	35,163	35,268	35,246	35,225	0,032	1,2
31056792	24,766	24,163	24,492	24,474	0,174	34,953	35,210	35,550	35,238	0,173	1,1
28338089	23,759	23,832	24,232	23,941	0,147	34,426	34,325	34,700	34,484	0,112	1,2
28404844	24,027	24,018	24,158	24,067	0,045	34,651	34,934	34,500	34,695	0,127	1,2
31040763	23,801	23,296	24,169	23,755	0,253	35,347	34,971	35,942	35,420	0,283	0,6
28507271	23,848	24,535	24,390	24,258	0,209	35,328	36,253	34,710	35,430	0,449	0,8
31040074	23,907	23,793	24,333	24,011	0,164	34,423	34,814	34,717	34,651	0,118	1,2
33155811	24,514	25,189	24,240	24,648	0,282	35,983	36,844	35,316	36,048	0,442	0,7
31040217	24,483	24,161	24,379	24,341	0,095	34,058	34,871	34,429	34,453	0,235	1,7
27054586	24,200	24,213	24,435	24,282	0,076	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31053854	24,687	24,435	24,507	24,543	0,075	34,671	35,019	35,391	35,027	0,208	1,3
28107862	23,983	24,083	24,026	24,031	0,029	34,815	35,037	34,681	34,845	0,104	1,0
31056337	24,907	24,663	25,257	24,942	0,172	35,522	35,357	36,013	35,631	0,197	1,1
27587781	24,414	24,986	24,470	24,624	0,182	34,447	35,884	36,096	35,476	0,518	1,0
38107992	25,900	25,217	24,554	25,224	0,388	35,976	34,946	34,299	35,074	0,488	2,0
26949403	24,692	24,477	24,991	24,720	0,149	35,564	35,065	36,181	35,603	0,323	1,0
28631590	25,519	24,738	24,625	24,961	0,281	34,742	35,168	33,926	34,612	0,364	2,3
26949312	24,462	24,011	24,190	24,221	0,131	34,766	33,913	34,742	34,474	0,281	1,5
28635919	24,171	24,660	24,178	24,336	0,162	35,110	35,232	35,146	35,163	0,036	1,0
TSA	23,668	24,182	23,885	24,344	0,215	33,964	35,167	34,574	35,192	0,373	1,0
TSA	24,663	25,070	24,598	24,344	0,215	35,878	36,531	35,037	35,192	0,373	1,0
27521533	24,213	24,021	23,758	23,997	0,132	34,621	35,278	34,899	34,932	0,190	0,9
Sin tratamiento	23,283	23,648	23,254	23,486	0,108	Sin det.	Sin det.				
Sin tratamiento	23,196	23,043	23,402	23,486	0,108	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	Sin det.	24,249	23,703	23,486	0,108	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	Sin det.	23,587	23,500	23,486	0,108		Sin det.	Sin det.			
27478867	24,584	23,830	23,759	24,058	0,264	34,884	34,307	34,502	34,565	0,169	1,3
27059409	23,999	24,195	23,663	23,952	0,155	35,017	35,188	34,433	34,879	0,229	0,9
31051462	24,029	24,067	23,494	23,864	0,185	35,571	34,159	34,044	34,591	0,491	1,1

(continuación)

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia1	copia2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
31046626	24,487	24,610	24,356	24,484	0,073	35,723	35,028	34,713	35,155	0,298	1,1

TABLA XIII-C. EFECTOS DE UNA SERIE DE CONCENTRACIONES DEL INHIBIDOR DE HDAC SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE PÁNCREAS ADULTO

ID muestra -[µM]	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
38107992 - 10	25,854	26,295	25,885	26,012	0,142	34,811	35,401	35,570	35,261	0,230	29,7
38107992 - 5	26,793	26,371	25,049	26,071	0,525	35,651	35,655	35,354	35,553	0,100	25,3
38107992 - 2,5	25,028	24,963	25,887	25,293	0,298	34,518	34,498	35,615	34,877	0,369	23,6
38107992 - 1,25	24,753	24,509	24,937	24,733	0,124	35,203	34,412	35,291	34,969	0,279	15,0
38107992 0,625	26,371	24,940	24,678	25,330	0,526	35,141	34,417	34,300	34,620	0,263	28,9
38107992 - 0,3	26,148	26,441	26,342	26,311	0,086	35,099	36,077	37,448	36,208	0,681	19,0
38107992 -0,15	25,871	26,539	26,269	26,227	0,194	36,197	38,658	37,448	37,434	0,710	
TSA - 10	26,572	27,068	26,209	26,616	0,249	35,124	35,572	36,134	35,610	0,292	35,5
TSA - 5	25,742	26,506	25,545	25,931	0,293	35,266	35,363	35,224	35,284	0,041	27,7
TSA - 2,5	26,200	25,952	25,560	25,904	0,186	35,384	34,902	35,579	35,288	0,201	27,1
TSA -1,25	25,632	25,667	25,592	25,630	0,022	36,420	34,667	36,585	35,890	0,613	14,8
TSA - 0,625	26,069	26,049	26,170	26,096	0,037	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
TSA - 0,3	25,510	25,856	25,253	25,539	0,175	39,154	Sin det.	Sin det.	39,154		1,4
TSA - 0,15	26,035	26,138	25,728	25,967	0,123	Sin det.	Sin det.	Sin det.		7,650	
0	26,049	26,028	25,849	25,618	0,205	Sin det.	38,657	Sin det.	38,657		1,0
0	25,784	25,167	24,829	25,618	0,205	Sin det.	Sin det.	Sin det.	38,657		1,0
0	24,407	24,186	24,294	24,099	0,104	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
0	24,016	23,998	23,691	24,099	0,104	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
0	24,124	23,928	23,801	23,939	0,061	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
0	24,116	23,866	23,798	23,939	0,061	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
0	24,242	24,373	Sin det.	23,772		37,590	39,153	Sin det.	38,417	0,489	1,0
0	23,378	23,623	23,243	23,772	0,228	39,369	Sin det.	37,556	38,417	0,489	1,0
0	24,586	25,147	24,440	24,422	0,278	38,967	Sin det.	Sin det.	38,967		1,0
0	23,601	23,640	25,115	24,422	0,278	Sin det.	Sin det.	Sin det.	38,967		1,0
31040217 - 10	25,132	24,790	25,542	25,155	0,217	36,209	36,919	37,671	36,933	0,422	5,2

ES 2 369 240 T3

(continuación)

ID muestra -[µM]	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
31040217 - 5	24,547	24,930	24,847	24,775	0,117	35,345	36,324	36,883	36,184	0,449	6,7
31040217 - 2,5	23,785	24,335	25,267	24,462	0,433	35,688	35,971	36,523	36,061	0,245	5,8
31040217 - 1,25	23,522	23,924	24,384	23,944	0,249	35,989	36,590	35,831	36,137	0,231	3,9
31040217 - 0,625	24,268	24,709	24,875	24,618	0,181	35,589	37,628	36,186	36,468	0,605	4,9
31040217 – 0,3	24,443	24,789	24,625	24,619	0,100	37,833	Sin det.	39,120	38,476	0,644	1,2
31040217 - 0,15	25,150	25,011	25,313	25,158	0,087	Sin det.	38,691	38,734	38,712	0,022	1,5
31053854 - 10	24,777	24,193	24,641	24,537	0,176	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31053854 - 5	24,637	24,385	24,691	24,571	0,094	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31053854 - 2,5	24,051	24,396	24,033	24,160	0,118	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31053854 - 1,25	23,994	23,713	24,133	23,947	0,123	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31053854 - 0,625	24,437	24,220	23,870	24,175	0,165	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31053854 - 0,3	31,550	24,336	24,094	26,660	2,446	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31053854 - 0,15	23,928	24,158	23,990	24,025	0,069	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27652677 - 10	25,250	24,378	25,188	24,939	0,281	34,816	34,818	35,259	34,964	0,148	17,4
27652677 - 5	24,566	25,182	25,147	24,965	0,200	36,169	36,202	35,943	36,105	0,082	8,0
27652677 - 2,5	23,947	24,313	24,718	24,326	0,223	Sin det.	37,575	38,262	37,918	0,343	1,5
27652677 -1,25	23,626	23,432	24,218	23,759	0,237	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27652677 - 0,625	24,175	24,157	24,390	24,241	0,075	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27652677 - 0,3	24,168	24,024	24,093	24,095	0,041	38,126	Sin det.	Sin det.	38,126		1,1
27652677 - 0,15	24,083	24,150	24,209	24,148	0,036	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28404844 - 10	24,871	24,460	24,391	24,574	0,150	36,439	35,815	35,287	35,847	0,333	7,3
28404844-5	24,313	24,845	24,575	24,578	0,154	35,147	35,902	35,578	35,542	0,219	9,1
28404844 - 2,5	24,669	24,641	24,502	24,604	0,052	34,490	35,225	35,445	35,053	0,289	12,9

(continuación)

ID muestra -[µM]	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
28404844 - 1,25	25,192	24,764	24,583	24,846	0,181	35,589	35,070	34,908	35,189	0,205	13,9
28404844 - 0,625	23,716	24,349	23,709	23,925	0,212	34,875	34,681	35,078	34,878	0,114	9,1
28404844 - 0,3	24,314	24,294	23,777	24,128	0,176	36,174	35,414	35,560	35,716	0,233	5,9
28404844 - 0,15	23,887	24,220	24,537	24,215	0,188	37,444	36,090	Sin det.	36,767		3,0
26949312 - 10	24,120	24,568	23,828	24,172	0,215	35,274	35,372	39,769	36,805	1,483	2,8
26949312 - 5	25,533	24,509	23,791	24,611	0,506	35,363	35,306	35,734	35,467	0,134	9,8
26949312 - 2,5	24,709	25,296	23,902	24,636	0,404	35,370	35,367	36,890	35,876	0,507	7,5
26949312 - 1,25	23,660	23,190	24,193	23,681	0,290	35,789	34,936	36,215	35,647	0,376	4,5
26949312 - 0,625	24,276	23,284	24,147	23,902	0,311	38,198	36,099	37,896	37,398	0,655	1,6
26949312 - 0,3	23,439	24,406	23,351	23,732	0,338	37,138	39,249	38,950	38,446	0,659	0,7
26949312 - 0,15	24,174	24,056	23,536	23,922	0,196	38,356	Sin det.	38,433	38,394	0,039	0,8
28543944 - 10	25,306	26,435	24,692	25,477	0,510	35,410	37,512	35,734	36,219	0,653	10,6
28543944 - 5	24,657	24,080	25,402	24,713	0,383	34,878	35,863	36,609	35,783	0,501	8,4
28543944 - 2,5	23,736	24,072	25,806	24,538	0,642	34,559	35,559	37,287	35,802	0,797	7,4
28543944 - 1,25	23,897	23,331	24,122	23,783	0,235	35,466	35,389	36,261	35,705	0,279	4,7
28543944 - 0,625	24,217	24,081	24,581	24,293	0,149	36,082	38,200	37,353	37,212	0,615	2,3
28543944 - 0,3	24,994	24,387	26,001	25,127	0,471	38,644	38,248	Sin det.	38,446		1,8
28543944 - 0,15	25,266	24,555	24,912	24,911	0,205	Sin det.	Sin det.	39,187	39,187		0,9
28631590 - 10	24,737	24,142	24,856	24,578	0,221	35,810	35,755	36,284	35,950	0,168	6,8
28631590 - 5	24,973	24,748	24,992	24,904	0,078	36,229	36,065	36,230	36,174	0,055	7,3
28631590 - 2,5	25,338	24,195	24,584	24,705	0,336	35,048	34,434	37,759	35,747	1,022	8,6
28631590-1,25	24,314	24,110	23,892	24,106	0,122	34,385	34,392	34,731	34,503	0,114	13,4

(continuación)

ID muestra -[µM]	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
28631590 - 0,625	24,319	24,150	23,813	24,094	0,149	35,683	35,838	36,587	36,036	0,279	4,6
28631590 - 0,3	24,518	24,526	25,279	24,774	0,252	38,616	Sin det.	Sin det.	38,616		1,2
28631590 - 0,15	25,046	25,180	24,530	24,919	0,198	Sin det.	Sin det.	38,393	38,393		1,6

TABLA XIII-D. EFECTOS DE UNA SERIE DE CONCENTRACIONES DE INHIBIDRO DE HDAC SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO.

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
26949312-10	26,448	25,057	26,003	25,836	0,41	34,880	34,463	34,407	34,583	0,149	1,5
26949312-5	26,255	26,023	25,642	25,973	0,179	34,994	35,507	35,068	35,190	0,160	1,7
26949312-2,5	25,467	25,567	25,04	25,358	0,162	34,855	34,585	34,175	34,538	0,198	2,5
26949312-1,25	25,255	25,919	25,182	25,452	0,235	35,501	35,418	36,239	35,719	0,261	1,5
26949312-0,6	25,894	24,872	25,982	25,582	0,356	36,874	37,669	37,358	37,301	0,231	3,5
26949312-0,3	25,766	26,482	26,42	26,223	0,229	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
26949312-0,1 5	26,148	25,651	26,007	25,935	0,148	39,610	Sin det.	Sin det.	39,610		
Sin tratamiento	25,155	25,282	24,491	25,012	0,177	Sin det	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	24,518	25,032	25,591	25,012	0,177	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	23,971	23,902	23,626	23,713	0,13	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	23,343	24,079	23,356	23,713	0,13	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	23,665	23,605	23,351	23,54	0,096	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	22,711	24,132	23,102	23,157	0,228	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	22,619	23,429	22,946	23,157	0,228	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	25,115	24,958	24,442	24,948	0,142	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	24,642	25,386	25,145	24,948	0,142	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	24,434	23,244	24,613	24,293	0,211	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
Sin tratamiento	24,494	24,471	24,5	24,293	0,211	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28543944-10	24,996	25,183	25,384	25,187	0,112	34,373	34,171	34,239	34,261	0,059	1,2
28543944-5	25,587	25,215	24,7	25,167	0,257	34,541	34,324	33,963	34,276	0,169	1,8
28543944-2,5	24,629	25,097	24,898	24,874	0,136	34,987	34,578	34,544	34,703	0,142	1,6
28543944-1,25	24,503,	24,213	24,673	24,463	0,134	34,645	34,463	35,010	34,706	0,161	1,6
28543944-0,6	24,818	25,068	25,269	25,052	0,13	35,881	36,647	37,432	36,654	0,448	3,8
28543944-0,3	25,534	24,953	25,368	25,285	0,173	37,046	Sin det.	37,161	37,104	0,058	10,8
28543944-0,1 5	24,912	25,273	24,778	24,988	0,148	Sin det.	Sin det.	39,134	39,134		

ES 2 369 240 T3

(continuación)

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
28631590-10	25,828	25,244	24,508	25,193	0,382	35,365	34,330	34,445	34,713	0,328	0,9
28631590-5	24,97	25,007	24,542	24,84	0,149	33,904	33,720	34,243	33,956	0,153	1,8
28631590-2,5	24,636	24,346	24,129	24,37	0,147	34,082	34,456	34,056	34,198	0,129	1,6
28631590-1,25	24,807	24,817	24,211	24,612	0,2	34,608	34,245	34,213	34,355	0,127	2,5
28631590-0,6	24,806	24,792	25,032	24,877	0,078	34,402	35,116	35,208	34,909	0,255	11,4
28631590-0,3	25,014	24,86	24,97	24,948	0,046	37,170	37,587	38,313	37,690	0,334	5,7
28631590-0,1 5	24,975	24,384	24,603	24,654	0,172	Sin det.	38,059	38,341	38,200	0,141	4,8
TSA 10	24,088	24,18	23,943	24,07	0,069	33,220	33,509	33,418	33,383	0,085	
TSA 5	24,181	23,869	23,934	23,995	0,095	34,219	33,503	34,193	33,972	0,234	
TSA 2,5	23,809	23,453	23,244	23,502	0,165	34,160	34,073	33,853	34,029	0,091	
TSA 1,25	23,38	23,538	22,972	23,297	0,169	33,428	34,285	34,823	34,179	0,406	
TSA 0,6	23,708	23,509	23,369	23,529	0,098	35,218	37,464	38,525	37,069	0,975	
TSA 0,3	23,243	23,353	23,162	23,252	0,055	38,481	37,619	39,413	38,504	0,518	
TSA 0,15	23,757	23,344	23,329	23,476	0,14	39,691	38,881	Sin det.	39,286		
31053854-10	23,95	24,213	24,164	24,109	0,081	34,456	34,060	35,137	34,551	0,315	0,5
31053854-5	24,213	23,982	23,683	23,959	0,153	33,752	34,593	35,331	34,559	0,456	0,6
31053854-2,5	23,458	23,25	23,656	23,455	0,117	35,529	37,419	37,660	36,869	0,674	0,1
31053854-1,25	23,12	23,307	23,179	23,202	0,055	38,802	Sin det.	Sin det.	38,802		
31053854-0,6	23,538	23,383	23,064	23,328	0,14	38,685	Sin det.	Sin det.	38,685		
31053854-0,3	23,615	23,955	23,548	23,706	0,126	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31053854-0,1 5	23,692	23,374	23,677	23,581	0,104	Sin det.	Sin det.	38,037	38,037		
38107992-10	23,412	23,343	23,425	23,393	0,025	34,350	34,777	34,222	34,450	0,168	0,3
38107992-5	23,572	23,435	23,575	23,527	0,046	34,937	35,065	35,059	35,020	0,042	0,3
38107992-2,5	24,128	23,576	23,108	23,604	0,295	34,948	34,541	34,008	34,499	0,272	0,8
38107992-1,25	23,583	23,279	23,341	23,401	0,093	34,621	34,064	33,672	34,119	0,275	1,1

(continuación)

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
38107992-0,6	23,62	23,347	23,752	23,573	0,119	35,001	33,830	34,246	34,359	0,343	6,7
38107992-0,3	23,552	23,329	23,828	23,569	0,144	34,862	34,486	35,081	34,810	0,174	16,1
38107992-0,15	24,006	23,779	23,658	23,814	0,102	35,970	36,013	36,826	36,270	0,278	10,2
31040074-6,25	26,192	25,514	25,223	25,643	0,287	34,777	34,683	34,357	34,605	0,127	1,3
31040074-3,1	25,313	25,833	25,942	25,696	0,194	33,880	34,662	34,821	34,454	0,291	2,3
31040074-1,56	24,947	25,173	25,52	25,213	0,166	34,942	34,885	35,638	35,155	0,242	1,5
31040074-0,78	24,609	24,91	25,24	24,919	0,182	34,957	34,464	35,647	35,023	0,343	1,7
31040074-0,39	25,807	25,252	25,518	25,526	0,16	35,811	36,152	38,097	36,687	0,712	5,2
31040074-0,2	25,462	25,424	25,405	25,43	0,017	38,438	Sin det.	Sin det.	38,438		
31040074-0,1	25,444	25,12	25,157	25,24	0,102	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
31040217-10	25,645	26,643	25,023	25,771	0,472	34,905	36,254	34,118	35,092	0,624	1,0
31040217-5	24,899	25,387	25,103	25,129	0,141	34,277	34,507	35,221	34,669	0,284	1,4
31040217-2,5	24,928	25,136	25,108	25,057	0,065	34,061	34,010	33,576	33,882	0,154	3,3
31040217-1,25	25,737	25,45	25,269	25,485	0,136	35,123	34,764	35,203	35,030	0,135	2,5
31040217-0,6	25,143	25,711	25,642	25,499	0,179	35,127	35,967	35,948	35,681	0,277	8,5
31040217-0,3	25,342	25,486	25,586	25,471	0,071	37,404	38,012	37,484	37,633	0,191	8,5
31040217-0,15	25,374	25,842	24,962	25,393	0,254	38,193	Sin det.	38,627	38,410	0,217	6,9
27652677-10	25,094	25,655	24,988	25,246	0,207	34,189	34,889	34,775	34,618	0,217	1,0
27652677-5	25,306	25,138	24,962	25,135	0,099	34,722	34,870	35,005	34,866	0,082	1,2
27652677-2,5	24,583	24,722	24,091	24,465	0,192	36,261	36,455	35,189	35,969	0,394	0,5
27652677-1,25	25,446	24,477	24,751	24,891	0,288	Sin det.	36,790	39,614	38,202	1,412	0,2
27652677-0,6	25,024	25,316	24,827	25,056	0,142	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
27652677-0,3	24,997	25,472	24,259	24,909	0,353	Sin det.	Sin det.	Sin det.			

(continuación)

ID muestra	GAPDH					PDX1					CN
	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	copia 1	copia 2	copia 3	Ct promedio	Error típico Ct	
27652677-0,15	25,428	24,982	24,833	25,081	0,179	Sin det.	Sin det.	Sin det.			
28404844-10	24,37	24,307	25,196	24,624	0,287	34,508	33,938	34,491	34,313	0,187	0,8
28404844-5	25,704	24,338	24,919	24,987	0,396	35,323	34,233	34,390	34,649	0,340	1,2
28404844-2,5	24,817	25,298	24,498	24,871	0,232	35,107	34,032	35,117	34,752	0,360	1,2
28404844-1,25	24,805	25,06	24,541	24,802	0,15	35,403	37,184	34,947	35,845	0,682	0,9
28404844-0,6	24,478	25,252	25,057	24,929	0,233	36,445	36,404	35,967	36,272	0,153	4,6
28404844-0,3	25,166	24,565	24,399	24,71	0,233	Sin det.	38,756	38,892	38,824	0,068	2,2
28404844-0,15	24,838	25,498	25,135	25,157	0,191	38,107	Sin det.	Sin det.	38,107		

TABLA XIV. EFECTOS DE UN TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE HDAC Y MG-132 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE PÁNCREAS ADULTO

Tratamiento cel. H5F3P19	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Células sin tratar	-	29,144	22,091	27,162	-	-	-	
Células de control tratadas con medio	-	28,628	20,249	25,471	-	-	-	
MG132 1 uM durante 24 h	-	29,144	21,634	27,162	-	-	-	
MG132 10 uM durante 24 h	-	29,144	22,384	27,162	-	-	-	
TSA 1,25 uM durante 24 h	34,557	28,628	21,045	25,471	10,355	0,001	0,076	0,108
TSA 2,5 uM durante 24 h	32,624	28,628	20,438	25,471	9,029	0,002	0,191	0,162
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	32,744	28,628	20,788	25,471	8,799	0,002		0,225 0,258
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	32,316	28,628	20,784	25,471	8,375	0,003	0,301	0,143
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	32,019	28,628	22,355	25,471	6,507	0,011	1,100	0,034
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	31,582	28,628	22,272	25,471	6,153	0,014	1,405	0,077

(continuación)

Tratamiento cel. H5F3P19	Tc HNF-3β muestra	Tc HNF-3β páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Células sin tratar	-	27,251	22,091	27,162	-	-	-	
Células de control tratadas con medio	-	27,622	20,249	25,471	-	-	-	
MG132 1 uM durante 24 h	-	27,251	21,634	27,162	-	-	-	
MG132 10 uM durante 24 h	-	27,251	22,384	27,162	-	-	-	
TSA 1,25 uM durante 24 h	34,069	27,622	21,045	25,471	10,873	0,001	0,053	0,111
TSA 2,5 uM durante 24 h	32,883	27,622	20,438	25,471	10,294	0,001	0,080	0,170
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	33,778	27,622	20,788	25,471	10,839	0,001	0,055	0,219
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	33,429	27,622	20,784	25,471	10,494	0,001	0,069	0,213
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	31,678	27,622	22,355	25,471	7,172	0,007	0,693	0,078
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	31,183	27,622	22,272	25,471	6,760	0,009	0,923	0,136

(continuación)

Tratamiento cel. H5F3P19	Tc insulina muestra	Tc insulina páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Células sin tratar	-	18,282	22,091	27,162	-	-	-	-
Células de control tratadas con medio	-	18,011	20,249	25,471	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h	-	18,282	21,634	27,162	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 24 h	-	18,282	22,384	27,162	-	-	-	-
TSA 1,25 uM durante 24 h	-	18,011	21,045	25,471	-	-	-	-
TSA 2,5 uM durante 24 h	-	18,011	20,438	25,471	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	-	18,011	20,788	25,471	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	18,011	20,784	25,471	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	-	18,011	22,355	25,471	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	18,011	22,272	25,471	-	-	-	-

(continuación)

Tratamiento cel. H5F3P19	Tc NKX6.1 muestra	Tc NKX6.1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Células sin tratar	-	29,679	22,091	27,162	-	-	-	
Células de control tratadas con medio	-	30,161	20,249,	25,471	-	-	-	
MG132 1 uM durante 24 h	-	29,679	21,634	27,162	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 24 h	36,281	29,679	22,384	27,162	11,380	0,000	0,038	0,211
TSA 1,25 uM durante 24 h	30,621	30,161	21,045	25,471	4,886	0,034	3,382	0,110
TSA 2,5 uM durante 24 h	29,323	30,161	20,438	25,471	4,195	0,055	5,460	0,113
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	29,718	30,161	20,788	25,471	4,240	0,053	5,292	0,080
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	29,122	30,161	20,784	25,471	3,648	0,080	7,977	0,191
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	29,704	30,161	22,355	25,471	2,659	0,158	15,833	0,017
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	29,410	30,161	22,272	25,471	2,448	0,183	18,326	0,019

TABLA XV. EFECTOS DE UN TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE HDAC Y MG-132 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE PÁNCREAS ADULTO

Tratamiento cél. H5F3P19 con MG132 seguido de TSA	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	28,660	24,340	28,950	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h	-	28,660	23,680	28,950	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 24 h	-	28,660	23,680	28,950	-	-	-	-
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	35,010	28,660	23,690	28,950	11,610	0,000	0,032	0,100
2% DMEM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	34,060	28,660	23,780	28,950	10,570	0,001	0,066	0,200
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	31,770	28,660	24,040	28,950	8,020	0,004	0,385	0,130
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	33,240	28,660	23,800	28,950	9,730	0,001	0,118	0,170
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	32,120	28,660	25,880	28,950	6,530	0,011	1,082	0,400
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	32,100	28,660	24,370	28,950	8,020	0,004	0,385	0,110

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P19 con TSA seguido de MG132	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	28,660	22,680	28,950	-	-	-	-
TSA 1,25 uM durante 24 h	34,940	28,660	22,900	28,950	12,330	0,000	0,019	0,260
TSA 2,5 uM durante 24 h	34,940	28,660	24,310	28,950	10,920	0,001	0,052	0,060
DMEM al 2% durante 24 h seguido de MG132 1 uM durante 24 h	-	28,660	25,400	28,950	-	-	-	-
DMEM al 2% durante 24 h seguido de MG132 10 uM durante 24 h	-	28,660	24,070	28,950	-	-	-	-
TSA 1,25 uM durante 24 h seguido de MG132 1 uM durante 24 h	-	28,660	24,120	28,950	-	-	-	-
TSA 1,25 uM durante 24 h seguido de MG132 10 uM durante 24 h	-	28,660	24,250	28,950	-	-	-	-
TSA 2,5 uM durante 24 h seguido de MG132 1 uM durante 24 h	-	28,660	24,290	28,950	-	-	-	-
TSA 2,5 uM durante 24 h seguido de MG132 10 uM durante 24 h	-	28,660	26,670	28,950	-	-	-	-

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P19: MG132 seguido de TSA	Tc HNF3-β muestra	Tc HNF3-β páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	26,720	24,340	28,950	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h	34,030	26,720	23,680	28,950	12,580	0,000	0,016	0,190
MG132 10 uM durante 24 h	34,550	26,720	23,680	28,950	13,100	0,000	0,011	0,090
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	35,140	26,720	23,690	28,950	13,680	0,000	0,008	0,090
DMEM al 2% durante 24 seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	33,290	26,720	23,780	28,950	11,740	0,000	0,029	0,370
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	31,900	26,720	24,040	28,950	10,090	0,001	0,092	0,220
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	34,030	26,720	23,800	28,950	12,460	0,000	0,018	0,350
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	29,770	26,720	25,880	28,950	6,120	0,014	1,438	0,150
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	30,290	26,720	24,370	28,950	8,150	0,004	0,352	0,040
Control sin tratar	-	26,720	22,680	28,950	-	-	-	-

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P19: MG132 seguido de TSA	Tc HNF3-β muestra	Tc HNF3-β páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
TSA 1,25 uM durante 24 h	34,120	26,720	22,900	28,950	13,450	0,000	0,009	0,180
TSA 2,5 uM durante 24 h	34,180	26,720	24,310	28,950	12,100	0,000	0,023	0,450
DMEM al 2% durante 24 h seguido de MG132 1 uM durante 24 h	32,830	26,720	25,400	28,950	9,660	0,001	0,124	0,250
DMEM al 2% durante 24 h seguido de MG132 10 uM durante 24 h	32,520	26,720	24,070	28,950	10,680	0,001	0,061	0,050
TSA 1,25 uM durante 24 h seguido de MG132 1 uM durante 24 h	34,870	26,720	24,120	28,950	12,980	0,000	0,012	0,380
TSA 1,25 uM durante 24 h seguido de MG132 10 uM durante 24 h	35,070	26,720	24,250	28,950	13,050	0,000	0,012	0,230
TSA 2,5 uM durante 24 h seguido de MG132 1 uM durante 24 h	34,940	26,720	24,290	28,950	12,880	0,000	0,013	0,450
TSA 2,5 uM durante 24 h seguido de MG132 10 uM durante 24 h	35,670	26,720	26,670	28,950	11,230	0,000	0,042	0,400

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P19: MG132 seguido de TSA	Tc insulina muestra	Tc insulina páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	17,940	24,340	28,950	-	-	-	
MG132 1 uM durante 24 h	-	17,940	23,680	28,950	-	-	-	
MG132 10 uM durante 24 h	-	17,940	23,680	28,950	-	-	-	
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	-	17,940	23,690	28,950	-	-	-	
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	17,940	23,780	28,950	-	-	-	
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	-	17,940	24,040	28,950	-	-	-	
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	17,940	23,800	28,950	-	-	-	
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	37,060	17,940	25,880	28,950	22,190	0,000	0,000	0,360
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	17,940	24,370	28,950	-	-	-	

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P19: TSA seguido de MG132	Tc insulina muestra	Tc insulina páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	17,940	22,680	28,950	-	-	-	
TSA 1,25 uM durante 24 h	-	17,940	22,900	28,950	-	-	-	
TSA 2,5 uM durante 24 h	-	17,940	24,310	28,950	-	-	-	
DMEM al 2% durante 24 h seguido de MG132 1 uM durante 24 h	-	17,940	25,400	28,950	-	-	-	
DMEM al 2% durante 24 h seguido de MG132 10 uM durante 24 h	-	17,940	24,070	28,950	-	-	-	
TSA 1,25 uM durante 24 h seguido de MG132 1 uM durante 24 h	-	17,940	24,120	28,950	-	-	-	
TSA 1,25 uM durante 24 h seguido de MG132 10 uM durante 24 h	-	17,940	24,250	28,950	-	-	-	
TSA 2,5 uM durante 24 h seguido de MG132 1 uM durante 24 h	-	17,940	24,290	28,950	-	-	-	
TSA 2,5 uM durante 24 h seguido de MG132 10 uM durante 24 h	-	17,940	26,670	28,950	-	-	-	

(continuación)

Tratam.cél. H5F3P19: MG132 seguido de TSA	Tc NKX6.1 muestra	Tc NKX6.1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	29,120	24,340	28,950	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h	33,820	29,120	23,680	28,950	9,970	0,001	0,100	0,000
MG132 10 uM durante 24 h	32,850	29,120	23,680	28,950	9,970	0,001	0,100	0,420
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	30,590	29,120	23,690	28,950	6,730	0,009	0,942	0,060
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	29,830	29,120	23,780	28,950	5,880	0,017	1,698	0,060
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	27,970	29,120	24,040	28,950	3,760	0,074	7,381	0,070
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	29,310	29,120	23,800	28,950	5,340	0,025	2,469	0,200
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	29,000	29,120	25,880	28,950	2,950	0,129	12,941	0,050
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	28,860	29,120	24,370	28,950	4,320	0,050	5,007	0,100

(continuación)

Tratam.cél. H5F3P19: TSA seguido de MG132	Tc NKX6.1 muestra	Tc NKX6.1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	29,120	22,680	28,950	-	-	-	-
TSA 1,25 uM durante 24 h	29,920	29,120	22,900	28,950	6,850	0,009	0,867	0,000
TSA 2,5 uM durante 24 h	30,130	29,120	24,310	28,950	5,650	0,020	1,992	0,130
DMEM al 2% durante 24 h seguido de MG132 1 uM durante 24 h	32,830	29,120	25,400	28,950	7,260	0,007	0,652	0,250
DMEM al 2% durante 24 h seguido de MG132 10 uM durante 24 h	33,200	29,120	24,070	28,950	8,960	0,002	0,201	0,610
TSA 1,25 uM durante 24 h seguido de MG132 1 uM durante 24 h	35,950	29,120	24,120	28,950	11,660	0,000	0,031	0,110
TSA 1,25 uM durante 24 h seguido de MG132 10 uM durante 24 h	34,700	29,120	24,250	28,950	10,280	0,001	0,080	0,160
TSA 2,5 uM durante 24 h seguido de MG132 1 uM durante 24 h	34,820	29,120	24,290	28,950	10,360	0,001	0,076	0,480
TSA 2,5 uM durante 24 h seguido de MG132 10 uM durante 24 h	35,400	29,120	26,670	28,950	8,560	0,003	0,265	0,060

TABLA XVI. EFECTOS DE UN TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE HDAC Y MG-132 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE PÁNCREAS ADULTO.

Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	28,660	24,010	28,950	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h	-	30,110	25,460	33,450	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 24 h	-	30,110	25,620	33,450	-	-	-	-
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	36,490	28,660	22,190	28,950	14,590	0,000	0,004	0,850
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	33,270	28,660	21,920	28,950	11,640	0,000	0,031	0,110
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	33,810	30,110	26,470	33,450	10,680	0,001	0,061	0,120
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	33,590	30,110	32,740	33,450	4,190	0,055	5,479	0,200
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	31,530	30,110	25,950	33,450	8,920	0,002	0,206	0,010
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	32,160,	28,660	22,570	28,950	9,880	0,001	0,106	0,180

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P19: MG132 seguido de TSA	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	30,110	26,740	33,450	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h	-	28,660	23,870	28,950	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 24 h	-	28,660	24,790	28,950	-	-	-	-
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	32,790	28,660	24,650	28,950	8,430	0,003	0,290	0,160
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	30,510	28,660	23,340	28,950	7,460	0,006	0,568	0,100
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	32,120	28,660	24,280	28,950	8,130	0,004	0,357	0,260
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	32,740	28,660	24,710	28,950	8,320	0,003	0,313	0,060
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	32,470	28,660	25,290	28,950	7,470	0,006	0,564	0,160
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	32,310	28,660	25,100	28,950	7,500	0,006	0,552	0,040

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	Tc HNF3-β muestra	Tc HNF3-β páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	26,720	24,010	28,950	-	-	-	
MG132 1 uM durante 24 h	-	27,920	25,460	33,450	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 24 h	37,510	27,920	25,620	33,450	17,420	0,000	0,001	0,730
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	36,000	26,720	22,190	28,950	16,040	0,000	0,001	1,200
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	33,500	26,720	21,920	28,950	13,810	0,000	0,007	0,300
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	31,690	27,920	26,470	33,450	10,750	0,001	0,058	0,230
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	31,840	27,920	32,740	33,450	4,630	0,040	4,039	0,300
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	28,950	27,920	25,950	33,450	8,530	0,003	0,271	0,040
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	30,410	26,720	22,570	28,950	10,070	0,001	0,093	0,100

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P19: MG132 seguido de TSA	Tc HNF3-β muestra	Tc HNF3-β páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	27,920	26,740	33,450	-	-	-	
MG132 1 uM durante 24 h	33,270	26,720	23,870	28,950	11,630	0,000	0,032	0,170
MG132 10 uM durante 24 h	34,110	26,720	24,790	28,950	11,550	0,000	0,033	0,280
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	32,190	26,720	24,650	28,950	9,770	0,001	0,115	0,160
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	31,720	26,720	23,340	28,950	10,610	0,001	0,064	0,080
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	29,370	26,720	24,280	28,950	7,320	0,006	0,626	0,260
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	29,940	26,720	24,710	28,950	7,460	0,006	0,568	0,010
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	29,310	26,720	25,290	28,950	6,250	0,013	1,314	0,210
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	29,840	26,720	25,100	28,950	6,970	0,008	0,798	0,330

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	Tc insulina muestra	Tc insulina páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	17,940	24,010	28,950	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h	-	19,080	25,460	33,450	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 24 h	-	19,080	25,620	33,450	-	-	-	-
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	-	17,940	22,190	28,950	-	-	-	-
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	17,940	21,920	28,950	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	-	19,080	26,470	33,450	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	19,080	32,740	33,450	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	-	19,080	25,950	33,450	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	36,000	17,940	22,570	28,950	24,440	0,000	0,000	0,280

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P19: MG132 seguido de TSA	Tc insulina muestra	Tc insulina páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	19,080	26,740	33,450	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h	-	17,940	23,870	28,950	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 24 h	-	17,940	24,790	28,950	-	-	-	-
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	-	17,940	24,650	28,950	-	-	-	-
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	17,940	23,340	28,950	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	36,580	17,940	24,280	28,950	23,310	0,000	0,000	0,760
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	36,430	17,940	24,710	28,950	22,730	0,000	0,000	0,320
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	36,060	17,940	25,290	28,950	21,780	0,000	0,000	1,100
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	17,940	25,100	28,950	-	-	-	-

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	Tc NKX6.1 muestra	Tc NKX6.1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	29,120	24,010	28,950	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h	-	30,240	25,460	33,450	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 24 h	34,550	30,240	25,620	33,450	12,140	0,000	0,022	0,380
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	30,640	29,120	22,190	28,950	8,280	0,003	0,322	0,060
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	29,380	29,120	21,920	28,950	7,290	0,006	0,639	0,040
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	30,690	30,240	26,470	33,450	7,430	0,006	0,580	0,070
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	30,740	30,240	32,740	33,450	1,210	0,432	43,227	0,210
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	28,930	30,240	25,950	33,450	6,190	0,014	1,370	0,200
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	29,290	29,120	22,570	28,950	6,550	0,011	1,067	0,070

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P19: MG132 seguido de TSA	Tc NKX6.1 muestra	Tc NKX6.1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	30,240	26,740	33,450	-	-	-	
MG132 1 uM durante 24 h	31,930	29,120	23,870	28,950	7,890	0,004	0,422	0,090
MG132 10 uM durante 24 h	32,660	29,120	24,790	28,950	7,700	0,005	0,481	0,350
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24	29,070	29,120	24,650	28,950	4,250	0,053	5,256	0,210
DMEM al 2% durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	28,690	29,120	23,340	28,950	5,180	0,028	2,758	0,300
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	28,290	29,120	24,280	28,950	3,840	0,070	6,983	0,210
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	29,430	29,120	24,710	28,950	4,550	0,043	4,269	0,230
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	29,040	29,120	25,290	28,950	3,580	0,084	8,362	0,400
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	29,240	29,120	25,100	28,950	3,970	0,064	6,381	0,020

TABLA XVII. EFECTOS DE UN TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE HDAC Y MG-132 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE PÁNCREAS ADULTO.

Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔCt	2^(-ΔΔCt) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar 3 h	-	30,812	21,985	28,330	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 3 h	-	30,812	22,223	28,330	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 3 h	-	30,812	22,358	28,330	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 3 h	-	30,812	23,215	28,330	-	-	-	-
Control sin tratar 6 h	-	30,812	22,845	28,330	-	-		
MG132 1 uM durante 6 h	-	30,812	22,134	28,330	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 6 h	-	30,812	22,601	28,330	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 6 h	-	30,812	23,078	28,330	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 9 h	-	30,812	21,710	28,330	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 9 h	-	30,812	22,376	28,330	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 9 h	-	30,812	22,948	28,330	-	-	-	-
Control sin tratar 12 h	-	30,812	22,332	28,330	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 12 h	39,852	30,812	22,163	28,330	15,207	0,000	0,003	
MG132 5 uM durante 12 h	38,040	30,812	22,247	28,330	13,311	0,000	0,010	
MG132 10 uM durante 12 h	-	30,812	22,265	28,330	-	-	-	-

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔCt	2^(-ΔΔCt) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar 24 h		30,812	22,426	28,330	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h	-	29,282	20,963	27,787	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 24 h	-	29,282	21,825	27,787	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 24 h	-	29,282	22,143	27,787	-	-	-	-
TSA 2,5 uM durante 24 h	35,425	29,282	22,023	27,787	11,907	0,000	0,026	0,978
MG132 1 uM durante 3 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	37,429	30,812	23,465	28,330	11,482	0,000	0,035	0,173
MG132 5 uM durante 3 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	35,465	30,812	23,507	28,330	9,476	0,001	0,140	0,346
MG132 10 uM durante 3 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	33,821	30,812	23,684	28,330	7,655	0,005	0,496	0,159
MG132 1 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	36,660	30,812	22,604	28,330	11,574	0,000	0,033	0,491
MG132 5 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	32,950	30,812	22,716	28,330	7,752	0,005	0,464	0,021

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔCt	2^(-ΔΔCt) =CN	% CN	Error típico
MG132 10 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	32,293	30,812	23,269	28,330	6,542	0,011	1,073	0,168
MG132 1 uM durante 9 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	35,004	29,282	21,479	27,787	12,030	0,000	0,024	0,003
MG132 5 uM durante 9 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	33,868	29,282	21,698	27,787	10,675	0,001	0,061	0,050
MG132 10 uM durante 9 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	32,776	29,282	22,310	27,787	8,971	0,002	0,199	0,175
MG132 1 uM durante 12 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	35,127	29,282	22,395	27,787	11,237	0,000	0,041	0,969
MG132 5 uM durante 12 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	33,794	29,282	22,898	27,787	9,401	0,001	0,148	0,342
MG132 10 uM durante 12 seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	33,325	29,282	23,707	27,787	8,123	0,004	0,359	0,112
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	29,282	20,116	27,787	-	-	-	-

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔCt	2^(-ΔΔCt) =CN	% CN	Error típico
MG132 5 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	34,520	29,282	19,742	27,787	13,283	0,000	0,010	0,235
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	33,216	29,282	20,421	27,787	11,300	0,000	0,040	0,029
Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	**Tc HNF-3β muestra**	**Tc HNF-3β páncreas**	**Tc GAPDH muestra**	**Tc GAPDH páncreas**	**ΔΔTc**	**2^(-ΔΔTc) =CN**	**% CN**	**Error típico**
Control sin tratar 3 h	-	28,3680	21,9850	28,3300	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 3 h	-	28,3680	22,2230	28,3300	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 3 h	-	28,3680	22,3580	28,3300	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 3 h	-	28,3680	23,2150	28,3300	-	-	-	-
Control sin tratar 6 h	-	28,3680	22,8450	28,3300	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 6 h	-	28,3680	22,1340	28,3300	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 6 h	-	28,3680	22,6010	28,3300	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 6 h	37,2890	28,3680	23,0780	28,3300	14,1730	0,0001	0,0054	
MG132 1 uM durante 9 h	-	28,3680	21,7100	28,3300	-	-	-	-

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	Tc HNF-3β muestra	Tc HNF-3β páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
MG132 5 uM durante 9 h	-	28,3680	22,3760	28,3300	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 9 h	-	28,3680	22,9480	28,3300	-	-	-	-
Control sin tratar 12 h	-	28,3680	22,3320	28,3300	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 12 h	-	28,3680	22,1630	28,3300	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 12 h	36,9740	28,3680	22,2470	28,3300	14,6890	0,0000	0,0038	-
MG132 10 uM durante 12 h	37,3820	28,3680	22,2650	28,3300	15,0790	0,0000	0,0029	0,1310
Control sin tratar 24 h	-	28,3680	22,4260	28,3300	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h	-	28,5450	20,9630	27,7870	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 24 h	35,8470	28,5450	21,8250	27,7870	13,2640	0,0001	0,0102	0,3366
MG132 10 uM durante 24 h	33,3790	28,5450	22,1430	27,7870	10,4780	0,0007	0,0701	0,6053
TSA 2,5 uM durante 24 h	36,1230	28,5450	22,0230	27,7870	13,3420	0,0001	0,0096	0,5317
MG132 1 uM durante 3 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	37,1680	28,3680	23,4650	28,3300	13,6650	0,0001	0,0077	
MG132 5 uM durante 3 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	37,6040	28,3680	23,5070	28,3300	14,0590	0,0001	0,0059	1,0580

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	Tc HNF-3β muestra	Tc HNF-3β páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
MG132 10 uM durante 3 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	34,5680	28,3680	23.6840	28,3300	10,8740	0,0005	0,0533	0,0290
MG132 1 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	35,6510	28,3680	22,6040	28,3300	13,0090	0,0001	0,0121	0,4200
MG132 5 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	33,7310	28,3680	22,7160	28,3300	10,9770	0,0005	0,0496	0,0870
MG132 10 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	32,5800	28,3680	23,2690	28,3300	9,2730	0,0016	0,1616	0,2290
MG132 1 uM durante 9 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	35,3600	28,5450	21,4790	27,7870	13,1230	0,0001	0,0112	1,4927
MG132 5 uM durante 9 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	34,3150	28,5450	21,6980	27,7870	11,8590	0,0003	0,0269	0,0007
MG132 10 uM durante 9 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	34,0920	28,5450	22,3100	27,7870	11,0240	0,0005	0,0480	0,1626
MG132 1 uM durante 12 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	36,3570	28,5450	22,3950	27,7870	13,2040	0,0001	0,0106	1,0557

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	**Tc HNF-3β muestra**	**Tc HNF-3β páncreas**	**Tc GAPDH muestra**	**Tc GAPDH páncreas**	**ΔΔTc**	**2^(-ΔΔTc) =CN**	**% CN**	**Error típico**
MG132 5 uM durante 12 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	34,4540	28,5450	22,8980	27,7870	10,7980	0,0006	0,0562	0,6336
MG132 10 uM durante 12 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	32,9030	28,5450	23,7070	27,7870	8,4380	0,0029	0,2883	0,1704
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	36,5240	28,5450	20,1160	27,7870	15,6500	0,0000	0,0019	0,6215
MG132 5 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	34,5550	28,5450	19,7420	27,7870	14,0550	0,0001	0,0059	0,8330
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	30,7860	28,5450	20,4210	27,7870	9,6070	0,0013	0,1282	0,6081
Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	**Tc insulina muestra**	**Tc insulina páncreas**	**Tc GAPDH muestra**	**Tc GAPDH páncreas**	**ΔΔTc**	**2^(-ΔΔTc) =CN**	**% CN**	**Error típico**
Control sin tratar 3 h	-	19,823	21,985	28,330	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 3 h	-	19,823	22,223	28,330	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 3 h	-	19,823	22,358	28,330	-	-	-	-

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	Tc insulina muestra	Tc insulina páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
MG132 10 uM durante 3 h	-	19,823 23,215		28,330	-	-	-	-
Control sin tratar 6 h	-	19,823	22,845	28,330	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 6 h	-	19,823	22,134	28,330	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 6 h	-	19,823	22,601	28,330	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 6 h	-	19,823	23,078	28,330	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 9 h	-	19,823	21,710	28,330	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 9 h	-	19,823	22,376	28,330	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 9 h	-	19,823	22,948	28,330	-	-	-	-
Control sin tratar 12 h	-	19,823	22,332	28,330	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 12 h	-	19,823	22,163	28,330	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 12 h	-	19,823	22,247	28,330	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 12 h	-	19,823	22,265	28,330	-	-	-	-
Control sin tratar 24 h	-	19,823	22,426	28,330	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h	-	19,135	20,963	27,787				
MG132 5 uM durante 24 h	-	19,135	21,825	27,787				
MG132 10 uM durante 24 h	-	19,135	22,143	27,787				
TSA 2,5 uM durante 24 h	-	19,823	22,124	28,330	-	-	-	-

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	Tc insulina muestra	Tc insulina páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
MG132 1 uM durante 3 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	19,823	23,465	28,330		-	-	-
MG132 5 uM durante 3 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	19,823	23,507	28,330	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 3 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	19,823	23,684	28,330	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	19,823	22,604	28,330	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	19,823	22,716	28,330	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	19,823	23,269	28,330	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 9 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	19,135	21,479	27,787				
MG132 5 uM durante 9 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	19,135	21,698	27,787				

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	Tc insulina muestra	Tc insulina páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
MG132 10 uM durante 9 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	19,135	22,310	27,787				
MG132 1 uM durante 12 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	19,135	22,395	27,787				
MG132 5 uM durante 12 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	19,135	22,898	27,787				
MG132 10 uM durante 12 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	19,135	23,707	27,787				
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	19,135	20,116	27,787				
MG132 5 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	19,135	19,742	27,787				
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	19,135	20,421	27,787				

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	Tc NKX6.1 muestra	Tc NKX6.1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar 3 h	-	29,877	21,985	28,330				
MG132 1 uM durante 3 h	-	29,877	22,223	28,330	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 3 h	37,817	29,877	22,358	28,330	13,912	0,000	0,006	0,455
MG132 10 uM durante 3 h	35,781	29,877	23,215	28,330	11,019	0,000	0,048	
Control sin tratar 6 h		29,877	22,845	28,330	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 6 h	-	29,877	22,134	28,330	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 6 h	36,014	29,877	22,601	28,330	-	-	-	
MG132 10 uM durante 6 h	36,808	29,877	23,078	28,330	12,183	0,000	0,022	0,725
Control sin tratar 24 h	-	29,877	22,426	28,330	-	-	-	-
TSA 2,5 uM durante 24 h	32,336	29,877	22,124	28,330	8,665	0,002	0,246	0,026
MG132 1 uM durante 3 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	31,999	29,877	23,465	28,330	6,987	0,008	0,788	0,060
MG132 5 uM durante 3 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	31,784	29,877	23,507	28,330	6,730	0,009	0,942	0,050
MG132 10 uM durante 3 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	30,182	29,877	23,684	28,330	4,951	0,032	3,233	0,037

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P10: MG132 seguido de TSA	Tc NKX6.1 muestra	Tc NKX6.1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
MG132 1 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	31,042	29,877	22,604	28,330	6,891	0,008	0,843	0,056
MG132 5 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	29,876	29,877	22,716	28,330	5,613	0,020	2,043	0,111
MG132 10 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	29,460	29,877	23,269	28,330	14,644	10,040	4,000	0,022

TABLA XVIII. EFECTOS DE UN TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE HDAC Y MG-132 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE PÁNCREAS ADULTO

Tratamiento cél. H5F3P19: MG132 seguido de TSA	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	27,909	19,927	25,975	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 6 h	-	27,909	19,311	25,975	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 6 h	-	27,909	19,494	25,975	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 6 h	-	27,909	19,657	25,975	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h	-	27,909	19,446	25,975	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 24 h	-	27,909	19,417	25,975	-	-	-	-
TSA 1,25 uM durante 24 h	33,243	27,909	19,373	25,975	11,936	0,000	0,03	0,357

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P19: MG132 seguido de TSA	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
TSA 2,5 uM durante 24 h	32,933	27,909	21,176	25,975	9,823	0,001	0,11	0,095
MG132 1 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	27,909	22,139	25,975	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	32,011	27,909	21,967	25,975	8,11	0,004	0,36	
MG132 10 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	31,636	27,909	22,111	25,975	7,591	0,005	0,52	
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	31,097	27,909	20,151	25,975	9,012	0,002	0,19	0,123
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	31,191	27,909	20,096	25,975	9,161	0,002	0,17	0,125
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	30,257	27,909	19,387	25,975	8,936	0,002	0,20	0,153
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	30,81	27,909	20,03	25,975	8,846	0,002	0,22	0,165

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P19: MG132 seguido de TSA	Tc HNF3-β muestra	Tc HNF3-β páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	26,893	19,927	25,975	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 6 h	-	26,893	19,311	25,975	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 6 h	-	26,893	19,494	25,975	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 6 h	-	26,893	19,657	25,975	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h	33,47	26,893	19,446	25,975	13,106	0,000	0,01	0,9
MG132 10 uM durante 24 h	35,725	26,893	19,417	25,975	15,39	0,000	0,00	-
TSA 1,25 uM durante 24 h	32,75	26,893	19,373	25,975	12,459	0,000	0,02	0,598
TSA 2,5 uM durante 24 h	-	26,893	21,176	25,975	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	26,893	22,139	25,975	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	32,191	26,893	21,967	25,975	9,306	0,002	0,16	0,066
MG132 10 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	32,385	26,893	22,111	25,975	9,356	0,002	0,15	0,384
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	31,771	26,893	20,151	25,975	10,702	0,001	0,06	0,384

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P19: MG132 seguido de TSA	**Tc HNF3-β muestra**	**Tc HNF3-β páncreas**	**Tc GAPDH muestra**	**Tc GAPDH páncreas**	**ΔΔTc**	**2^(-ΔΔTc) =CN**	**% CN**	**Error típico**
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	28,537	26,893	20,096	25,975	7,523	0,005	0,54	0,091
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	31,196	26,893	19,387	25,975	10,891	0,001	0,05	0,459
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5uM durante 24 h	28,39	26,893	20,03	25,975	7,442	0,006	0,58	0,088
Tratamiento cél. H5F3P19: MG132 seguido de TSA	**Tc insulina muestra**	**Tc insulina páncreas**	**Tc GAPDH muestra**	**Tc GAPDH páncreas**	**ΔΔTc**	**2^(-ΔΔTc) =CN**	**% CN**	**Error típico**
Control sin tratar	-	15,946	19,927	25,975	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 6 h	-	15,946	19,311	25,975	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 6 h	-	15,946	19,494	25,975	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 6 h	-	15,946	19,657	25,975	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h	-	15,946	19,446	25,975	-	0,000	0,00	-
MG132 10 uM durante 24 h	-	15,946	19,417	25,975	-	-	-	-
TSA 1,25 uM durante 24 h	-	15,946	19,373	25,975	-			
TSA 2,5 uM durante 24 h	-	15,946	21,176	25,975	-	-	-	-

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P19: MG132 seguido de TSA	Tc insulina muestra	Tc insulina páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
MG132 1 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	15,946	22,139	25,975	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	15,946	21,967	25,975	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	15,946	22,111	25,975	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25uM durante 24 h	-	15,946	20,151	25,975	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	-	15,946	20,096	25,975	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h seguido de 2,5 TSA durante 24 h	-	15,946	19,387	25,975	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 durante 24 h	-	15,946	20,03	25,975	-	-	-	-

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P19: MG132 seguido de TSA	Tc NKX6.1 muestra	Tc NKX6.1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	28,463	19,927	25,975	-	-	-	-
MG132 1 uM durante 6 h	-	28,463	19,311	25,975	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 6 h	-	28,463	19,494	25,975	-	-	-	-
MG132 10 uM durante 6 h	35,307	28,463	19,657	25,975	14,732	0,000	0,00	0,092
MG132 1 uM durante 24 h	33,673	28,463	19,446	25,975	24,256	0,000	5E-06	0,187
MG132 10 uM durante 24 h	-	28,463	19,417	25,975	-	-	-	-
TSA 1,25 uM durante 24 h	29,345	28,463	19,373	25,975	9,054	0,002	0,19	0,169
TSA 2,5 uM durante 24 h	29,898	28,463	21,176	25,975	7,804	0,004	0,45	0,217
MG132 1 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	28,463	22,139	25,975	-	-	-	-
MG132 5 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	28,976	28,463	21,967	25,975	6,091	0,015	1,47	0,06
MG132 10 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	28,874	28,463	22,111	25,975	5,845	0,017	1,74	0,108
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	28,299	28,463	20,151	25,975	7,23	0,007	0,67	0,159

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P19: MG132 seguido de TSA	Tc NKX6.1 muestra	Tc NKX6.1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
MG132 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h ,	27,869	28,463	20,096	25,975	6,855	0,009	0,86	0,092
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 durante 24 h	27,306	28,463	19,387	25,975	7,001	0,008	0,78	0,158
MG132 10 uM durante 24 h seguido deTSA 2,5 durante 24 h	27,516	28,463	20,03	25,975	6,568	0,011	1,05	0,093

TABLA XIX. EFECTOS DE UN TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE HDAC Y MG-132 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE PÁNCREAS ADULTO

Tratamiento cél. H5F3P13	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN
Sin tratamiento en DMEM al 2% durante 24 h	38,337	31,818	25,543	31,010	11,988	0,000	0,025
Sin tratamiento en DMEM al 2% durante 24 h seguido de DMEM al 2% durante 3 días	37,797	31,818	25,785	31,010	11,224	0,000	0,042

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P13	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN
Sin tratamiento en DMEM al 2% durante 24 h seguido de DMEM al 2% durante 3 días seguido de Med Dif Nº 2 durante 3 días	37,892	31,818	24,877	31,010	12,208	0,000	0,021
Sin tratamiento en DMEM al 2% durante 24 h seguido de DMEM al 2% durante 7 días	37,045	31,618	24,869	31,010	11,368	0,000	0,038
MG132 1 uM durante 6 h en DMEM al 2%	-	31,818	24,532	31,010	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h en DMEM al 2%	39,237	31,818	25,014	31,010	13,415	0,000	0,009
TSA 2,5 uM durante 6 h en DMEM al 2%	38,428	31,818	24,333	31,010	13,285	0,000	0,010
TSA 2,5 uM durante 24 h en DMEM al 2%	34,854	31,819	24,767	31,010	9,279	0,002	0,161
TSA 2,5 uM durante 6 h seguido de DMEM al 2% durante 7días	37,983	31,818	24,967	31,010	12,209	0,000	0,021
TSA 2,5 uM durante 24 h seguido de DMEM al 2% durante 7días	-	31,818	25,206	31,010	-	-	-

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P13	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN
TSA 2,5 uM durante 6 h seguido de Med Dif Nº 2 durante 7días	37,075	31,818	24,013	31,010	12,255	0,000	0,020
TSA 2,5 uM durante 24 h seguido de Med Dif Nº 2 durante7días	39,025	31,818	24,479	31,010	13,738	0,000	0,007
MG132 1 uM durante 6 h seguido de DMEM al 2% durante 3 días	37,269	31,818	24,908	31,010	11,552	0,000	0,033
MG132 1 uM durante 24 h seguido de DMEM al 2% durante 3 días	-	31,818	24,508	31,010	-	-	-
MG132 1 uM durante 6 h seguido de DMEM al 2% durante 7 días	38,911	31,818	24,958	31,010	13,145	0,000	0,011
MG132 1 uM durante 24 h seguido de DMEM al 2% durante 7 días	38,234	31,818	25,278	31,010	12,150	0,000	0,022
MG132 2,5 uM durante 6 h seguido de DMEM al 2% durante 3 días	38,007	31,818	24,938	31,010	12,263	0,000	0,020

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P13	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN
MG132 2,5 uM durante 24 h seguido de DMEM al 2% durante 3 días	37,901	31,818	25,516	31,010	11,578	0,000	0,033
MG132 1 uM durante 6 h seguido de Med Dif Nº 2 durante 3 días	39,010	31,818	24,845	31,010	13,357	0,000	0,010
MG132 1 uM durante 24 h seguido de Med Dif Nº 2 durante 3 días	-	31,818	24,995	31,010	-	-	-
MG132 1 uM durante 6 h seguido de Med Dif Nº 2 durante 7 días	38,046	31,818	24,548	31,010	12,890	0,000	0,015
MG132 1 uM durante 24 h seguido de Med Dif Nº 2 durante 7 días	38,621	31,818	24,658	31,010	13,157	0,000	0,011
MG132 2,5 uM durante6 h seguido de Med Dif Nº 2 durante 3 días	37,935	31,818	25,791	31,010	11,335	0,000	0,039
MG132 2,5 uM durante 24 h seguido de Med Dif Nº 2 durante 3 días	38,798	31,818	25,194	31,010	12,795	0,000	0,014

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P13	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN
MG132 1 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 6 h	38,120	31,818	23,972	31,010	11,340	0,000	0,039
1 uM MG 132 durante6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	34,479	31,818	24,511	31,010	9,081	0,002	0,187
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 6 h	35,070	31,818	24,518	31,010	9,743	0,001	0,117
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	34,241	31,818	24,438	31,010	8,995	0,002	0,198
1 uM MG 132 durante6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 6 h seguido de DMEM al 2% durante 3 días	38,802	31,818	24,801	31,010	13,183	0,000	0,011
MG132 1 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h seguido de DMEM al 2% durante 3 días	38,746	31,818	24,676	31,010	13,282	0,000	0,010

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P13	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 6 h seguido de DMEM al 2% durante 3 días	38,425	31,818	24,705	31,010		0,000	0,013
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h seguido de DMEM al 2% durante 3 días	37,637	31,818	23,958	31,010	12,871	0,000	0,013
MG132 1 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 6 h seguido de DMEM al 2% durante 7 días	-	31,818	23,831	31,010	-	-	-
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 6 h seguido de DMEM al 2% durante 7 días	38,685	31,818	24,571	31,010	13,306	0,000	0,010

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P13	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h seguido de DMEM al 2% durante 7 días	-	31,818	24,951	31,010	-	-	-
MG132 1 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 6 h seguido de Med Dif Nº 2 durante 3 días	38,550	31,818	25,409	31,010	12,333	0,000	0,019
MG132 1 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h seguido de Med Dif Nº 2 durante 3 días	37,667	31,818	24,583	31,010	12,298	0,000	0,020
MG132 1 uM durante 6 h seguido de TSA 2,5 uM durante 6 h seguido de Med Dif Nº 2 durante 7 días	38,933	31,818	24,777	31,010	13,348	0,000	0,010

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P13	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN
MG132 1 uM durante 8 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h seguido de Med Dif Nº 2 durante 7 días	37,276	31,818	24,170	31,010	12,298	0,000	0,020
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 6 h seguido de Med Dif Nº 2 durante 3 días	38,992	31,818	25,133	31,010	13,052	0,000	0,012
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h seguido de Med Dif Nº 2 durante 3 días	38,771	31,818	28,999	31,010	10,965	0,001	0,050
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 6 h seguido de Med Dif Nº 2 durante 7 días	37,788	31,818	24,870	31,010	12,011	0,000	0,024

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P13	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN
MG132 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h seguido de Med Dif Nº 2 durante 7 días	38,805	31,818	24,862	31,010	13,135	0,000	0,011

TABLA XX. EFECTOS DE UN TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE HDAC Y MG-132 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE PÁNCREAS ADULTO.

Tratamiento cél. H5F3P15: GSI seguido de TSA	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control sin tratar	-	27,909	19,788	25,975	-	-	-	-
GSI-IX 1 uM durante 24 h	-	27,909	20,2	25,975	-	-	-	-
GSI-IX 10 uM durante 24 h	-	27,909	21,3	25,975	-	-	-	-
GSI-X 1 uM durante 24 h	-	27,909	20,645	25,975	-	-	-	-
GSI-X 10 uM durante 24 h	-	27,909	20,151	25,975	-	-	-	-
TSA 1,25 uM durante 24 h	-	27,179	21,658	25,937	-	-	-	-
TSA 2,5 uM durante 24 h	31,020	27,179	20,985	25,937	8,79	0,002	0,23	0,197
GSI-IX 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	33,679	27,179	21,849	25,937	10,6	0,001	0,06	0,217
GSI-IX 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	37,125	27,179	22,004	25,937	13,9	0,000	0,01	1,372

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P15: GSI seguido de TSA	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
GSI-IX 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	31,457	27,179	21,573	25,937	8,64	0,003	0,25	0,094
GSI-IX 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	31,156	27,179	20,99	25,937	8,92	0,002	0,21	0,175
GSI-X 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	36,200	27,179	21,388	25,937	13,6	0,000	0,01	1,84
GSI-X 10 uM durante 24 h seguido TSA 1,25 uM durante 24 h	31,579	27,179	19,682	25,937	10,7	0,001	0,06	0,182
GSI-X 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	30,473	27,179	20,308	25,937	8,92	0,002	0,21	0,252
GSI-X 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	31,243	27,179	20,775	25,937	9,23	0,002	0,17	0,047
Tratamiento cél. H5F3P15: GSI seguido de TSA	**Tc HNF3-β muestra**	**Tc HNF3-β páncreas**	**Tc GAPDH muestra**	**Tc GAPDH páncreas**	**ΔΔTc**	**2^(-ΔΔTc) =CN**	**% CN**	**Error típico**
Control sin tratar	-	26,893	19,788	25,975	-	-	-	-
GSI-IX 1 uM durante 24 h	-	26,893	20,2	25,975	-	-	-	-
GSI-IX 10 uM durante 24 h	-	26,893	21,3	25,975	-	-	-	-
GSI-X 1 uM durante 24 h	-	26,893	20,645	25,975	-	-	-	-

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P15: GSI seguido de TSA	Tc HNF3-β muestra	Tc HNF3-β páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
GSI-X 10 uM durante 24 h	-	26,893	20,151	25,975	-	-	-	-
TSA 1,25 uM durante 24 h	34,563	27,109	21,658	25,937	11,7	0,000	0,03	0,533
TSA 2,5 uM durante 24 h	32,406	27,109	20,985	25,937	10,2	0,001	0,08	0,314
GSI-IX 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	34,082	27,109	21,849	25,937	11,1	0,000	0,05	0,949
GSI-IX 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	34,849	27,109	22,004	25,937	11,7	0,000	0,03	0,428
GSI-IX 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	32,355	27,109	21,573	25,937	9,61	0,001	0,13	0,086
GSI-IX 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	32,290	27,109	20,99	25,937	10,1	0,001	0,09	0,25
GSI-X 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	35,057	27,109	21,388	25,937	12,5	0,000	0,02	
GSI-X 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	31,610	27,109	19,682	25,937	10,8	0,001	0,06	0,05
GSI-X 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	31,889	27,109	20,308	25,937	10,4	0,001	0,07	0,35

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P15: GSI seguido de TSA	**Tc HNF3-β muestra**	**Tc HNF3-β páncreas**	**Tc GAPDH muestra**	**Tc GAPDH páncreas**	**ΔΔTc**	**2^(-ΔΔTc) =CN**	**% CN**	**Error típico**
GSI-X 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	31,866	27,109	20,775	25,937	9,92	0,001	0,10	0,032
Tratamiento cél. H5F3P15: GSI seguido de TSA	**Tc insulina muestra**	**Tc insulina páncreas**	**Tc GAPDH muestra**	**Tc GAPDH páncreas**	**ΔΔTc**	**2^(-ΔΔTc) =CN**	**% CN**	**Error típico**
Control sin tratar	-	15,946	19,788	25,975	-	-	-	-
GSI-IX 1 uM durante 24 h	-	15,946	20,2	25,975	-	-	-	-
GSI-IX 10 uM durante 24 h	-	15,946	21,3	25,975	-	-	-	-
GSI-X 1 uM durante 24 h	-	15,946	20,645	25,975	-	-	-	-
GSI-X 10 uM durante 24 h	-	15,946	20,151	25,975	-	-	-	-
TSA 1,25 uM durante 24 h	-	15,946	21,074	25,975	-	-	-	-
TSA 2,5 uM durante 24 h	-	15,692	21,375	25,975	-	-	-	-
GSI-IX 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	-	15,692	21,849	25,937	-	-	-	-
GSI-IX 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	-	15,692	22,004	25,937	-	-	-	-
GSI-IX 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	15,692	21,573	25,937	-	-	-	-

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P15: GSI seguido de TSA	Tc insulina muestra	Tc insulina páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
GSI-IX 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	15,692	20,99	25,937	-	-	-	-
GSI-X 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	-	15,692	21,388	25,937	-	-	-	-
GSI-X 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	-	15,692	19,682	25,937	-	-	-	-
GSI-X 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	15,692	20,308	25,937	-	-	-	-
GSI-X 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	-	15,692	20,775	25,937	-	-	-	-
Tratamiento cél. H5F3P15: GSI seguido de TSA	**Tc NKX6.1 muestra**	**Tc NKX6.1 páncreas**	**Tc GAPDH muestra**	**Tc GAPDH páncreas**	**ΔΔTc**	**2^(-ΔΔTc) =CN**	**% CN**	**Error típico**
Control sin tratar	-	28,463	19,788	25,975	-	-	-	-
GSI-IX 1 uM durante 24 h	-	28,463	20,2	25,975	-	-	-	-
GSI-IX 10 uM durante 24 h	-	28,463	21,3	25,975	-	-	-	-
GSI-X 1 uM durante 24 h	-	28,463	20,645	25,975	-	-	-	-
GSI-X 10 uM durante 24 h	-	28,463	20,151	25,975	-	-	-	-
TSA 1,25 uM durante 24 h	30,915	29,081	21,658	25,937	6,11	0,014 4	1,44	0,128

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P15: GSI seguido de TSA	Tc NKX6.1 muestra	Tc NKX6.1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
TSA 2,5 uM durante 24 h	31,398	29,081	20,985	25,937	7,27	0,006	0,65	2,977
GSI-IX 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	30,351	29,081	21,849	25,937	5,36	0,024	2,44	0,212
GSI-IX 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	31,283	29,081	22,004	25,937	6,14	0,014	1,42	0,144
GSI-IX 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	29,346	29,081	21,573	25,937	4,63	0,040	4,04	0,108
GSI-IX 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	28,702	29,081	20,99	25,937	4,57	0,042	4,22	0,431
GSI-X 1 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	31,849	29,081	21,388	25,937	7,32	0,006	0,63	0,321
GSI-X 10 uM durante 24 h seguido de TSA 1,25 uM durante 24 h	28,281	29,081	19,682	25,937	5,46	0,023	2,28	0,08
GSI-X 1 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	28,241	29,081	20,308	25,937	4,79	0,036	3,62	0,132
GSI-X 10 uM durante 24 h seguido de TSA 2,5 uM durante 24 h	28,456	29,081	20,775	25,937	4,54	0,043	4,31	0,1

TABLA XXI. EFECTOS DE UN TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE HDAC Y MG-132 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE PÁNCREAS ADULTO

Tratamiento cél. H5F3P16	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Control 1 día no tratado	-	27,825	20,774	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día	-	27,825	20,564	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día	-	27,825	20,693	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día	-	27,825	20,783	24,365	-	-	-	-
Control 2 días no tratado	-	27,825	21,227	24,365	-	-	-	-
JNJ 27652677 5 uM x 1 día	35,239	27,825	22,388	24,365	9,392	1,49E-03	0,149	0,105
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 27652677 1,25 uM x 1 día	33,611	27,825	20,536	24,365	9,615	1,28E-03	0,128	0,245
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 27652677 2,5 uMx x 1 día	34,801	27,825	21,766	24,365	9,576	1,31E-03	0,131	0,012
MG132 1 uM x 1día + JNJ 276526775 uM x 1 día	33,995	27,825	21,092	24,365	9,443	1,44E-03	0,144	0,015
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 27652677 1,25 uM x 1 día	35,160	27,825	24,274	24,365	7,426	5,81 E-03	0,581	0,063
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 27652677 2,5 uM x 1 día	33,393	27,825	21,658	24,365	8,275	3,23E-03	0,323	0,185
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 27652677 5 uM x 1 día	34,363	27,825	22,892	24,365	8,011	3,88E-03	0,388	0,387
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 27652677 1,25 uM x 1 día	34,767	27,825	24,048	24,365	7,259	6,53E-03	0,653	0,023
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 27652677 2,5 uM x 1 día	36,324	27,825	25,043	24,365	7,822	4,42E-03	0,442	0,346
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 5 uM 27652677 x 1 día	35,542	27,825	24,012	24,365	8,070	3,72E-03	0,372	0,070
JNJ 28404844 5 uM x 1 día	35,378	27,825	22,218	24,365	9,700	1,20E-03	0,120	0,175
MG132 1 uM x 1día + JNJ 28404844 1,25 uM x 1 día	33,580	27,825	20,354	24,365	9,766	1,15E-03	0,115	0,083
MG132 1 uM x 1día + JNJ 28404844 2,5 uM x 1 día	33,186	27,825	20,163	24,365	9,563	1,32E-03	0,132	0,005
MG132 1 uM x 1día + JNJ 28404844 5 uM x 1 día	34,044	27,825	21,446	24,365	9,139	1,77E-03	0,177	0,073

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P16	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28404844 1,25 uM x 1 día	35,210	27,825	23,279	24,365	8,470	2,82E-03	0,282	0,406
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28404844 2,5 uM x 1 día	34,830	27,825	23,586	24,365	7,784	4,54E-03	0,454	0,032
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28404844 5 uM x 1 día	34,499	27,825	23,079	24,365	7,959	4,02E-03	0,402	0,222
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 28404844 1,25 uM x 1 día	35,002	27,825	23,845	24,365	7,697	4,82E-03	0,482	0,254
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 28404844 2,5 uM x 1 día	34,394	27,825	23,502	24,365	7,432	5,79E-03	0,579	0,258
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 28404844 5 uM x 1 día	35,563	27,825	23,604	24,365	8,499	2,76E-03	0,276	0,128
JNJ 28543944 5 uM x 1 día	34,746	27,825	21,387	24,365	9,899	1,05E-03	0,105	0,394
MG132 1 uM x 1 día JNJ 28543944 1,25 uM x 1 día	35,545	27,825	23,158	24,365	8,927	2,06E-03	0,206	0,048
MG132 1 uM x1día + JNJ 28543944 2,5 uM x 1 día	35677	27,825	23,075	24,365	9,142	1,77E-03	0,177	0,315 5
MG132 1 uM x 1día + JNJ 28543944 5 uM x 1 día	36,178	27,825	23,144	24,365	9,574	1,31 E-03	0,131	0,379
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28543944 1,25 uM x 1 día	36,310	27,825	24,379	24,365	8,471	2,82E-03	0,282	0,375
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28543944 2,5 uM x 1 día	36,023	27,825	23,992	24,365	8,571	2,63E-03	0,263	0,421
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28543944 5 uM x 1 día	36,257	27,825	24,519	24,365	8,278	3,22E-03	0,322	0,234
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 28543944 1,25 uM x 1 día	36,384	27,825	24,497	24,365	8,427	2,90E-03	0,290	0,276
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 28543944 2,5 uM x 1 día	35,638	27,825	23,767	24,365	8,411	2,94E-03	0,294	0,383
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 28543944 5 uM x 1 día	36,448	27,825	24,846	24,365	8,143	3,54E-03	0,354	0,260
JNJ 28631590 5 uM x 1 día	36,286	27,825	21,874	24,365	10,952	5,05E-04	0,050	0,357

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P16	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
MG132 1 uM x1día + JNJ 28631590 1,25 uM x 1 día	35,219	27,825	22,349	24,365	9,409	1,47E-03	0,147	0,320
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 28631590 2,5 uM x 1día	35,248	27,825	22,024	24,365	9,764	1,15E-03	0,115	0,104
MG132 1 uM x día + JNJ 28631590 5 uM x 1 día	36,724	27,825	22,806	24,365	10,458	7,11E-04	0,071	0,011
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28631590 1,25 uM x 1 día	36,048	27,825	24,140	24,365	8,448	2,86E-03	0,286	0,438
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28631590 2,5 uM x 1 día	35,718	27,825	24,052	24,365	8,206	3,39E-03	0,339	0,273
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28631590 5 uM x 1 día	36,514	27,825	23,948	24,365	9,106	1,81 E-03	0,181	0,006
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 28631590 1,25 uM x 1 día	34,665	27,825	22,838	24,365	8,367	3,03E-03	0,303	0,125
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 28631590 2,5 uM x 1 día	36,250	27,825	23,627	24,365	9,163	1,74E-03	0,174	0,439
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 28631590 5 uM x 1 día	37,978	27,825	26,296	24,365	8,222	3,35E-03	0,335	0,682
JNJ 31040074 5 uM x 1 día	34,586	27,825	20,266	24,365	10,860	5,38E-04	0,054	0,717
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 31040074 1,25 uM x 1 día	35,977	27,825	23,329	24,365	9,188	1,71 E-03	0,171	0,399
MG132 1 uM x1día + JNJ 31040074 2,5 uM x 1 día	35,865	27,825	22,948	24,365	9,457	1,42E-03	0,142	0,379
MG132 1 uM x1día + JNJ 31040074 5 uM x 1 día	36,714	27,825	22,858	24,365	10,397	7,42E-04	0,074	0,076
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 31040074 1,25 uM x 1 día	36,155	27,825	24,389	24,365	8,306	3,16E-03	0,316	0,200
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 31040074 2,5 uM x 1 día	36,221	27,825	23,479	24,365	9,282	1,61 E-03	0,161	0,093
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 31040074 5 uM x 1 día	36,536	27,825	23,897	24,365	9,179	1,72E-03	0,172	0,106
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 31040074 1,25 uM x 1 día	35,878	27,825	23,845	24,365	8,573	2,63E-03	0,263	0,607

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P16	Tc Pdx1 muestra	Tc Pdx1 páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 31040074 2,5 uM x 1 día	36,008	27,825	23,322	24,365	9,226	1,67E-03	0,167	0,132
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 31040074 5 uM x 1 día	36,468	27,825	23,552	24,365	9,457	1,42E-03	0,142	0,358
JNJ 31053854 5 uM x 1 día	33,632	27,825	19,947	24,365	10,225	8,36E-04	0,084	0,185
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 31053854 1,25 uM x 1 día	38,281	27,825	23,493	24,365	11,329	3,89E-04	0,039	0,893
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 31053854 2,5 uM x 1 día	36,741	27,825	23,468	24,365	9,813	1,11E-03	0,111	0,272
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 31053854 5 uM x 1 día	36,485	27,825	22,937	24,365	10,088	9,19E-04	0,092	0,078
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 31053854 1,25 uM x 1 día	36,628	27,825	24,771	24,365	8,397	2,97E-03	0,297	0,321
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 31053854 2,5 uM x 1 día	35,302	27,825	23,764	24,365	8,078	3,70E-03	0,370	0,215
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 5 uM 31053854 x 1 día	35,769	27,825	23,740	24,365	8,569	2,63E-03	0,263	0,234
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 1,25 uM 31053854 x 1 día	36,324	27,825	25,037	24,365	7,826	4,41E-03	0,441	0,001
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 31053854 2,5 uM x 1 día	34,539	27,825	23,207	24,365	7,872	4,27E-03	0,427	0,170
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 31053854 5 uM x 1 día	35,660	27,825	23,908	24,365	8,292	3,19E-03	0,319	0,031
MG132 1 uM x 1 día+ TSA 1,25 uM x 1 día	-	27,825	24,100	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día + TSA 2,5 uM x 1 día	36,059	27,825	23,226	24,365	9,373	1,51 E-03	0,151	0,028
MG132 5 uM x 1 día + TSA 1,25 uM x 1 día	34,793	27,825	23,465	24,365	7,868	4,28E-03	0,428	0,386
MG132 5 uM x 1 día + TSA 2,5 uM x 1 día	35,403	27,825	23,796	24,365	8,148	3,53E-03	0,353	0,551
MG132 10 uM x 1 día + TSA 1,25 uM x 1 día	33,002	27,825	22,010	24,365	7,532	5,40E-03	0,540	0,127
MG132 10 uM x 1 día + TSA 2,5 uM x 1 día	35,353	27,825	23,703	24,365	8,190	3,42E-03	0,342	0,214

TABLA XXII. EFECTOS DE UN TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE HDAC Y MG-132 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE PÁNCREAS ADULTO.

Tratamiento cél. H5F3P16	Tc insulina muestra	Tc insulina páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
Sin tratamiento 1 día control	-	19,401	20,774	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día	-	19,401	20,564	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día	-	19,401	20,693	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día	-	19,401	20,783	24,365	-	-	-	-
Sin tratamiento 2 día control	-	19,401	21,227	24,365	-	-	-	-
JNJ 27652677 5 uM x 1 día	-	19,401	22,388	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 27652677 1,25 uM x 1 día	-	19,401	20,536	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 27652677 2,5 uM x 1 día	-	19,401	21,766	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 27652677 5 uM x 1 día	-	19,401	21,092	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 27652677 1,25 uM 27652677 x 1 día	-	19,401	24,274	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 27652677 2,5 uM 27652677 x 1 día	-	19,401	21,658	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 27652677 5 uM x 1 día	-	19,401	22,892	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 27652677 1,25 uM x 1 día	-	19,401	24,048	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 27652677 2,5 uM x 1 día	-	19,401	25,043	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 27652677 5 uM x 1 día	-	19,401	24,012	24,365	-	-	-	-
JNJ 28404844 5 uM x 1 día	-	19,401	22,218	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 28404844 1,25 uM x 1 día	-	19,401	20,354	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 28404844 2,5 uM x 1 día	-	19,401	20,163	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día+ JNJ 28404844 5 uM x 1 día	-	19,401	21,446	24,365	-	-	-	-

ES 2 369 240 T3

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P16	Tc insulina muestra	Tc insulina páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28404844 1,25 uM x 1 día	-	19,401	23,279	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28404844 2,5 uM x 1 día	-	19,401	23,586	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28404844 5 uM x 1 día	-	19,401	23,079	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1día+JNJ 28404844 1,25 uM x 1 día	-	19,401	23,845	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 28404844 2,5 uM x 1 día	-	19,401	23,502	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 28404844 5 uM x 1 día	-	19,401	23,604	24,365	-	-	-	-
JNJ 28543944 5 uM x 1 día	-	19,401	21,387	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 28543944 1,25 uM x 1 día	-	19,401	23,158	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 28543944 2,5 uM x 1 día	-	19,401	23,075	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 28543944 5 uM x 1 día	-	19,401	23,144	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28543944 1,25 uM x 1 día	-	19,401	24,379	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28543944 2,5 uM x 1 día	-	19,401	23,992	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28543944 5 uM x 1 día	-	19,401	24,519	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 28543944 1,25 uM x 1 día	-	19,401	24,497	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 28543944 2,5 uM x 1 día	-	19,401	23,767	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 28543944 5 uM x 1 día	-	19,401	24,846	24,365	-	-	-	-
JNJ 28631590 5 uM x 1 día	-	19,401	21,874	24,365	-	-	-	-

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P16	Tc insulina muestra	Tc insulina páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 28631590 1,25 uM x 1 día	-	19,401	22,349	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 28631590 2,5 uM x 1 día	-	19,401	22,024	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 28631590 5 uM x 1 día	-	19,401	22,806	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28631590 1,25 uM x 1 día	38,603	19,401	24,140	24,365	19,427	1,42E-06	0,000	0,314
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28631590 2,5 uM x 1 día	-	19,401	24,052	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 28631590 5 uM x 1 día	-	19,401	23,948	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 28631590 1,25 uM x 1 día	-	19,401	22,838	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 28631590 2,5 uM x 1 día	-	19,401	23,627	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 28631590 5 uM x 1 día	-	19,401	26,296	24,365	-	-	-	-
JNJ 31040074 5 uM x 1 día	-	19,401	20,266	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 31040074 1,25 uM x 1 día	38,645	19,401	23,329	24,365	20,280	7,85E-07	0,000	0,413
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 31040074 2,5 uM x 1 día	-	19,401	22,948	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 31040074 5 uM x 1 día	-	19,401	22,858	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 31040074 1,25 uM x 1 día	-	19,401	24,389	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 31040074 2,5 uM x 1 día	-	19,401	23,479	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 31040074 5 uM x 1 día	-	19,401	23,897	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 31040074 1,25 uM x 1 día	-	19,401	23,845	24,365	-	-	-	-

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P16	Tc insulina muestra	Tc insulina páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 31040074 2,5 uM x 1 día	-	19,401	23,322	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 31040074 5 uM x 1 día	-	19,401	23,552	24,365	-	-	-	-
JNJ 31053854 5 uM x 1 día	-	19,401	19,947	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 31053854 1,25 uM x 1 día	-	19,401	23,493	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 31053854 2,5 uM x 1 día	-	19,401	23,468	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día + JNJ 31053854 5 uM x 1 día	-	19,401	22,937	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 31053854 1,25 uM x 1 día	-	19,401	24,771	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 31053854 2,5 uM x 1 día	38,070	19,401	23,764	24,365	19,270	1,58E-06	0,000	0,222
MG132 5 uM x 1 día + JNJ 31053854 5 uM x 1 día	-	19,401	23,740	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 31053854 1,25 uM x 1 día	-	19,401	25,037	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 31053854 2,5 uM x 1 día	-	19,401	23,207	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día + JNJ 31053854 5 uM x 1 día	-	19,401	23,908	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x1día+ TSA 1,25 uM x 1 día	-	19,401	24,100	24,365	-	-	-	-
MG132 1 uM x 1 día + TSA 2,5 uM x 1 día	-	19,401	23,226	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1día+ TSA 1,25 uM x 1 día	-	19,401	23,465	24,365	-	-	-	-
MG132 5 uM x 1 día + TSA 2,5 uM x 1 día	-	19,401	23,796	24,365	-	-	-	-
MG132 10 uM x 1 día + TSA 1,25 uM x 1 día	-	19,401	22,010	24,365	-	-	-	-

(continuación)

Tratamiento cél. H5F3P16	Tc insulina muestra	Tc insulina páncreas	Tc GAPDH muestra	Tc GAPDH páncreas	ΔΔTc	2^(-ΔΔTc) =CN	% CN	Error típico
MG132 10 uM x 1día+ TSA 2,5 uM x 1 día	-	19,401	23,703	24,365	-	-	-	-

TABLA XXIII. EFECTOS DE UN TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE HDAC Y UN AGENTE DE DESMETILACIÓN DE ADN SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO.

Tratamiento cél. AFCA010-B-P8	Tc Pdx1	CN Pdx1	Tc HNF3-β	CN HNF3-β
sin tratamiento	nd		nd	
5-AZA 0,156 uM	nd		nd	
5-AZA 0,3125 uM	nd		nd	
5-AZA 0,625 uM	nd		nd	
5-AZA 1,25 uM	nd		nd	
5-AZA 2,5 uM	nd		nd	
TSA 1,25 uM	35,318	0,001	34,029	0,001
Control páncreas humano	30,342	1,000	29,054	1,000

TABLA XXIV. EFECTOS DE UN TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE HDAC Y UN AGENTE DE DESMETILACIÓN DE ADN SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO.

Tratamiento cél. AFCA010-B-P8	Tc Pdx1	CN Pdx1	Tc HNF3-β	CN HNF3-β
sin tratamiento	nd		nd	
5-AZA 0,156 uM	nd		nd	
5-AZA 0,3125 uM	nd		nd	
5-AZA 0,625 uM	nd		nd	
5-AZA 1,25 uM	nd		nd	
5-AZA 2,5 uM	nd		nd	
TSA 1,25 uM	35,318	0,001	34,029	0,001
TSA 1,25 uM con 5-AZA 0,156 uM	34,469	0,002	33,734	0,001
TSA 1,25 uM con 5-AZA 0,3125 uM	34,415	0,002	33,598	0,001
TSA 1,25 uM con 5-AZA 0,625 uM	34,117	0,003	33,600	0,002
TSA 1,25 uM con 5-AZA 1,25 uM	33,347	0,002	33,347	0,003
TSA 1,25 uM con 5-AZA 2,5 uM	33,231	0,002	33,061	0,001
Control páncreas humano	30,342	1,000	29,054	1,000

TABLA XXV. EFECTOS DE UN TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE HDAC Y UN AGENTE DE DESMETILACIÓN DE ADN SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE LÍQUIDO AMNIÓTICO.

Tratamiento cél. AFCA010-B-P12		**Tc Pdx1**	**CN Pdx1**	**Tc HNF3-β**	**CN HNF3-β**
Parte 1 (0-6 h)	**Parte 2 (7-24 h)**				
sin tratamiento	sin tratamiento	nd		nd	
TSA 1,25 uM	TSA 1,25 uM	34,427	9,94E-04	32,522	0,002
TSA 2,5 uM	TSA 2,5 uM	31,145	0,011	31,144	0,006
5-AZA 2,5 uM	5-AZA 2,5 uM	nd		nd	
5-AZA 5,0 uM	5-AZA 5,0 uM	nd		nd	
5-AZA 2,5 uM	TSA 1,25 uM	32,52	0,004	31,242	0,005
5-AZA 2,5 uM	TSA 2,5 uM	30,515	0,013	30,348	0,008
5-AZA 5,0 uM	TSA 1,25 uM	35,241	0,001	32,451	0,002
5-AZA 5,0 uM	TSA 2,5 uM	30,543	0,013	29,853	0,012
Control páncreas humano		28,802	1,000	27,962	1,000

Las publicaciones citadas a lo largo del presente documento se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. Aunque anteriormente se han ilustrado los diversos aspectos de la presente invención con referencia a ejemplos y realizaciones preferidas, se apreciará que el alcance de la invención no solo se define por la descripción anterior, sino mediante las siguientes reivindicaciones construidas de acuerdo con los principios de la ley de patentes.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para aumentar la expresión de PDX-1 en las células, que comprende las etapas de:

a. Proporcionar las células, y
b. Poner en contacto las células con al menos un agente de remodelación de cromatina, en el que el al menos un agente de remodelación de cromatina aumenta la expresión de PDX-1 en las células.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células se seleccionan del grupo que consiste en una célula no diferenciada, una célula parcialmente diferenciada, una célula totalmente diferenciada, una célula madre y una célula progenitora.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que antes del tratamiento con el al menos un agente de remodelación de cromatina las células no expresaban PDX-1.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el tratamiento de al menos un agente de remodelación de cromatina restablece la expresión de PDX-1.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos un agente de remodelación de cromatina es un inhibidor de la actividad histona desacetilasa.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en butiratos, ácidos hidroxámicos, péptidos cíclicos y benzamidas.

7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en ácido valproico, 4-fenilbutirato, butirato de sodio, tricostatina A, ácido suberoil anilida hidroxámico (SAHA), oxamflatina, trapoxina B, FR901228, apicidina, clamidocina, depuecina, escriptaida, depsipéptido y N-acetildinalina.

8. Un procedimiento *in vitro* para promover la diferenciación de células en una célula progenitora pancreática, que comprende las etapas de:

a. Proporcionar células que no expresen PDX-1, y
b. Poner en contacto las células con al menos un agente de remodelación de cromatina, en el que el al menos un agente de remodelación de cromatina aumente la expresión de PDX-1.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el tratamiento de las células con el al menos un agente de remodelación de cromatina produce el aumento en la expresión de al menos uno de los genes de HNF-3 beta o Sox-17.

10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que las células se seleccionan del grupo que consiste en una célula no diferenciada, una célula parcialmente diferenciada, una célula totalmente diferenciada, una célula madre y una célula progenitora.

11. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que antes del tratamiento con el al menos un agente de remodelación de cromatina las células no expresaban PDX-1.

12. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el tratamiento de al menos un agente de remodelación de cromatina restablece la expresión de PDX-1.

13. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el al menos un agente de remodelación de cromatina es un inhibidor de la actividad histona desacetilasa.

14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en butiratos, ácidos hidroxámicos, péptidos cíclicos y benzamidas.

15. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en ácido valproico, 4-fenilbutirato, butirato de sodio, tricostatina A, ácido suberoil anilida hidroxámico (SAHA), oxamflatina, trapoxina B, FR901228, apicidina, clamidocina, depuecina, escriptaida, depsipéptido y N-acetildinalina.

16. Un procedimiento *in vitro* para promover la diferenciación de células en una célula secretora de hormonas pancreáticas, que comprende las etapas de:

a. Proporcionar células que no expresen PDX-1, y
b. Poner en contacto las células con al menos un agente de remodelación de cromatina, en el que el agente de remodelación de cromatina aumente la expresión de PDX-1.

17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el tratamiento de las células con el al menos un agente de remodelación de cromatina provoca aumentos en la expresión de al menos uno de los genes de HNF-3 beta, Sox-17, insulina, glucagón o somatostatina.

18. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que las células se seleccionan del grupo que consiste en una célula no diferenciada, una célula parcialmente diferenciada, una célula totalmente diferenciada, una célula madre y una célula progenitora.

19. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que antes del tratamiento con el al menos un agente de remodelación de cromatina las células no expresaban PDX-1.

20. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el tratamiento de al menos un agente de remodelación de cromatina restablece la expresión de PDX-1.

21. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el al menos un agente de remodelación de cromatina es un inhibidor de la actividad de histona desacetilasa.

22. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en butiratos, ácidos hidroxámicos, péptidos cíclicos y benzamidas.

23. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en ácido valproico, 4-fenilbutirato, butirato de sodio, tricostatina A, ácido suberoil anilida hidroxámico (SAHA), oxamflatina, trapoxina B, FR901228, apicidina, clamidocina, depuecina, escriptaida, depsipéptido y N-acetildinalina.

Figura 1

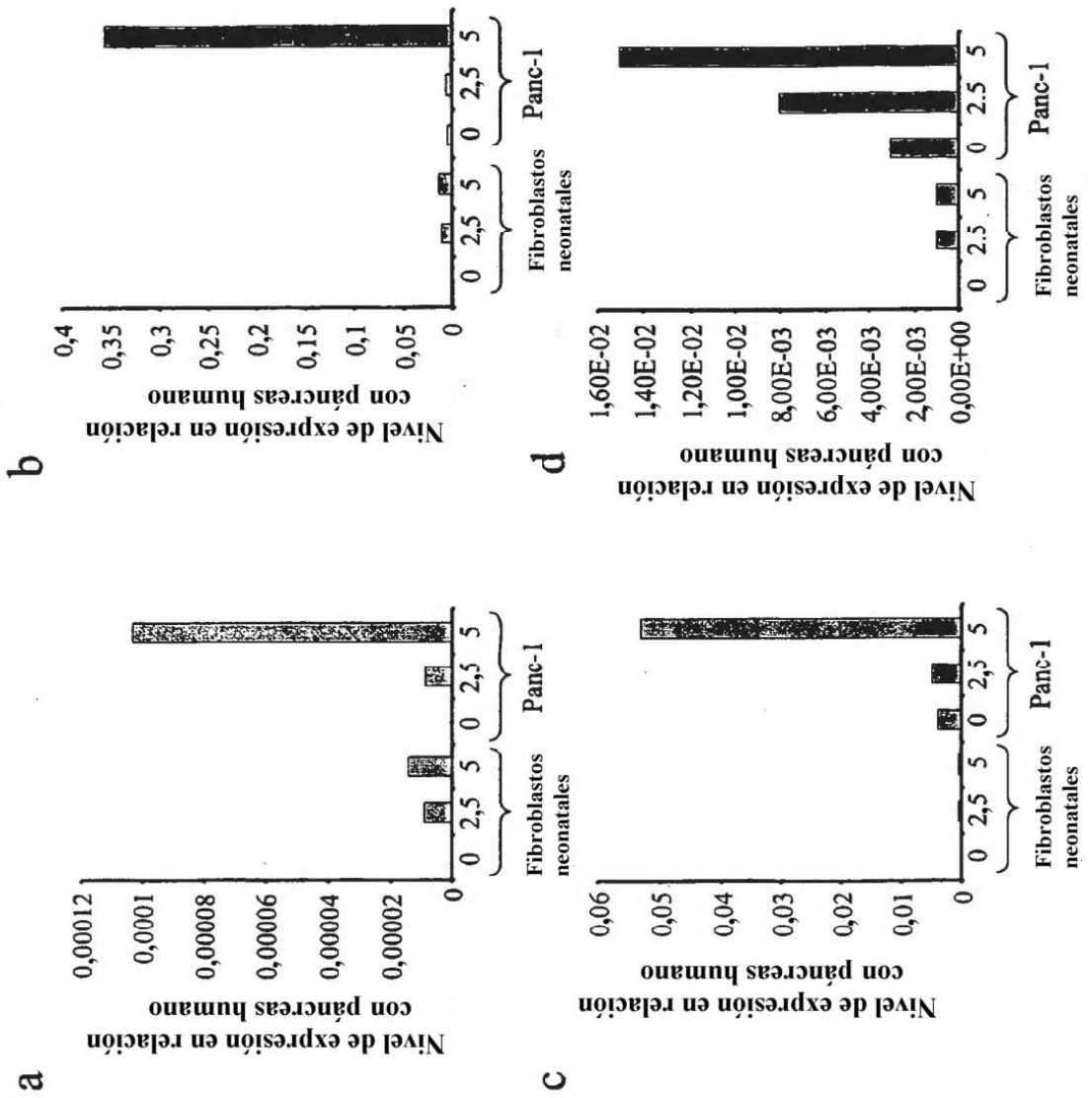

a
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
0,00012
0,0001
0,00008
0,00006
0,00004
0,00002
0
0 2,5 5 0 2,5 5
Fibroblastos neonatales
Panc-1
b
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
0 2,5 5 0 2,5 5
Fibroblastos neonatales
Panc-1
c
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0
0 2,5 5 0 2,5 5
Fibroblastos neonatales
Panc-1
d
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
1,60E-02
1,40E-02
1,20E-02
1,00E-02
8,00E-03
6,00E-03
4,00E-03
2,00E-03
0,00E+00
0 2,5 5 0 2,5 5
Fibroblastos neonatales
Panc-1

Figura 2

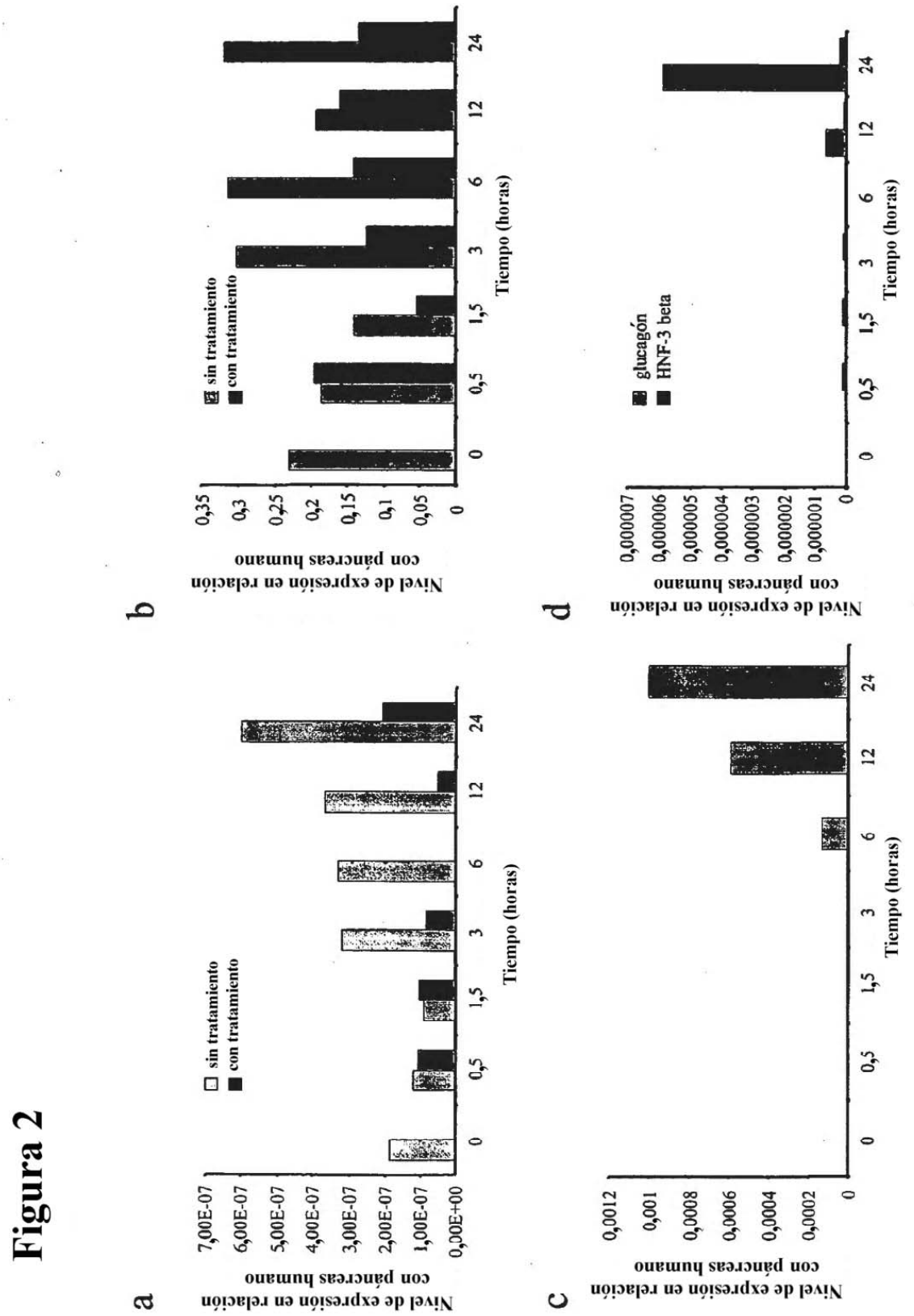

a
sin tratamiento
con tratamiento
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
Tiempo (horas)
7,00E-07
6,00E-07
5,00E-07
4,00E-07
3,00E-07
2,00E-07
1,00E-07
0,00E+00
0
0,5
1,5
3
6
12
24
b
sin tratamiento
con tratamiento
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
Tiempo (horas)
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
c
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
Tiempo (horas)
0,0012
0,001
0,0008
0,0006
0,0004
0,0002
d
glucagón
HNF-3 beta
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
Tiempo (horas)
0,000007
0,000006
0,000005
0,000004
0,000003
0,000002
0,000001

Figura 3

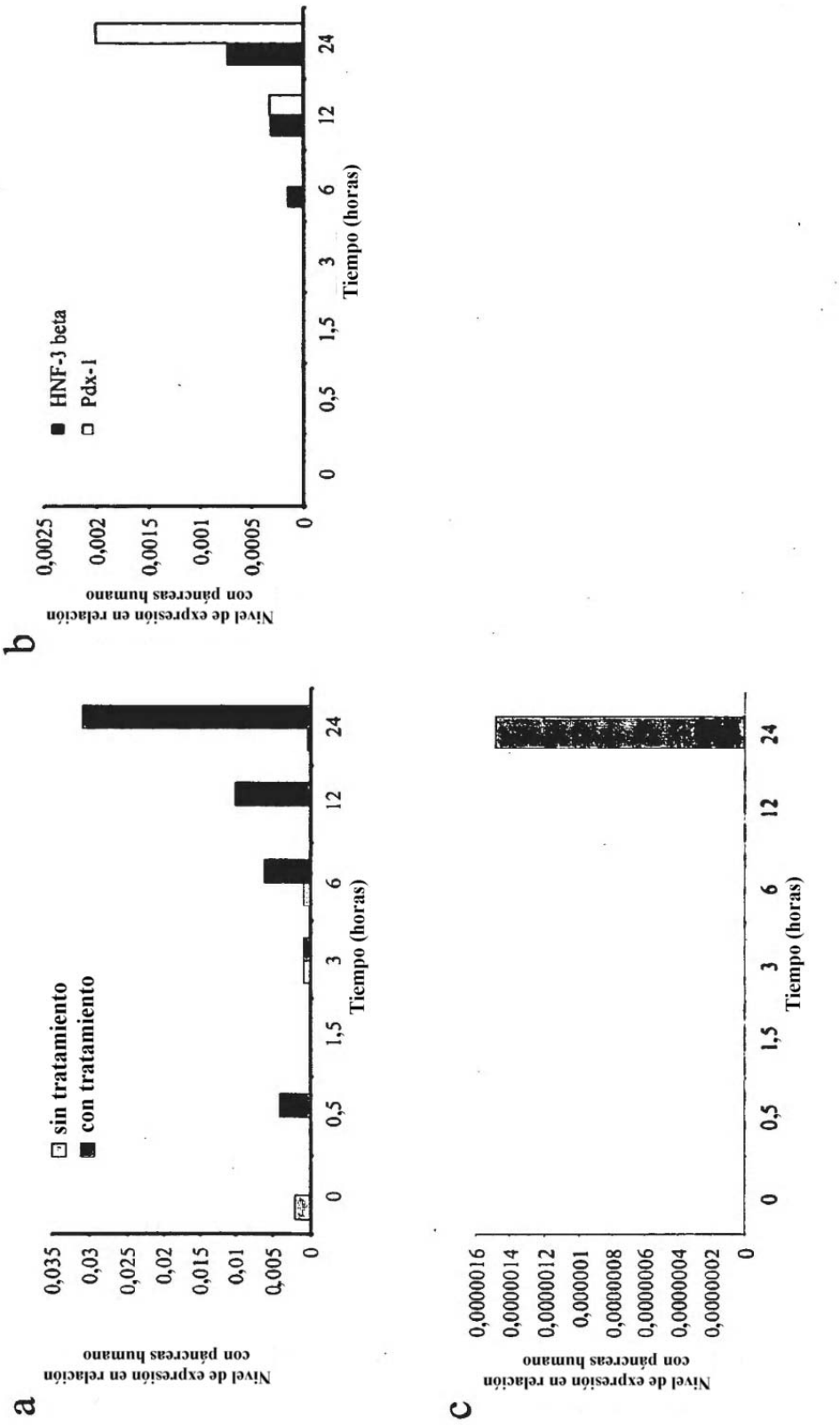

a
sin tratamiento
con tratamiento
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
Tiempo (horas)
b
HNF-3 beta
Pdx-1
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
Tiempo (horas)
c
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
Tiempo (horas)

Figura 4

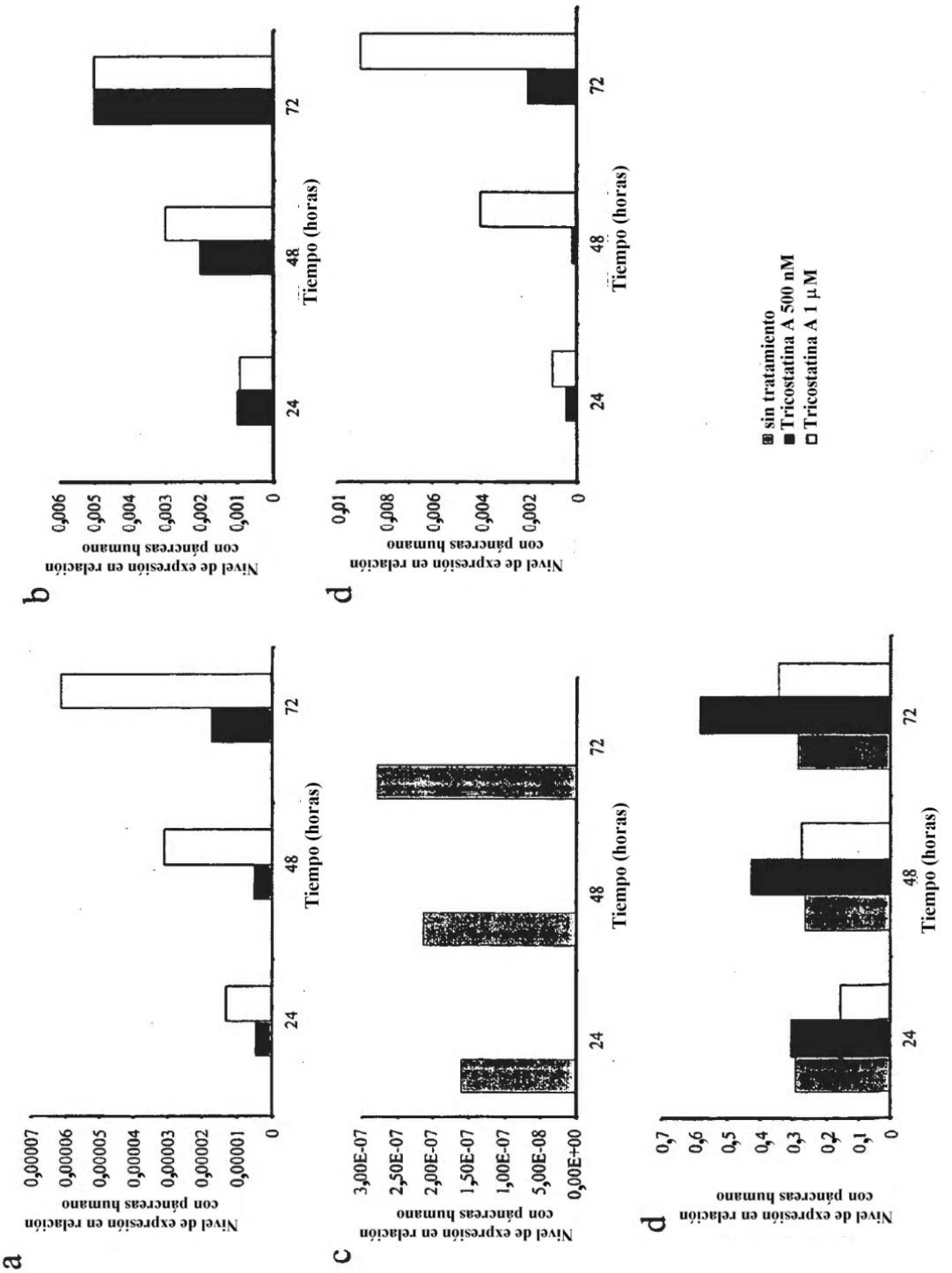

a
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
0,00007
0,00006
0,00005
0,00004
0,00003
0,00002
0,00001
0
24
48
72
Tiempo (horas)
b
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
0,006
0,005
0,004
0,003
0,002
0,001
0
24
48
72
Tiempo (horas)
c
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
3,00E-07
2,50E-07
2,00E-07
1,50E-07
1,00E-07
5,00E-08
0,00E+00
24
48
72
Tiempo (horas)
d
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
0,01
0,008
0,006
0,004
0,002
0
24
48
72
Tiempo (horas)
d
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
24
48
72
Tiempo (horas)
sin tratamiento
Tricostatina A 500 nM
Tricostatina A 1 µM

Figura 5

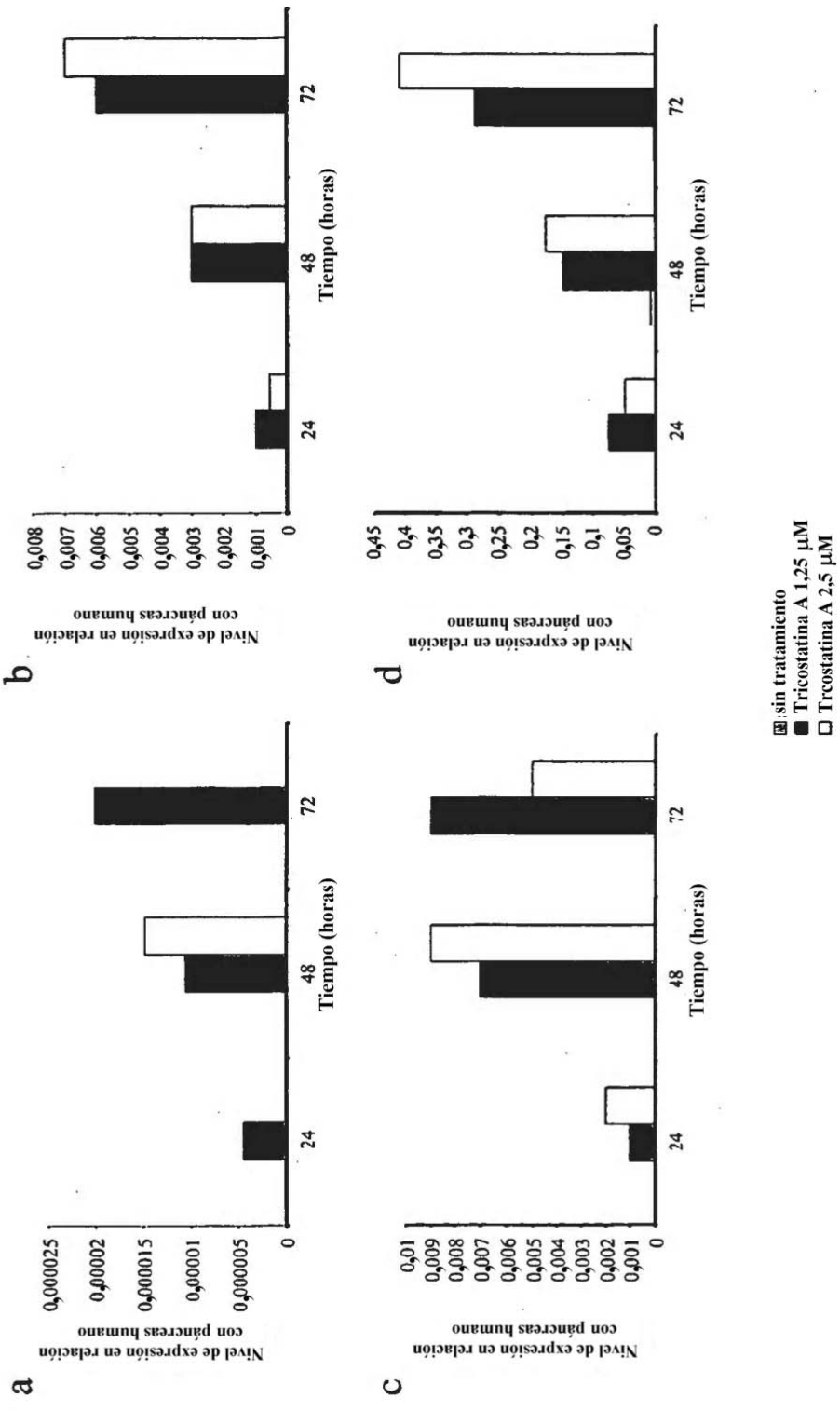

a
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
0,000025
0,00002
0,000015
0,00001
0,000005
0
24
48
72
Tiempo (horas)
b
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
0,008
0,007
0,006
0,005
0,004
0,003
0,002
0,001
0
24
48
72
Tiempo (horas)
c
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
0,01
0,009
0,008
0,007
0,006
0,005
0,004
0,003
0,002
0,001
0
24
48
72
Tiempo (horas)
d
Nivel de expresión en relación con páncreas humano
0,45
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
24
48
72
Tiempo (horas)
sin tratamiento
Tricostatina A 1,25 µM
Trcostatina A 2,5 µM

Figura 6

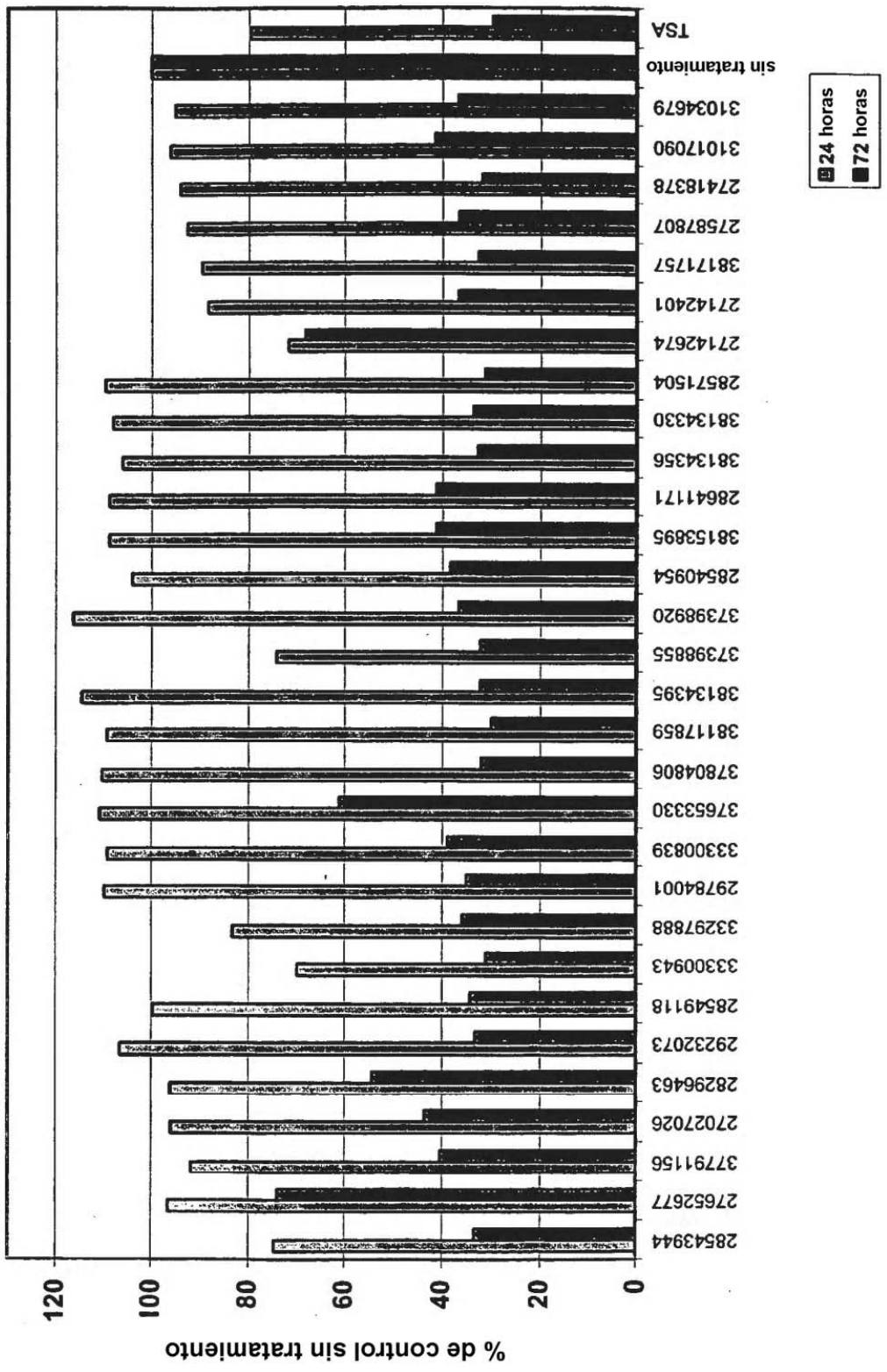

% de control sin tratamiento
0
20
40
60
80
100
120
24 horas
72 horas
TSA
sin tratamiento
3103467 9
3101709 0
2741837 8
2758780 7
3817175 7
2714240 1
2714267 4
2857150 4
3813433 0
3813435 6
2864117 1
3815389 5
2854095 4
3739892 0
3739885 5
3813439 5
3811785 9
3780480 6
3765333 0
3330083 9
2978400 1
3329788 8
3330094 3
2854911 8
2923207 3
2829646 3
2702702 6
3779115 6
2765267 7
2854394 4

Figura 7

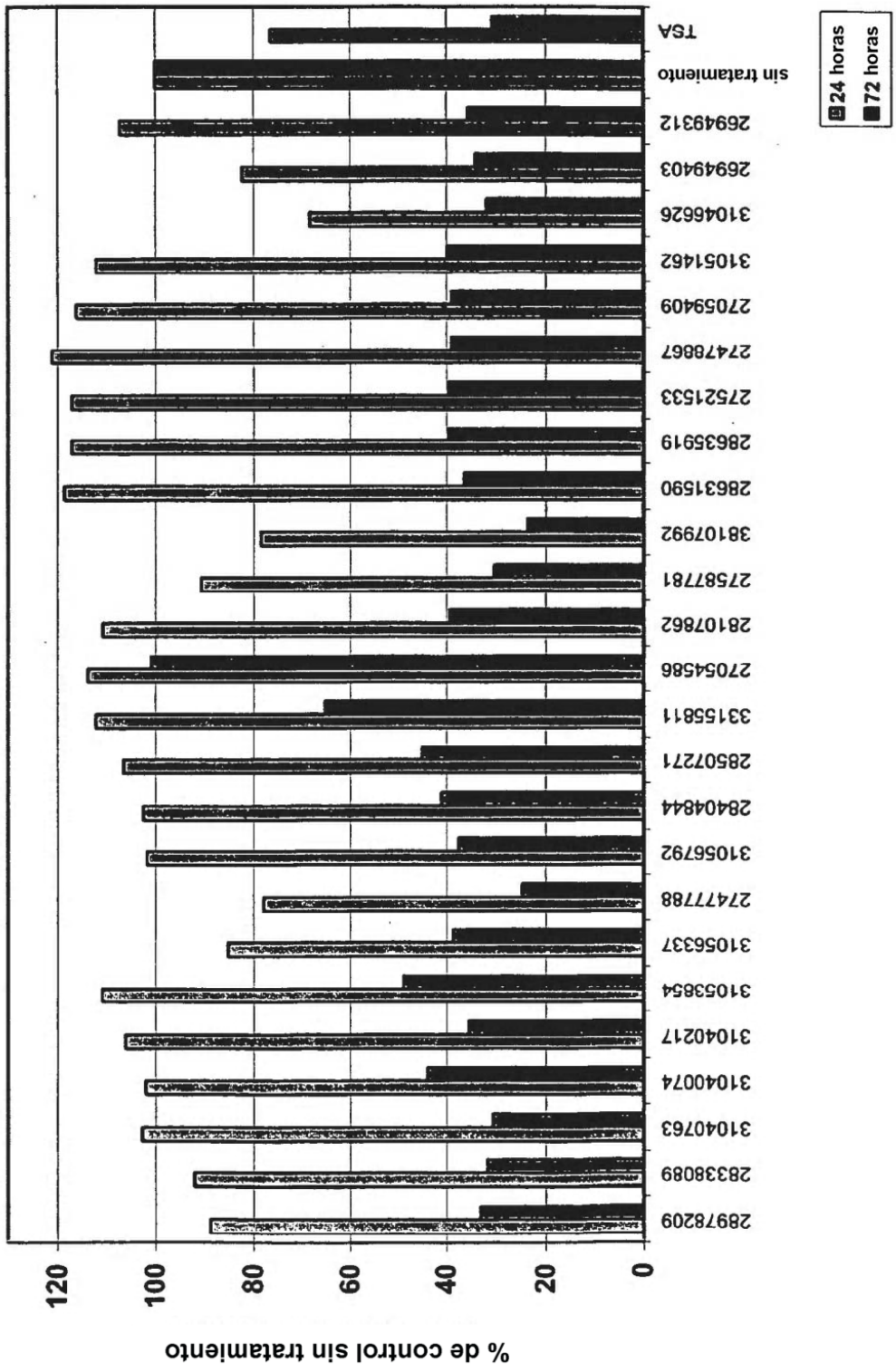

24 horas
72 horas
TSA
sin tratamiento
2694931 2
2694940 3
3104662 6
3105146 2
2705940 9
2747886 7
2752153 3
2863591 9
2863159 0
3810799 2
2758778 1
2810786 2
2705458 6
3315581 1
2850727 1
2840484 4
3105679 2
2747778 8
3105633 7
3105385 4
3104021 7
3104007 4
3104076 3
2833808 9
2897820 9
% de control sin tratamiento
0
20
40
60
80
100
120

Figura 8

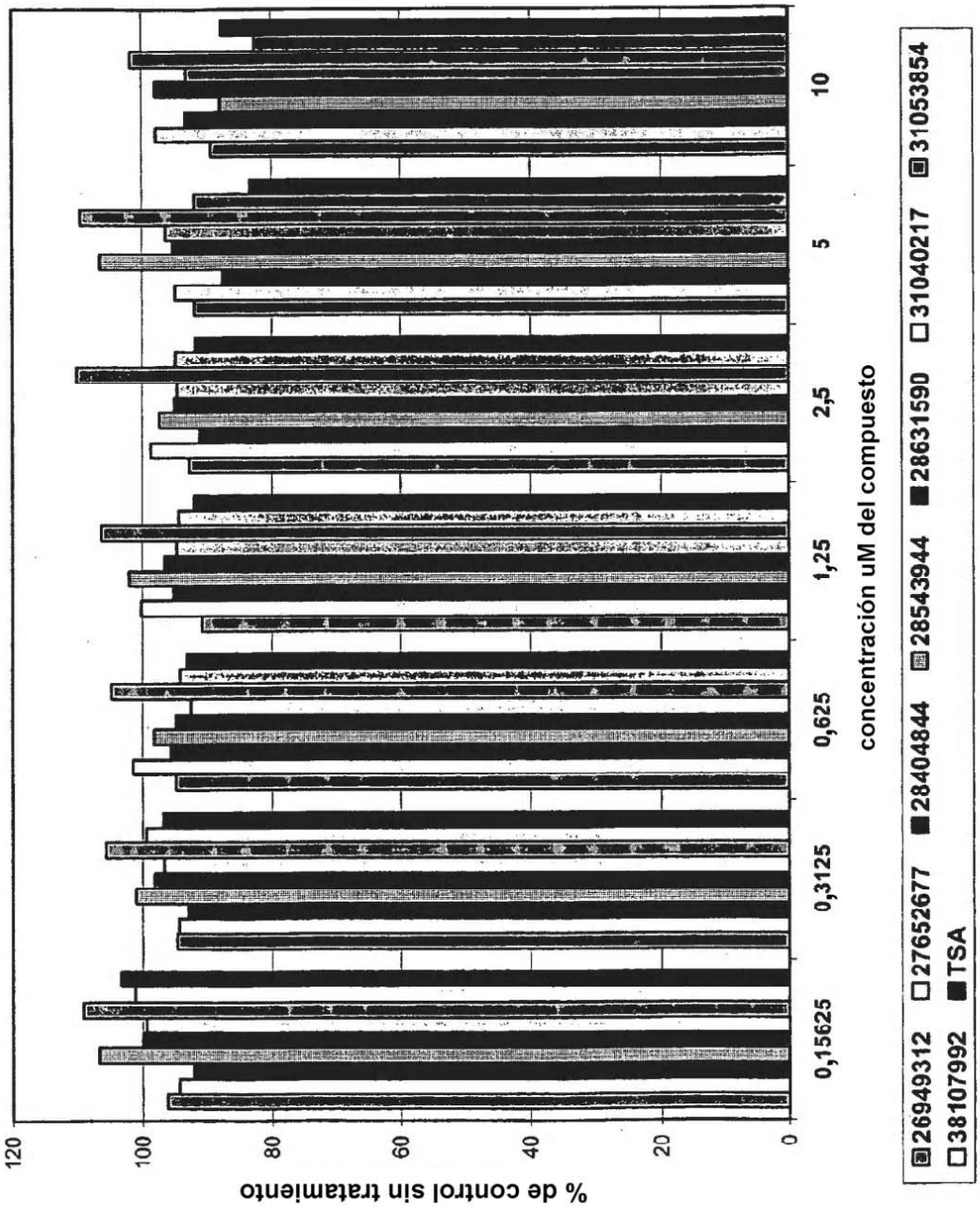

% de control sin tratamiento
120
100
80
60
40
20
0
0,15625
0,3125
0,625
1,25
2,5
5
10
concentración uM del compuesto
26949312
27652677
28404844
28543944
28631590
31040217
31053854
38107992
TSA

Figura 9

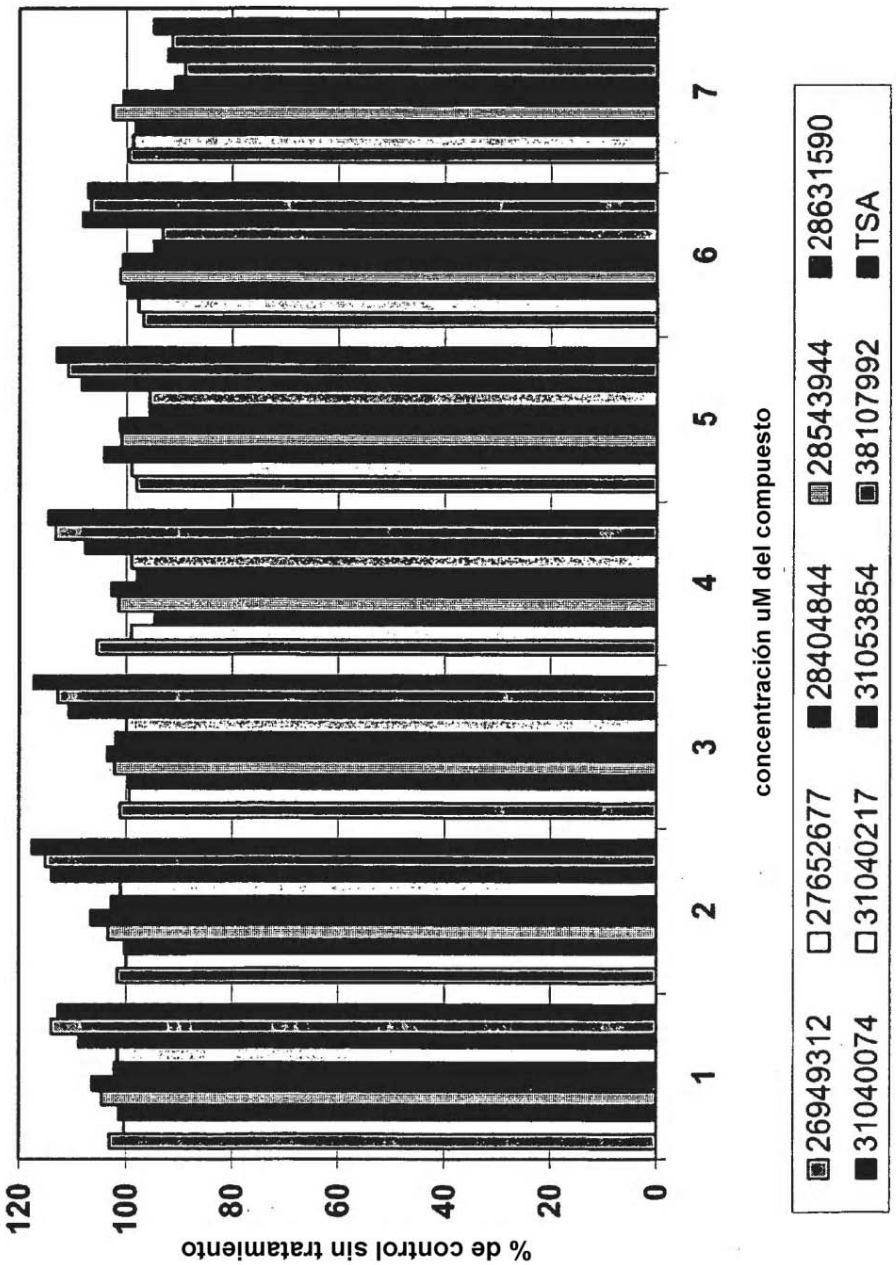

% de control sin tratamiento
120
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
5
6
7
concentración uM del compuesto
26949312
27652677
28404844
28543944
28631590
31040074
31040217
31053854
38107992
TSA

Figura 10

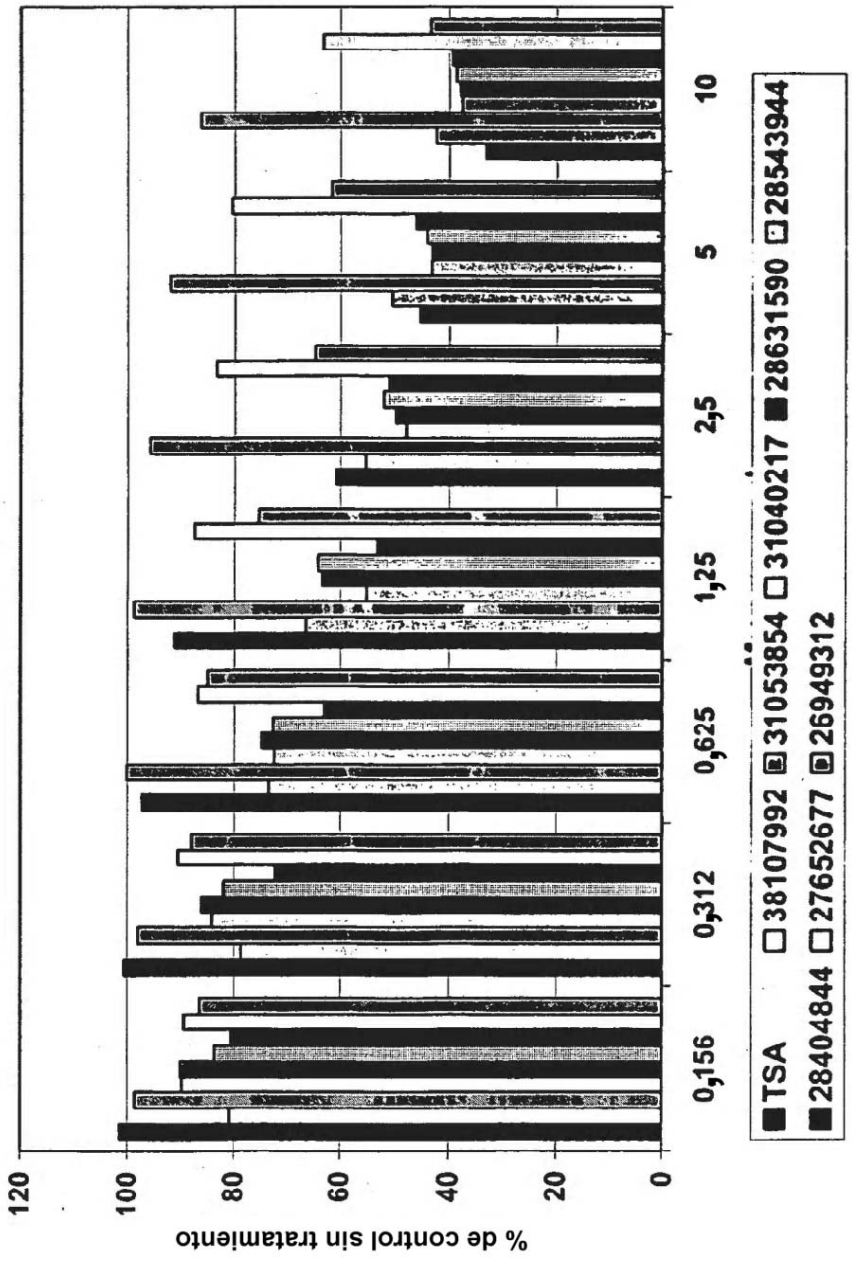

% de control sin tratamiento
120
100
80
60
40
20
0
0,156
0,312
0,625
1,25
2,5
5
10
TSA
38107992
31053854
31040217
28631590
28543944
28404844
27652677
26949312

Figura 11

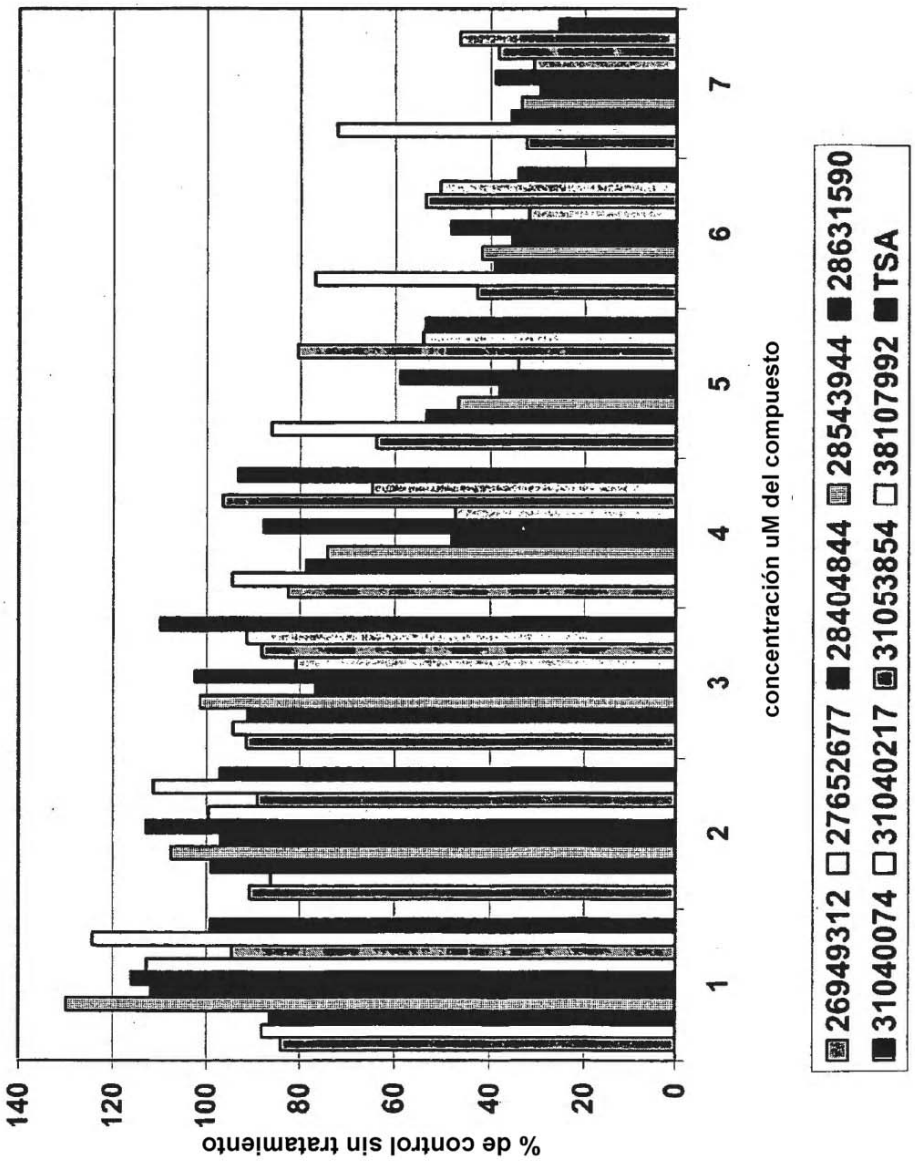
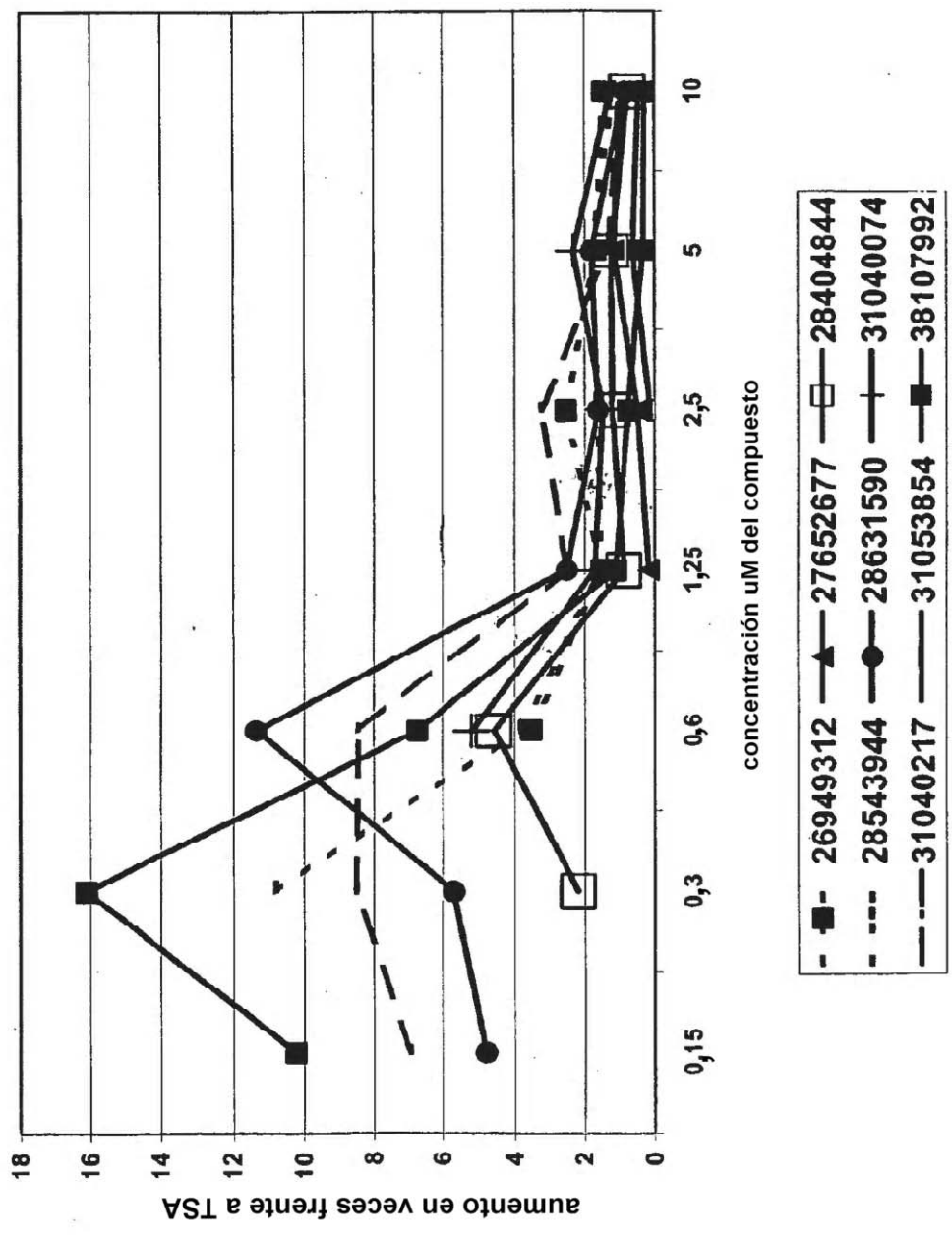

% de control sin tratamiento
0
20
40
60
80
100
120
140
1
2
3
4
5
6
7
concentración uM del compuesto
26949312
27652677
28404844
28543944
28631590
31040074
31040217
31053854
38107992
TSA

Figura 12


aumento en veces frente a TSA
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
0,15
0,3
0,6
1,25
2,5
5
10
concentración uM del compuesto
26949312
27652677
28404844
28543944
28631590
31040074
31040217
31053854
38107992