



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Generación de un modelo de silenciamiento del gen  
HDAC1

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Lillo Valero, Manuel

Tutor/a: Porcel Roldán, Rosa Caridad

Cotutor/a externo: PUCHADES CARRASCO, LEONOR

Director/a Experimental: GOMEZ CEBRIAN, NURIA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior  
de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i  
del Medi Natural

---

# Generación de un modelo de silenciamiento del gen *HDAC1*

---

Trabajo Fin de Grado

**Grado en Biotecnología**

**Autor:** Lillo Valero, Manuel

**Tutora:** Porcel Roldán, Rosa Caridad

**Cotutora externa:** Puchades Carrasco, Leonor

**Directora experimental:** Gómez Cebrián, Nuria

**Curso académico:** 2022/2023

Valencia, 14 de julio de 2023



# Generación de un modelo de silenciamiento del gen *HDAC1*

## RESUMEN

---

En las últimas décadas se han aportado múltiples evidencias que demuestran que el cáncer no es sólo una enfermedad de carácter genético, sino que los mecanismos epigenéticos también son esenciales para regular diversos aspectos de la biología de este conjunto de enfermedades. De hecho, en el último año, la reprogramación epigenética no mutacional se ha establecido como un nuevo *hallmark* del cáncer. En este contexto, un aspecto esencial es la remodelación de la cromatina, que se produce principalmente por modificaciones covalentes de las histonas, como la metilación o la acetilación. La acetilación es un proceso reversible controlado por las histonas acetiltransferasas (HATs) y las histonas deacetilasas (HDACs). Además, diversos estudios han relacionado alteraciones en el proceso de acetilación, junto con una sobreexpresión de las HDACs, con el desarrollo y la progresión del cáncer. Por ello, los moduladores epigenéticos constituyen una diana muy investigada para el desarrollo de fármacos. Un ejemplo son los inhibidores de las HDACs (iHDACs), que han demostrado ser efectivos para el tratamiento de numerosos tipos de cáncer. Sin embargo, presentan ciertas limitaciones, entre las que se encuentra su limitada eficacia en tumores sólidos así como efectos adversos severos y perfiles tóxicos. En este sentido, el estudio de los cambios en la señalización celular directamente relacionados con variaciones en la actividad de distintas HDACs podría ayudar a comprender mejor los mecanismos de acción de este tipo de tratamientos y a la identificación de nuevas potenciales dianas terapéuticas.

El objetivo principal planteado en este trabajo ha sido el estudio de posibles rutas de señalización reguladas por HDAC1 en cáncer. Para ello, se generó un modelo de silenciamiento de dicho gen mediante infección lentiviral para poder analizar el efecto de la inhibición de *HDAC1* sobre reguladores oncogénicos celulares, entre los que destaca PTEN por su papel como supresor tumoral.

Tras la infección, se validó el efecto del silenciamiento sobre los niveles de ARNm y proteína con el fin de confirmar una disminución significativa de los niveles de HDAC1 en el modelo generado. Este modelo ha permitido determinar que el efecto del silenciamiento de HDAC1 sobre PTEN no se produce a nivel transcripcional, sino a nivel postraduccional. Los resultados obtenidos sugieren que la diferencia observada en los niveles de proteína de PTEN tras el silenciamiento podrían estar provocados por una alteración sobre alguna modificación postraduccional, específicamente con la regulación de la acetilación por HDAC1. Con el objetivo de confirmar esta hipótesis, se evaluó si se producía un aumento de los niveles totales de acetilación tras el silenciamiento de *HDAC1*. Los resultados mostraron que, a nivel celular, el silenciamiento de *HDAC1* provoca un aumento en los niveles de acetilación total. Serán necesarios futuros experimentos para poder determinar si los cambios en los niveles de PTEN son debidos a diferencias en la acetilación de PTEN y, en todo caso, si esos cambios en los niveles de acetilación pueden afectar a la actividad, localización subcelular y/o estabilidad de la proteína.

Este trabajo se relaciona con los siguientes ODS de la Agenda 2030: ODS 3. Salud y Bienestar.

**Palabras clave:** Cáncer; Desarrollo de fármacos; Histona deacetilasa 1 (HDAC1); Infección lentiviral; Señalización oncogénica

**Autor:** D. Manuel Lillo Valero

**Localidad y fecha:** Valencia, julio 2023

**Tutor académico:** Prof. D<sup>a</sup>. Rosa Caridad Porcel Roldán

**Cotutora:** D<sup>a</sup> Leonor Puchades Carrasco

**Directora experimental:** D<sup>a</sup> Nuria Gómez Cebrián

## Generation of a gene silencing model for *HDAC1*

### ABSTRACT

---

In the last decades, considerable evidence has been shown that cancer is not only a genetic disease but that epigenetic mechanisms are also essential to regulate many characteristics of the biology of this set of diseases. In fact, last year, non-mutational epigenetic reprogramming established itself as a new hallmark of cancer. In this context, a key aspect is chromatin remodeling, which occurs mainly by covalent modifications of histones, such as methylation or acetylation. Acetylation is a reversible process controlled by histones acetyltransferases (HATs) and histones deacetylases (HDACs). Besides, several studies have linked alterations in the acetylation process, alongside an overexpression of HDACs, to the development and progression of cancer. Therefore, epigenetic modulators are a highly investigated target for drug development. One example is HDAC inhibitors (HDACi), which have been shown to be effective in treating numerous types of cancer. Nonetheless, they have certain limitations, including limited efficacy against solid tumors and severe adverse effects and toxic profiles. In this regard, studying changes in cell signaling directly related to variations in the activity of different HDACs could help better understand the mechanisms of action of this type of treatment and identify new potential therapeutic targets.

The main aim of this work has been the study of possible signaling pathways regulated by HDAC1 in cancer. For this purpose, a silencing model of this gene was generated by lentiviral infection to analyze the effect of *HDAC1* inhibition on cellular oncogenic regulators, among which PTEN stands out for its role as a tumor suppressor.

After the infection, the effect of silencing on mRNA and protein levels was validated to confirm a significant decrease in HDAC1 levels in the generated model. This model has allowed us to determine that the effect of *HDAC1* silencing on PTEN does not occur at a transcriptional level but at the posttranslational level. These results suggest that the difference in PTEN protein levels after silencing could be caused by an alteration in some posttranslational modification, specifically with the regulation of acetylation by HDAC1. In order to confirm this hypothesis, we evaluated whether there was an increase in total acetylation levels after *HDAC1* silencing. The results showed that, at the cellular level, *HDAC1* silencing causes an increase in total acetylation levels. Further experiments will be necessary to determine whether the changes in PTEN levels are due to differences in PTEN acetylation and, if so, whether these changes in acetylation levels can affect the protein's activity, subcellular localization, and stability.

This work relates to the 2030 Agenda's SDG 3: good health and well-being.

**Keywords:** Cancer; Drug development; Histone deacetylase 1 (HDAC1); Lentiviral infection; Oncogenic signaling

**Author:** Manuel Lillo Valero

**Location and date:** Valencia, July 2023

**Academic tutor:** Rosa Caridad Porcel Roldán

**Co-tutor:** Leonor Puchades Carrasco

**Experimental director:** Nuria Gómez Cebrián

## AGRADECIMIENTOS

---

En primer lugar, me gustaría agradecer a Leonor Puchades, mi tutora externa, por haberme dado la oportunidad de realizar esta estancia en su grupo de investigación y guiar mi primera experiencia en el mundo de la investigación. Ha sido verdaderamente inspiradora. También a mi tutora académica, Rosa Porcel, que además de ser una profesora admirable, me ha mostrado su apoyo y atención en todo momento para resolver mis dudas.

A Nuria Gómez, por su infinita paciencia y dedicación por enseñarme todo este tiempo, por animarme cuando las cosas no han salido bien y hacerme ver que con esfuerzo todo se puede conseguir. Ha sido un placer haber podido aprender de ti. A todos los compañeros que han pasado por el laboratorio estos meses. En especial, a Dani, Inés y María, con los que tantas horas he compartido. Gracias por haber hecho mi estancia mucho más llevadera, me lo he pasado genial a vuestro lado.

He conocido a mucha gente estos últimos cuatro años y he tenido la suerte de haber vivido momentos increíbles con todos ellos. Aun así, haber coincidido con Alberto, Adrián, Claudia, Gloria y Marc ha sido lo mejor que me ha pasado en la universidad. Gracias por estos años, por el apoyo, por haberme hecho vivir momentos inolvidables pero, sobre todo, por estar ahí en los días más duros y difíciles. Os habéis convertido en una parte fundamental de mi vida, y sé con seguridad que esto sólo ha sido el inicio de un largo camino juntos.

También a Paula, por confiar siempre en mí, por motivarme a seguir y por haberme acompañado durante muchos años en todas las decisiones tomadas. Creo que no podría expresar plenamente lo importante que has sido, y eres, para mí. Muchísimas gracias por todo.

Por último, y para mí más importante, a mi familia. Me han apoyado y aconsejado en todo momento, han hecho posible que haga todo lo que me gusta y, sobre todo, han confiado en mí y me han hecho creer que siempre podría conseguir lo que me propusiera. Además, quiero nombrar a la persona que, sin duda alguna, más me ha tenido que aguantar todo este tiempo, mi hermana, Andrea. Es increíble como me has cuidado siempre, pero especialmente estos últimos años has sido la persona más importante para mí. Gracias por preocuparte y ayudarme todos y cada uno de los días, por hacerme seguir hacia adelante. Sé a la perfección que sin ti, hoy, no hubiera llegado hasta aquí. Fuiste, eres y serás un gran ejemplo para mí. Te quiero muchísimo.



# ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. CONTEXTO EPIDEMIOLÓGICO ACTUAL DEL CÁNCER .....	1
1.1.1. Bases moleculares del cáncer .....	2
1.1.2. Regulación epigenética .....	3
1.2. HISTONAS DEACETILASAS .....	5
1.2.1. Clasificación y funciones .....	5
1.2.2. Relación de las HDACs con la carcinogénesis.....	7
1.3. INHIBIDORES DE LAS HDACs .....	8
1.3.1. Limitaciones actuales .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
3.1. CULTIVOS CELULARES .....	13
3.2. INFECCIÓN LENTIVIRAL .....	13
3.2.1. Plásmidos shRNA utilizados .....	13
3.2.2. Producción de lentivirus .....	14
3.2.3. Infección celular .....	14
3.3. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	15
3.3.1. Extracción de proteínas totales.....	15
3.3.2. Fraccionamiento y extracción de proteínas nucleares.....	16
3.4. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT .....	16
3.5. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-qPCR) .....	17
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>19</b>
4.1. GENERACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO DE SILENCIAMIENTO DE <i>HDAC1</i> .....	19
4.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL <i>KNOCKDOWN</i> DE <i>HDAC1</i> SOBRE REGULADORES ONCOGÉNICOS CELULARES .....	20
<b>5. PROYECCIONES FUTURAS DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>27</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>29</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>31</b>
<b>ANEXO 1. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTNEIBLE DE LA AGENDA 2030</b> .....	<b>40</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Número estimado de casos incidentes y defunciones por cáncer a nivel mundial en 2020 ...	1
<b>Figura 2.</b> Los <i>hallmarks</i> del cáncer .....	4
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de las funciones celulares relacionadas con la actividad de las HDACs.....	6
<b>Figura 4.</b> Estructura del farmacóforo general utilizado en los inhibidores de las HDACs .....	9
<b>Figura 5.</b> Mapa del vector pLKO.1 utilizado como esqueleto para las distintas secuencias de shRNAs .....	13
<b>Figura 6.</b> Esquema del protocolo de infección lentiviral .....	15
<b>Figura 7.</b> La expresión de <i>HDAC1</i> se ve reducida tras la infección lentiviral con shRNAs. ....	19
<b>Figura 8.</b> Los niveles de proteína de <i>HDAC1</i> se reducen significativamente tras la infección lentiviral con shRNAs.....	19
<b>Figura 9.</b> Esquema de la vía de señalización PI3K/Akt y las funciones celulares asociadas. ....	21
<b>Figura 10.</b> Efecto del silenciamiento de <i>HDAC1</i> sobre la expresión y los niveles de proteína de PTEN .....	22
<b>Figura 11.</b> Niveles totales de acetilación de proteína tras el <i>knockdown</i> de <i>HDAC1</i> . ....	22
<b>Figura 12.</b> Influencia de los niveles de acetilación de PTEN sobre su localización subcelular .....	24



## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de las HDACs, localización celular, dominio catalítico y perfil de expresión. ....	5
<b>Tabla 2.</b> Secuencias de los shRNAs utilizados y la región del ARNm de <i>HDAC1</i> a la que se dirigen. ....	14
<b>Tabla 3.</b> Anticuerpos primarios y las diluciones utilizadas para el Western Blot. ....	17
<b>Tabla 4.</b> Descripción del <i>mix</i> utilizado para la retrotranscripción del ARN total extraído .....	17
<b>Tabla 5.</b> Descripción del <i>mix</i> para la qPCR del ADNc sintetizado .....	18
<b>Tabla 6.</b> Secuencia nucleotídica de los <i>primers</i> utilizados para realizar la RT-qPCR. ....	18



## ABREVIATURAS

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DTT: Ditioneitol

GSTs: Genes Supresores de Tumores

HATs: Histona Acetiltransferasas

HDACs: Histona Deacetilasas

iHDACs: Inhibidores de las Histonas Deacetilasas

Mdm2: *Murine doble minute 2*

mTOR: *mammalian Target Of Rapamycin*

NuRD: *Nucleosome Remodeling and Deacetylase*

P/E: Penicilina/Estreptomicina

PBS: *Phosphate-Buffered Saline*

PI3K: *Phosphatidylinositol 3 kinase*

PIP2: *Phosphatidylinositol 4,5 - biphosphate*

PIP3: *Phosphatidylinositol 3,4,5 - triphosphate*

PTEN: *Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute 1640*

RT-qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

SBF: Suero Bovino Fetal

shRNA: *Short Hairpin RNA*

SIRT: Sirtuina

TBS-T: *Tris-Buffer Saline Tween*

TEM: Transición Epitelio-Mesénquima

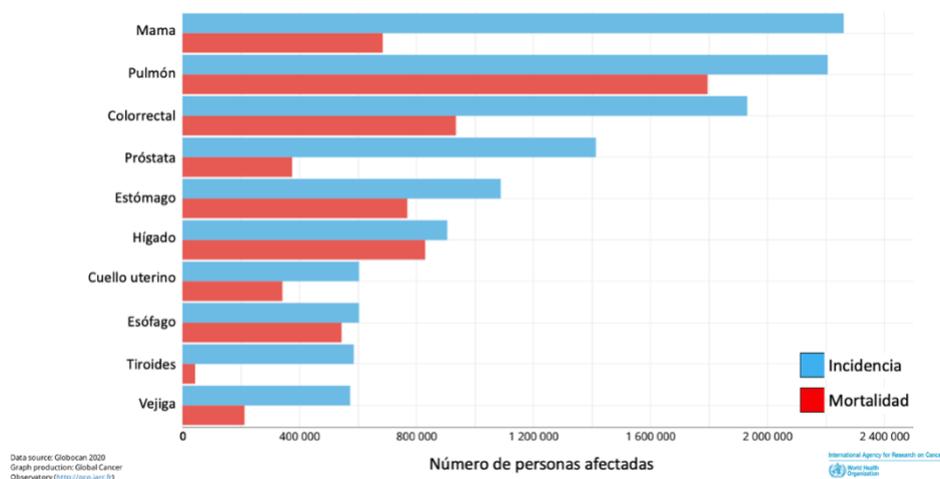


## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer surge como consecuencia de una serie de alteraciones producidas en el ADN de las células y engloba más de cien enfermedades diferentes, que presentan diferentes factores de riesgo y características epidemiológicas. Además, la transformación maligna de las células se puede originar en la mayoría de los tipos celulares y órganos del cuerpo, y se caracterizan por un crecimiento y proliferación descontrolada de estas, así como la adquisición de la capacidad de invasión de los límites normales de los tejidos.

### 1.1. CONTEXTO EPIDEMIOLÓGICO ACTUAL DEL CÁNCER

En base a los datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud, el cáncer y las patologías cardiovasculares lideran las principales causas de muerte en la población menor de 70 años en todo el mundo. Con relación al cáncer, en el año 2020 se estimaron 19.3 millones de nuevos casos y 10 millones de muertes en todo el mundo. Considerando ambos sexos en la población mundial, el cáncer más frecuentemente diagnosticado es el de mama, seguido por el de pulmón, colorrectal, próstata y estómago (Figura 1). En general, el rápido crecimiento de la incidencia global del cáncer en las últimas décadas se refleja tanto en el crecimiento y envejecimiento de la población, como en los cambios de prevalencia y distribución de los principales factores de riesgo del cáncer, algunos de los cuales están asociados con el diferente desarrollo socioeconómico de los países (Sung *et al.*, 2021).



**Figura 1. Número estimado de casos incidentes y defunciones por cáncer a nivel mundial en 2020.** Orden creciente de los tipos de cáncer más incidentes en ambos sexos, en la población mundial (se consideran todas las edades). Fuente: GLOBOCAN 2020

La exposición a factores de riesgo desempeña un papel fundamental en la biología y en el impacto de muchos tipos de cáncer. Estos se pueden clasificar en tres grandes grupos: riesgos de conducta, riesgos metabólicos y aquellos asociados al ambiente y/o al entorno de trabajo (Tran *et al.*, 2022). Entre ellos se encuentran el consumo de sustancias nocivas, como el tabaco y el alcohol; el seguimiento

de una dieta inadecuada y la inactividad física, que pueden resultar en un elevado índice de masa corporal y obesidad; contaminación atmosférica y exposición a carcinógenos, etc. (Vineis y Wild, 2014). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la distribución de estos factores varía, entre otras cosas, según el sexo y la localización geográfica de la población, lo que también contribuye a la variación en la incidencia del cáncer.

A pesar de estas estadísticas, los avances en investigación en el ámbito oncológico en las últimas décadas han propiciado grandes mejoras en la prevención, la detección temprana y el tratamiento del cáncer. Este progreso se ha reflejado en un descenso continuado de las tasas globales de mortalidad por cáncer y en aumentos graduales de la supervivencia desde 1991, lo que se traduce en un descenso global del 32% y, aproximadamente, 3.5 millones de fallecimientos evitados a partir de 2019 (Henley *et al.*, 2020; Siegel *et al.*, 2022). Estos resultados se pueden atribuir, en parte, a la disminución de la prevalencia de ciertos factores de riesgo modificables, como el hábito tabáquico, el alcoholismo o la inactividad física. Sin embargo, el rápido desarrollo y la evolución continua de las terapias dirigidas, las inmunoterapias y la medicina personalizada y de precisión han conseguido generar un impacto significativo en el abordaje de diversos tipos de cáncer. Se ha logrado así la transformación del panorama actual de tratamiento de estas enfermedades, incluidas aquellas que, históricamente, presentaban una baja supervivencia en estadios más avanzados.

Es fundamental considerar que, a pesar de los hitos más relevantes de los últimos años sobre el tratamiento del cáncer, que han contribuido a disminuir la mortalidad y tener un mejor pronóstico de la enfermedad, el cáncer sigue siendo un desafío global en constante crecimiento y de distribución heterogénea. Asumiendo que las tasas nacionales estimadas en 2020 se mantengan constantes, se espera un aumento del 47% de incidencia de casos de cáncer (Sung *et al.*, 2021). Por ello, sigue siendo necesario generar más conocimiento acerca de los diversos tipos de neoplasias y desarrollar nuevas terapias más específicas junto con biomarcadores predictivos que faciliten el abordaje de estas enfermedades tan complejas.

### **1.1.1. Bases moleculares del cáncer**

El proceso de carcinogénesis engloba una serie de características que adquieren las células sanas a medida que evolucionan progresivamente hacia un estado neoplásico, y que son cruciales para su transformación maligna y la adopción de un fenotipo tumoral. Hace más de una década, Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg enumeraron los elementos comunes que unían a todos los tipos de células cancerosas a nivel de fenotipo celular (Hanahan y Weinberg, 2000, 2011). La intención era proporcionar un marco conceptual que permitiese definir y analizar los complejos fenotipos de los

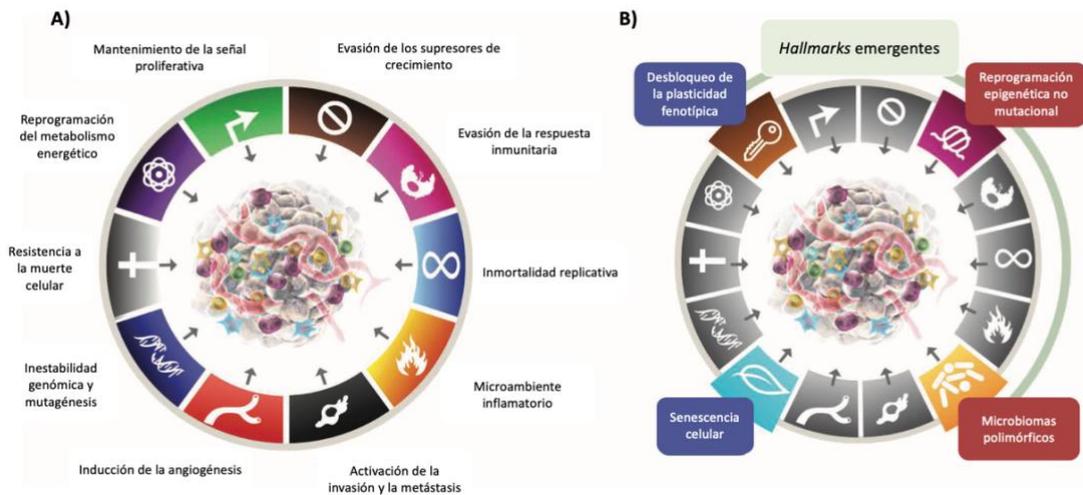
diversos tipos y variantes de tumores humanos. Se propusieron diez propiedades distintivas y complementarias que permiten al tumor progresar y derivar en metástasis; los conocidos *10 Hallmarks of Cancer* (Figura 2A), entre los que se encuentra el mantenimiento de la señal proliferativa y la inestabilidad genómica.

En general, los genes relacionados con el inicio y el desarrollo de un tumor se pueden clasificar en dos grandes grupos: los protooncogenes y los genes supresores de tumores (GSTs). Los productos de los protooncogenes están implicados en promover la progresión del ciclo celular y en la inhibición de procesos como la senescencia y la apoptosis, contribuyendo así al crecimiento celular (Wang *et al.*, 2019). Por tanto, alteraciones en este tipo de genes, que se producen principalmente por traslocaciones cromosómicas, amplificaciones génicas o mutaciones puntuales (*missense mutations*), resultan en su transformación a oncogenes (Vogelstein y Kinzler, 2004). Estas modificaciones en los oncogenes conducen a su activación constitutiva o que el gen sea activo en condiciones en las que su variante *wild type* no lo es, lo que tendrá consecuencias directas sobre la regulación de vías de señalización relacionadas con la proliferación y supervivencia de la célula. Los GSTs, por otro lado, son genes cuyas funciones principales se centran en mantener la integridad del genoma y en la regulación negativa del ciclo celular para evitar una proliferación descontrolada de células con daños en el ADN. En este caso, alteraciones genómicas en los genes supresores de tumores reducen su actividad. Dichas inactivaciones surgen de mutaciones *missense* en residuos esenciales para su función, de mutaciones que dan lugar a una proteína trunca, de deleciones o inserciones de varios tamaño, o de cambios en la pauta de lectura.

No obstante, dada la importancia de estas propiedades en el desarrollo de tratamientos oncológicos y el continuo interés por alcanzar un mayor conocimiento sobre el cáncer, se ha cuestionado durante años si existen características adicionales de este modelo conceptual. En 2022 se publicó un artículo de revisión que incorpora otros rasgos distintivos emergentes (Hanahan, 2022), entre los que se encuentra la reprogramación epigenética no mutacional (Figura 2B).

### 1.1.2. Regulación epigenética

La epigenética se refiere a los cambios heredables y reversibles en la expresión y función de los genes que no están directamente implicados con alteraciones en la secuencia del ADN (John y Rougeulle, 2018). Estos cambios epigenéticos se ven, en parte, influenciados por factores ambientales y pueden tener un impacto significativo en las características funcionales y morfológicas de las células, así como en el desarrollo y la fisiología de un organismo. Se ha descrito que estos mecanismos epigenéticos, dado su importante papel en el correcto funcionamiento celular, también están



**Figura 2. Los hallmarks del cáncer.** A) Propiedades distintivas generales del cáncer aceptadas hasta el momento, incluyendo la reprogramación del metabolismo energético y la evasión del sistema inmune propuestas en 2022, necesarias para el desarrollo tumoral y B) rasgos distintos emergentes propuestos en 2022 relacionados con el desbloqueo de la plasticidad fenotípica, los microbiomas polimórficos, la senescencia celular y la reprogramación epigenética no mutacional. Imagen obtenida y traducida de [Hanahan, 2022](#).

ampliamente implicados en muchas enfermedades humanas, incluyendo el cáncer ([Casado-Pelaez et al., 2022](#); [Kelly et al., 2010](#)).

En este ámbito, uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados es la metilación del ADN. Este proceso, catalizado por las DNMTs (DNA metiltransferasas), consiste en la adición covalente de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) a las citosinas presentes en los dinucleótidos CpG (Citosina – Fosfato – Guanina). La metilación del ADN regula importantes procesos biológicos en el genoma celular, como la transcripción génica y, por ello, se ha evaluado su papel en la carcinogénesis. El cáncer se caracteriza por una hipometilación global de los promotores de los oncogenes, que resulta en su activación. Además también se ha descrito que la inhibición de la expresión de varios GSTs es consecuencia de una hipermetilación de sus promotores situados en las denominadas islas CpGs ([Miranda Furtado et al., 2019](#)).

Otro aspecto fundamental de la regulación epigenética es la remodelación de la cromatina, que se produce principalmente por modificaciones covalentes de las histonas. Las histonas son el componente central de los nucleosomas, formando un octámero que contiene las cuatro histonas principales (H2A, H2B, H3 y H4) alrededor del cual se envuelve un segmento de ADN de, aproximadamente, 147 pares de bases. Cada histona posee un extremo amino-terminal (N-terminal) con una gran densidad de residuos aminoacídicos básicos, como lisina y arginina, que son susceptibles de modificaciones postraduccionales, como la acetilación ([Audia y Campbell, 2016](#); [Lane y Chabner, 2009](#)). La acetilación de las histonas, producida en el grupo ε-amino del residuo K interno cercano a la cola N-terminal, es una reacción catalizada por las histonas acetiltransferasas (HATs). La adición de un

grupo acetilo neutraliza la carga positiva de este aminoácido, lo que debilita la interacción electrostática entre las histonas y la cadena del ADN, que está cargada negativamente, y conlleva a una conformación de la cromatina abierta y activa (*i. e.*, eucromatina) que favorece el acceso de la maquinaria transcripcional a las regiones promotoras. No obstante, esta modificación de las histonas es reversible, por lo que su desacetilación resulta en el efecto contrario, una conformación de la cromatina más compacta (*i. e.*, heterocromatina) y una represión de la transcripción. Esta reacción es catalizada por las histonas deacetilasas (HDACs) (Neganova *et al.*, 2022).

## 1.2. HISTONAS DEACETILASAS

### 1.2.1. Clasificación y funciones

Hasta la fecha se han identificado 18 miembros de histonas deacetilasas humanas, que se agrupan en cuatro clases diferentes en función de sus características, expresión y similitud de secuencia (Tabla 1). Las HDACs de clase I se encuentran mayormente en el núcleo y se expresan de forma ubicua (Mariadason, 2008). Por otro lado, los miembros de clase II se dividen en dos subgrupos: clase IIa y IIb. Aunque comparten características en el dominio catalítico, su expresión varía según el compartimento celular, siendo más abundantes las de clase IIb en el citoplasma (Yoon y Eom, 2016). La HDAC11 es el único miembro de la clase IV y comparte algunas propiedades con el dominio catalítico de los miembros de la clase I y II, aunque su función ha sido poco estudiada hasta el momento (Neganova *et al.*, 2022). Estas tres clases mencionadas se caracterizan por presentar dominios catalíticos dependientes de zinc (Zn). En cambio, las HDACs de clase III, también denominadas sirtuinas (SIRT), se componen por siete miembros y no contienen Zn en su sitio activo, sino que su actividad es dependiente del dinucleótido de nicotinamida y adenina (Mariadason, 2008).

**Tabla 1. Clasificación de las HDACs, localización celular, dominio catalítico y perfil de expresión.**

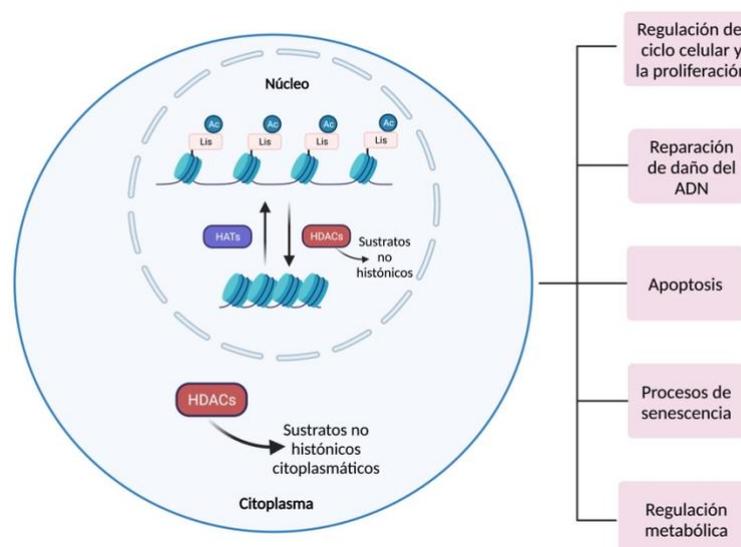
Clase	Miembros	Compartimento celular	Dominio catalítico	Expresión
I	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8	Nuclear	Zn <sup>2+</sup> dependiente	Ubicua
II	HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HDAC10	Núcleo y citoplasma	Zn <sup>2+</sup> dependiente	Específica de tejido
III	SIRT 1-7	Variable	NAD <sup>+</sup> dependiente	Variable
IV	HDAC11	Núcleo y citoplasma	Zn <sup>2+</sup> dependiente	Ubicua

Abreviaciones: HDAC, histona deacetilasa; NAD; dinucleótido de nicotinamida y adenina; SIRT, sirtuina; Zn, zinc

Desde un punto de vista funcional, las HDACs regulan la expresión génica principalmente mediante dos mecanismos. En primer lugar, dado que las histonas deacetilasas no se unen directamente al ADN, suelen formar parte de complejos correpresores de la transcripción de alto peso molecular que son reclutados por factores de transcripción específicos de secuencia hacia las regiones promotoras de los genes, donde desacetilan residuos de lisina específico de las histonas. Por ejemplo, las HDACs 1 y 2

forman parte del complejo NuRD (de sus siglas en inglés *Nucleosome Remodeling and Deacetylase*), cuya función, entre otras, está relacionada con la progresión del ciclo celular o la proliferación (Basta y Rauchman, 2015). Por otro lado, también se ha descrito que estos enzimas pueden regular las funciones de numerosas proteínas no histónicas, como los factores de transcripción, la  $\alpha$ -tubulina de los microtúbulos y la proteína p53, entre otras (Montero *et al.*, 2009). Por tanto, un segundo mecanismo de regulación es mediante la catálisis de la desacetilación de factores de transcripción específicos de secuencia que se unen al ADN. En consecuencia, disminuye la afinidad entre estos factores y el ADN y la transcripción de dicho gen se ve reducida. Un ejemplo de ello es la desacetilación de la proteína p53 por HDAC1, que favorece su posterior ubiquitinación por Mdm2 (de sus siglas en inglés *Murine doble minute 2*) para permitir una inactivación y degradación de p53 eficaz (Ito *et al.*, 2002).

Dado que estos enzimas tienen un papel muy importante en la regulación transcripcional, su actividad e interacción con diversas proteínas se puede relacionar con numerosos procesos y funciones celulares. Entre ellas se encuentra la regulación del ciclo celular, el metabolismo, la apoptosis, la senescencia o la angiogénesis (Figura 3). Además, recientemente se ha descrito que la HDAC3 participa en el proceso de reparación por escisión de nucleótidos tras un daño por radiación ultravioleta en el ADN (Nishimoto *et al.*, 2020).



**Figura 3. Representación esquemática de las funciones celulares relacionadas con la actividad de las HDACs.** Las HDACs que se encuentran en el núcleo pueden actuar directamente sobre las histonas, como subunidad de complejos mayores, o sobre sustratos no histónicos, como factores de transcripción. De ambas formas, su actividad reside en la regulación de la transcripción y la expresión génica. Por otro lado, algunos miembros de la familia de las HDACs pueden actuar en el citoplasma sobre otras proteínas, desacetilándolas y cambiando su estabilidad en esta localización subcelular. En consecuencia, las HDACs se han relacionado con múltiples funciones celulares, como la regulación del ciclo celular o del metabolismo, la reparación del daño en el ADN, la apoptosis o la senescencia celular. Imagen creada en [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Considerando la importancia de la actividad de estos enzimas en la regulación de la transcripción y en la expresión génica, se ha descrito en diversos estudios que una desregulación de las actividades de

los enzimas HATs y HDACs, junto con una sobreexpresión general de las HDACs, es responsable del desarrollo y la progresión de una amplia variedad de enfermedades, incluyendo el cáncer (Audia y Campbell, 2016).

### **1.2.2. Relación de las HDACs con la carcinogénesis**

Las histonas deacetilasas están involucradas en múltiples estadios del cáncer y una expresión anómala de estas, sobre todo de las familias clásicas (clase I, II y IV), se ha vinculado con una variedad de tumores, tanto sólidos como hematológicos (Bondarev *et al.*, 2021; Z. Li y Zhu, 2014). Además, en muchos casos, una sobreexpresión de estos enzimas se ha asociado con estadios avanzados de la enfermedad y con un peor pronóstico de los pacientes (Hai *et al.*, 2021). Por ejemplo, un aumento de expresión de *HDAC1*, *HDAC2* y *HDAC3* se correlaciona con una disminución de la supervivencia de pacientes con tumores gástricos y de ovario (Weichert *et al.*, 2008a; Weichert *et al.*, 2008b), y niveles elevados de *HDAC8* en neuroblastoma se relacionan con una enfermedad más avanzada y una probabilidad de supervivencia menor (Oehme *et al.*, 2009). Por otro lado, en un estudio llevado a cabo por Milde *et al.* (2010) se demostró que las histonas deacetilasas 5 y 9 estaban involucradas en el crecimiento y proliferación de las células en meduloblastoma. Además, observaron que la sobreexpresión de estos dos miembros de las HDACs se correlacionaba con un peor pronóstico y supervivencia de los pacientes y las propusieron como potenciales marcadores de pronóstico para la enfermedad, así como posibles dianas terapéuticas.

Igualmente, varios estudios han descrito que estos enzimas también pueden regular la denominada transición epitelio-mesénquima (TEM) en algunos tipos de cáncer. Una de las características más importantes de esta transición es la disminución de los niveles de la proteína E-Cadherina, codificada por el gen *CDH1*. Una investigación realizada en 2009 (von Burstin *et al.*, 2009) mostró que algunos miembros de las histonas deacetilasas, como la *HDAC1*, forman parte de un complejo nuclear con capacidad de inhibir la expresión de *CDH1*, causando una reducción de E-Cadherina e induciendo consecuentemente la TEM en un modelo celular de cáncer de páncreas.

En particular, *HDAC1* actúa como un sensor ambiental, ya que es capaz de responder a estímulos externos, como la isquemia o los factores de crecimiento, para regular la proliferación, la angiogénesis y la senescencia celular, entre otros procesos. Por tanto, en última instancia, su actividad influye tanto en la fisiología, como en el desarrollo y la progresión de enfermedades como el cáncer (Dunaway y Pollock, 2022).

Se ha demostrado que *HDAC1* se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer, como el de mama (Z. Zhang *et al.*, 2005), el de células renales (Fritzsche *et al.*, 2008) y el linfoma de Hodgkin clásico (Adams

*et al.*, 2010), y su expresión se asocia a menudo con peores características clínicas y pronóstico de los pacientes. Además, en varios estudios se ha mostrado que este miembro de las HDACs también podría estar implicado en la resistencia a múltiples fármacos, ya que se observó una sobreexpresión en un patrón de células de neuroblastoma resistentes a la quimioterapia (Keshelava *et al.*, 2007). Además, en este contexto, la inhibición de la HDAC1 contribuye a la sensibilidad al cisplatino en células de cáncer de ovario resistentes a este agente citotóxico (Liu *et al.*, 2018).

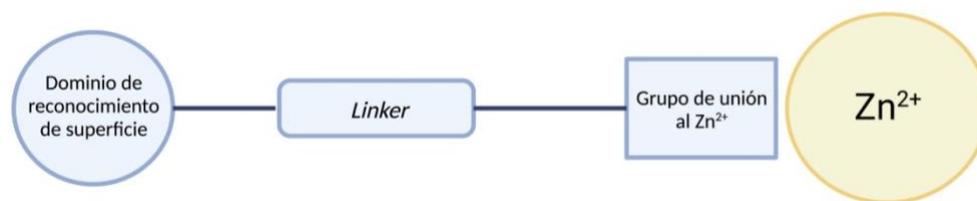
Por todo ello, es importante destacar que la familia de las histonas deacetilasas desempeña numerosas funciones celulares y están relacionadas con el inicio y la progresión de numerosos tipos de cáncer. Aun así, su relación con la tumorigénesis puede ser altamente dependiente de la clase y el estadio del tumor y, hasta el momento, no se han podido describir todos los mecanismos moleculares de interacción entre estas proteínas. Además, la contribución de estas enzimas en el cáncer no siempre está necesariamente relacionada con el nivel de expresión de estas, ya que una actividad aberrante de las HDACs también es común en el desarrollo del cáncer (Li y Seto, 2016).

Tras el análisis de algunas de las funciones de las HDACs y de su frecuente desregulación en muchos tipos de neoplasias, estas enzimas se establecieron como una potencial diana terapéutica para el tratamiento del cáncer. Por ello, desde hace varias décadas se han buscado y desarrollado moléculas que fueran capaces de inhibir la actividad o la expresión de las HDACs, constituyendo los denominados inhibidores de las histonas deacetilasas (iHDACs).

### 1.3. INHIBIDORES DE LAS HDACs

Hasta el momento, la investigación en el ámbito de los iHDACs se ha centrado en el diseño y la caracterización de moléculas, tanto naturales como sintéticas, dirigidas contra los miembros de las familias clásicas de las histonas deacetilasas. Esto se debe a que todas las HDACs clásicas presentan una actividad deacetilasa Zn-dependiente, por lo que la unión de los inhibidores al ion de  $Zn^{2+}$ , que reside en el sitio activo de las enzimas, interfiere con la actividad de las HDACs, modulando así su función enzimática (Li y Seto, 2016). En este ámbito, se han desarrollado cinco clases principales de iHDACs, que incluyen los ácidos hidroxámicos, los tetrapéptidos cíclicos, los ácidos carboxílicos de cadena corta, las benzamidas y los derivados cetónicos (Rana *et al.*, 2020). Todos estos grupos de inhibidores se componen de un farmacóforo formado por un grupo de unión al zinc, una región *linker* y un dominio de reconocimiento de superficie, que, a su vez, se puede dividir en una unidad de conexión polar y una región hidrofóbica (Bertrand, 2010) (Figura 4).

Los inhibidores más estudiados y utilizados hasta el momento son iHDACs de tipo no selectivo, que tienen como diana todas las isoformas de las HDACs pertenecientes a las clases I, II y IV, siendo los



**Figura 4. Estructura del farmacóforo general utilizado en los inhibidores de las HDACs.** El dominio de reconocimiento de superficie, que interactúa con la parte externa de la molécula, un *linker* que facilita el acceso tubular al sitio activo y un grupo de unión al zinc que quela el ion  $Zn^{2+}$  presente en el sitio activo de las histonas deacetilasas clásicas. Imagen creada con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

derivados de ácidos hidroxámicos los compuestos que han alcanzado un mayor éxito en las últimas décadas en cuanto al tratamiento del cáncer. En 2006, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos aprobó, por primera vez, un derivado del ácido hidroxámico como inhibidor terapéutico de las histonas deacetilasas ([Mann et al., 2007](#)). El ácido hidroxámico suberoilánilida, también denominado Vorinostat o SAHA, se aprobó para el tratamiento del linfoma cutáneo de células T. Desde ese momento, se empezaron a desarrollar otros iHDACs, como el belinostat o el panobinostat, que actualmente se encuentran aprobados para el tratamiento del linfoma cutáneo periférico de células T y mielomas múltiples. Aunque los iHDACs han mostrado resultados favorables para el tratamiento de neoplasias hematológicas, su eficacia sigue siendo reducida para el tratamiento de tumores sólidos ([Rana et al., 2020](#)). No obstante, recientes estudios preclínicos y clínicos han revelado resultados prometedores, como el uso de entinostat, una benzamida, para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama avanzado ER+ ([Yeruva et al., 2018](#)).

A pesar de que, en general, los iHDACs no selectivos han mostrado buenos resultados clínicos, actualmente su uso se encuentra limitado por la aparición de diversos efectos secundarios relacionados con la falta de selectividad de estas moléculas. En consecuencia, estos iHDACs provocan la alteración de la actividad de múltiples HDACs de forma simultánea, afectando la expresión de numerosos genes y generando graves repercusiones en diversas funciones celulares esenciales.

Por todo ello, se inició la búsqueda o el desarrollo de nuevos inhibidores que fueran más selectivos y que tuvieran como diana únicamente una isoforma de HDAC o todos los miembros dentro de una misma clase. El desarrollo de estos iHDACs, aparte de poderse utilizar como una herramienta para la elucidación de las funciones individuales de cada miembro de las HDACs y su relación con el cáncer, proporcionan una quimioterapia más eficaz y con menos efectos adversos en comparación con los iHDACs no selectivos. Las mejoras en afinidad, potencia y selectividad se han conseguido principalmente mediante modificaciones en el grupo de reconocimiento de superficie, dirigido a los residuos que rodean el sitio activo de las HDACs ([Gupta et al., 2012](#)). No obstante, también se han realizado otros avances en el diseño farmacológico, como modificaciones en el *linker* o en otras regiones de la estructura de los fármacos, que ha dado lugar al desarrollo de distintos iHDACs

selectivos (Melesina *et al.*, 2021). Un ejemplo de inhibidor selectivo es la romidepsina, cuya diana son únicamente los miembros de las HDACs de clase I, entre los que se encuentra la HDAC1, y que ha mostrado resultados positivos en ensayos para el tratamiento del linfoma periférico de células T (Smolewski y Robak, 2017).

### 1.3.1. Limitaciones actuales

En los últimos 20 años, más de 30 iHDACs han sido objeto de estudio en diferentes ensayos clínicos; sin embargo, hasta el momento, no más del 20% de ellos han sido aprobados para su uso como agentes quimioterápicos (Ho *et al.*, 2020). A pesar de la investigación respecto al desarrollo y optimización de estos fármacos, siguen existiendo limitaciones que impiden su traslación a la clínica. En primer lugar, la eficacia probada de los iHDACs se restringe mayormente a neoplasias hematológicas, mientras que los resultados en los tumores sólidos han sido generalmente desfavorables (Li y Seto, 2016). Aunque no se han descrito las razones exactas para estas diferencias, se han sugerido algunas causas, como unas propiedades farmacocinéticas deficientes que resultan en una vida media del fármaco menor, impidiendo su distribución por los tumores sólidos.

Por otro lado, a pesar de que el desarrollo de inhibidores selectivos ha mejorado significativamente el perfil de toxicidad de estos fármacos, sigue habiendo limitaciones en su uso, especialmente cuando se administran en forma de monoterapia. Por ello, en la actualidad, algunos estudios se están enfocando en el uso de los iHDACs en combinación con otros fármacos para el tratamiento de diferentes neoplasias (Groh *et al.*, 2015). No obstante, tal y como revelaron los resultados de un ensayo de terapia combinada de erlotinib, un inhibidor de la región tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico, con entinostat para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico en estadio avanzado, no había diferencias significativas ni mejoras al añadir el iHDAC al tratamiento (Witta *et al.*, 2012). Por tanto, se vuelve crucial el descubrimiento de nuevos biomarcadores predictivos antes de iniciar una terapia con iHDACs, ya que de esta forma se podrían discriminar aquellos pacientes que no van a resultar beneficiados de esta combinación, ahorrando así tanto el malestar de los pacientes como los recursos del tratamiento.

En resumen, resulta imprescindible llevar a cabo investigaciones adicionales para caracterizar todas las funciones de las HDACs y su implicación en la carcinogénesis. Asimismo, la identificación de otras proteínas esenciales para la progresión tumoral que puedan estar reguladas por la actividad de las HDACs proporcionaría una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes de estas enfermedades, permitiendo así identificar potenciales dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas contra el cáncer.

## 2. OBJETIVOS

En base a lo expuesto anteriormente se estableció el objetivo principal del presente trabajo:

- Estudio de posibles rutas de señalización reguladas por HDAC1 en cáncer.

Además, para lograr este objetivo, se especificaron los siguientes subobjetivos:

- Generación y validación de un modelo de silenciamiento del gen *HDAC1*.
- Análisis del efecto de la inhibición de *HDAC1* sobre reguladores oncogénicos celulares.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. CULTIVOS CELULARES

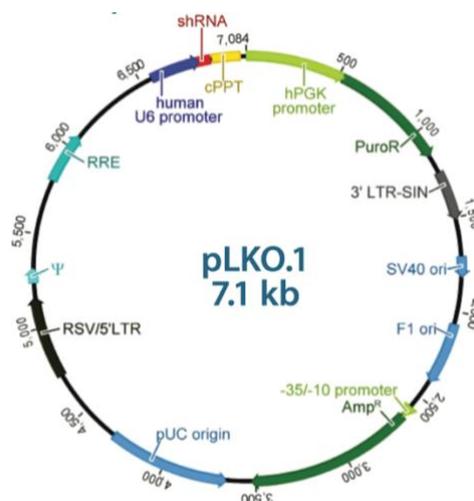
Para llevar a cabo los experimentos de este proyecto se utilizaron dos líneas celulares diferentes: HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293T*) y HCT116, una línea de carcinoma colorrectal humano.

Las HEK293T se cultivaron con *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Gibco), suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (SBF) y 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (P/E). En cuanto al cultivo de HCT116, se utilizó el medio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI, Gibco), también suplementado con un 10 % de SBF y 100 U/mL de P/E. Ambas líneas celulares se incubaron bajo las mismas condiciones: 37 °C en atmósfera humedecida y un valor de CO<sub>2</sub> del 5 %. Además, el medio de cultivo se cambiaba cada dos días y el subcultivo se realizaba al alcanzar una confluencia aproximada del 70 %.

#### 3.2. INFECCIÓN LENTIVIRAL

##### 3.2.1. Plásmidos shRNA utilizados

El vector de expresión lentiviral utilizado en el ensayo de silenciamiento génico (*knockdown*) fue pLKO.1 (Figura 5). Se obtuvo de la casa comercial Horizon (Cambridge, UK) en forma de glicerinado (*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  en medio *Lennox Broth 2x* con un 8 % de glicerol y 100  $\mu$ g/mL de ampicilina) y se extrajo el plásmido tras un protocolo de purificación de ADN plasmídico realizado previamente en el laboratorio. Este vector se utilizó como esqueleto para la inserción del resto de secuencias candidatas de shRNAs (de sus siglas en inglés, *short hairpin RNA*) utilizadas en el proyecto. Además,



**Figura 5.** Mapa del vector pLKO.1 utilizado como esqueleto para las distintas secuencias de shRNAs. Este vector contiene genes de resistencia a la ampicilina (*Amp<sup>R</sup>*) y puromicina (*PuroR*) para la selección de bacterias y células eucariotas, respectivamente. U6 es el promotor humano para la transcripción del plásmido y shRNA indica el lugar de inserción de las secuencias candidatas para el silenciamiento.

contenía un gen de resistencia a la ampicilina (*Amp<sup>R</sup>*) y a la puromicina (*Puro<sup>R</sup>*) para la selección de células bacterianas y las células HCT116 infectadas, respectivamente.

Las secuencias candidatas de shRNA dirigidas contra el ARN mensajero (ARNm) de *HDAC1* se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 2. Secuencias de los shRNAs utilizados y la región del ARNm de *HDAC1* a la que se dirigen.**

shRNA	Identificación del catálogo	Secuencia shRNA	Región diana ARNm de <i>HDAC1</i>
sh-C	RHS6848	-	-
sh-16	RHS3979-201737089	5' ATTACTTTGGACATGACCGGC 3'	ORF
sh-18	RHS3979-201737091	5' TAGAGACCATAGTTGAGCAGC 3'	5'UTR, ORF

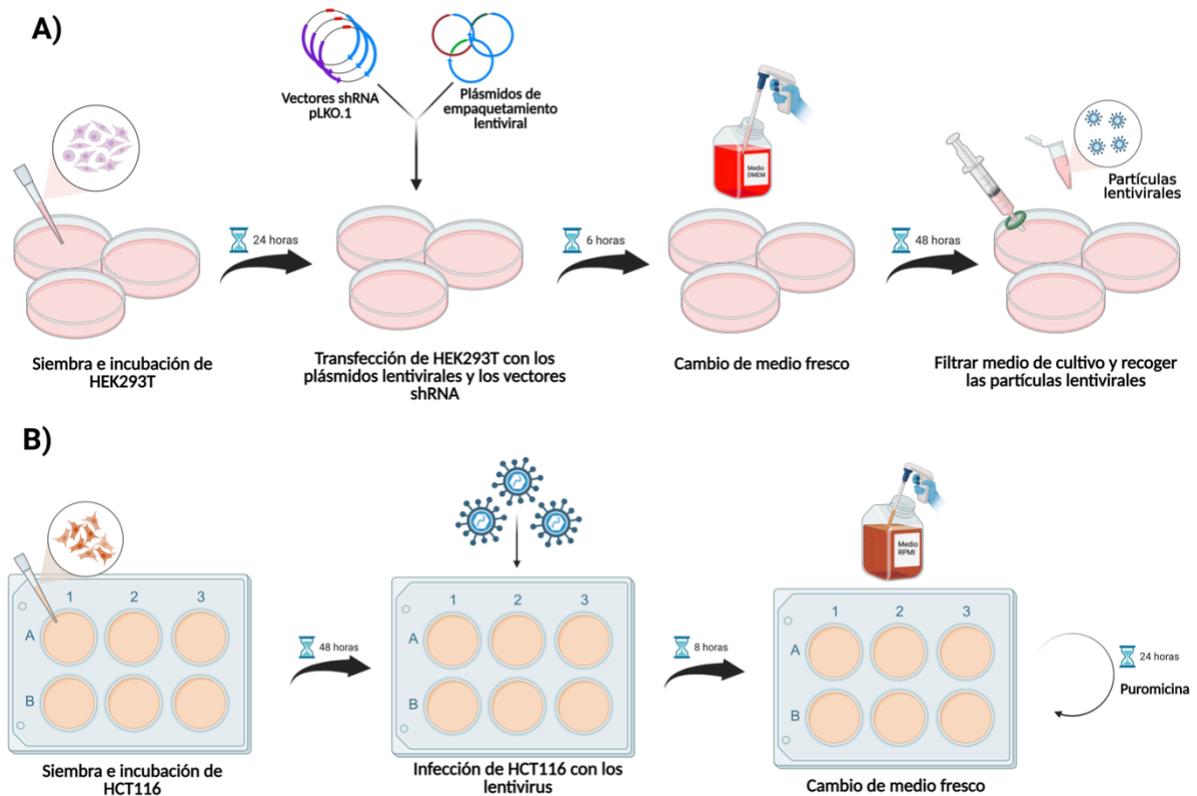
### 3.2.2. Producción de lentivirus

En primer lugar, para cada vector lentiviral, se cultivaron  $1.5 \times 10^6$  células HEK293T en placas Petri de 100 mm, y se dejó incubando durante toda la noche (Figura 6A). Transcurridas 24 horas, los vectores con los shRNAs junto con los plásmidos v-SVG, Gag/Pol y Rev se descongelaron en hielo. Para cada vector lentiviral se realizó un mix de transfección con 544  $\mu$ L de DMEM sin suero y 24  $\mu$ L de FuGENE, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos. En paralelo, se preparó un *mix* de ADN de 20  $\mu$ L que contenía 0.4  $\mu$ g de v-SVG, 3.7  $\mu$ g de Gag/Pol, 3.7  $\mu$ g de Rev y 4.2  $\mu$ g del vector shRNA, en agua estéril. Una vez pasado el tiempo, se agregó el *mix* de transfección al *mix* de ADN, se mezcló por inversión y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mientras tanto, se descartó el medio de las HEK293T y se reemplazó por 6 mL de DMEM completo. Posteriormente, cada *mix* de transfección se adicionó, gota a gota, y las células se incubaron a 37 °C y un 5 % de CO<sub>2</sub>. Tras 7 horas de incubación, se desechó el medio y se cambió por 8 mL de DMEM fresco.

### 3.2.3. Infección celular

El procedimiento de infección se ilustra en la Figura 6B. Dos días antes de la infección, las células HCT116 se cultivaron en una placa de seis pocillos (35 mm) a una densidad de 150.000 células por pocillo con el fin de alcanzar una confluencia del 80-90 %.

Pasados los dos días, se recogió el medio de cultivo en el que se encontraban las partículas lentivirales producidas tras la infección. Para ello, se filtró el medio de las HEK293T utilizando un filtro de 0.45  $\mu$ m de tamaño de poro y se centrifugó a 300 g durante 3 minutos. Posteriormente, se aspiró el medio de las células HCT116 y se reemplazó por 2 mL del medio filtrado con una concentración final de 4  $\mu$ g/mL del reactivo de infección (Polibreno). Tras 8 horas de incubación, se descartó el medio y se reemplazó por RPMI completo.



**Figura 6. Esquema del protocolo de infección lentiviral.** La línea celular HEK293T A) se transfecta con los plásmidos de empaquetamiento lentiviral y los distintos vectores shRNA para la producción de los lentivirus de interés que se utilizarán para B) infectar la línea HCT116, el modelo celular de interés. Imagen creada con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Finalmente, 24 horas después de la infección, se seleccionaron las células añadiendo RPMI fresco con una concentración final de puromicina de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los resultados completos de selección se observaron tres días después de adicionar el medio suplementado con puromicina.

### 3.3. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

#### 3.3.1. Extracción de proteínas totales

Para llevar a cabo la extracción de proteínas totales se sembraron  $1.5 \times 10^6$  células en placas de 100 mm. Pasadas 48 horas, se descartó el medio y se lavaron las placas con PBS (de sus siglas en inglés *Phosphate-Buffered Saline*) 1X frío. La extracción de proteínas se llevó a cabo añadiendo 150  $\mu\text{L}$  de un tampón de lisis a cada placa y se levantaron las células utilizando raspadores celulares. El tampón de lisis en 1 mL de RIPA (de sus siglas en inglés *Radioimmunoprecipitation*) *buffer* contenía 25 mM de  $\beta$ -glicol, 1mM de ditioneitol (DTT), 1mg/mL de leupeptina, 20 mM de fluoruro de metilsulfonilo, 100  $\mu\text{M}$  de caliculina, 500mM de ortovanadato sódico y 4  $\mu\text{M}$  de pepstatina. Los lisados obtenidos se transfirieron a tubos Eppendorf de 2 mL, se incubaron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron a máxima velocidad durante 30 minutos a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Se recogieron los sobrenadantes y se pasaron a nuevos

tubos Eppendorf para realizar la cuantificación general de proteínas. Las concentraciones se midieron utilizando el Kit de Ensayo de Proteínas BCA Pierce™, siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific).

### **3.3.2. Fraccionamiento y extracción de proteínas nucleares**

Igual que en la extracción de proteínas totales, se sembraron  $1.5 \times 10^6$  células en placas de 100 mm y, pasadas 48 horas, se descartó el medio y se lavaron las placas con PBS 1X frío. El fraccionamiento se comenzó añadiendo 150  $\mu$ L de *buffer* de pre-extracción del *Nuclear Extraction Kit* (Abcam), complementado con DTT y un cóctel de inhibidores de proteasas (PIC) a una dilución 1:1000, de manera homogénea por cada placa. Con ayuda de los raspadores celulares se recogieron los lisados obtenidos y se transfirieron a un Eppendorf para incubar en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugaron 1 minuto, a 4 °C y 13.500 g y se recogió el sobrenadante, donde se encontraba la fracción proteica del citoplasma.

Se resuspendieron los *pellet* con 30  $\mu$ L del *buffer* de extracción (Abcam), también complementado con DTT y PIC a una proporción 1:1000, y se dejaron en hielo durante 15 minutos. Cada 3 minutos las soluciones se homogeneizaron con un vórtex. A continuación, se sonicaron las muestras 3 veces durante 10 segundos y se centrifugaron a 4 °C durante 10 minutos a 14.000 g. Finalmente, se recogieron los sobrenadantes, donde se encontraban las proteínas nucleares, y se desechó el *pellet*. En este caso, las proteínas se cuantificaron utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA de microplacas Pierce™ compatible con agentes reductores, siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific).

### **3.4. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT**

Los extractos de proteínas totales y las fracciones nucleares y citoplasmáticas obtenidas se prepararon a una concentración final de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L y se cargaron entre 5 y 20  $\mu$ g de proteína en cada pocillo para llevar a cabo la electroforesis. Así, se separaron las proteínas por tamaño utilizando un gel de poliacrilamida 4-15 % preconstruido (4–15 % Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel, Bio-Rad Laboratories, Inc.). Posteriormente, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa y, con el objetivo de bloquear los sitios no específicos de la membrana, se incubó durante 1h a temperatura ambiente con un 5% de leche en polvo en *Tris-Buffer Saline Tween* (TBS-T) 1X. La membrana se incubó con los anticuerpos primarios (dilución 1:1000 en TBS-T 1X y albúmina de suero bovino al 5 %) a 4 °C durante toda la noche. Después, se hicieron tres lavados de la membrana, de 10 minutos cada uno, a temperatura ambiente con TBS-T 1X y se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario *anti-*

*rabbit* conjugado a la peroxidasa de rábano (Bio-Rad Laboratories). Tras la incubación, se volvió a lavar la membrana tres veces con TBS-T 1X durante 10 minutos y se añadió el reactivo de detección quimioluminiscente durante 5 minutos. Las bandas inmunorreactivas se detectaron utilizando el sistema de detección ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Los anticuerpos primarios y las diluciones utilizadas se incluyen en la Tabla 3.

**Tabla 3. Anticuerpos primarios y las diluciones utilizadas para el Western Blot.**

Anticuerpo primario (dilución 1:1000)	Peso molecular de la proteína	Referencia del fabricante (Cell Signaling Technologies)
Acetil-lisina	-	#9441
GAPDH	37 kDa	#2118
HDAC1	62 kDa	#2062
Histona 3	17 kDa	#9715
PTEN	54 kDa	#9559
Vinculina	124 kDa	#13901

Finalmente, se cuantificaron las intensidades de las bandas obtenidas y los valores se normalizaron respecto a la intensidad de la banda del *housekeeping gene* y del control (sh-C).

### 3.5. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-qPCR)

Se sembraron 200.000 células en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Tras 48h de incubación, se lavaron los pocillos con PBS 1X frío, se extrajo el ARN total de la muestra utilizando el RNAeasy Mini Kit (Qiagen) y se cuantificó utilizando un nanodrop (ThermoFisher Scientific). Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis del ADN complementario (ADNc) a partir de 500 ng de ARN total utilizando el kit *Quantitect Reverse Transcription* (Qiagen), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. El ARN se incubó inicialmente con *gDNA wipeout buffer* a 42 °C durante 2 minutos para eliminar el ADN genómico. Seguidamente, las muestras se incubaron a 42 °C durante 15 minutos con el *mix* preparado con el kit (Tabla 4).

**Tabla 4. Descripción del *mix* utilizado para la retrotranscripción del ARN total extraído.** Los reactivos se prepararon siguiendo el orden en el que aparecen en la tabla.

Reactivos	Volumen (μL)
Quantiscript Reverse Transcriptase	1
Quantiscript RT Buffer	4
RT Primer Mix	1

Después de realizar la retrotranscripción se preparó el mix del kit TB Green® Premix EX Taq™ y se añadieron los *primers* a 10 ng del ADNc para la mezcla de reacción (Tabla 5). La qPCR se llevó a cabo en el equipo ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) con una temperatura de anillamiento de 60 °C y 40 ciclos de amplificación.

**Tabla 5. Descripción del *mix* para la qPCR del ADNc sintetizado.** Se detallan los reactivos utilizados para cada muestra.

Reactivos	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
ROX Dye II (50X)	0,2
<i>Primer</i> directo (10X)	0,3
<i>Primer</i> reverso (10X)	0,3
DNA master SYBR Premix Ex Taq Takara (2x)	5
Agua	2,2

Se realizaron duplicados de las medidas individuales y se cuantificaron los valores de expresión del ADNc utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta C}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Se utilizó el gen *ACTB* ( $\beta$  - actina) como *housekeeping* para normalizar los valores de expresión de los genes de interés. La secuencia de los *primers* utilizados para la qPCR se detallan en la Tabla 6.

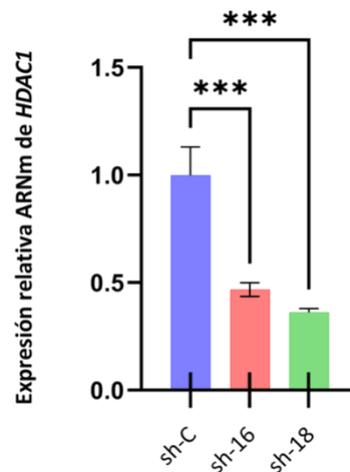
**Tabla 6. Secuencia nucleotídica de los *primers* utilizados para realizar la RT-qPCR.**

Gen	<i>Primer</i> directo	<i>Primer</i> reverso
<i>HDAC1</i>	5' GGAAATCTATCGCCCTCACA 3'	5' AACAGGCCATCGAATACTGG 3'
<i>PTEN</i>	5' TGAGTTCCTCAGCCGTTACCT 3'	5' GAGGTTTCCTCTGGTCCTGGTA 3'
<i>ACTB</i>	5' GACCCAGATCATGTTTGAGACC 3'	5' CTCATGAGGTAGTCAGTCAGG 3'

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

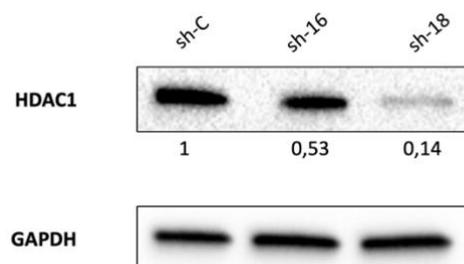
### 4.1. GENERACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO DE SILENCIAMIENTO DE *HDAC1*

Para generar un modelo celular de silenciamiento del gen *HDAC1* en la línea celular HCT116, se utilizó un shRNA control (sh-C) y dos shRNAs dirigidos contra el ARNm de *HDAC1* (sh-16 y sh-18). Con el objetivo de confirmar el silenciamiento de *HDAC1*, en primer lugar, se realizó una RT-qPCR para medir los niveles de expresión a nivel de ARNm del gen (Figura 7).



**Figura 7.** La expresión de *HDAC1* se ve reducida tras la infección lentiviral con shRNAs. Se representan los niveles de expresión relativa del ARNm del gen *HDAC1* tras una infección lentiviral con sh-C, sh-16 y sh-18. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar. Los tres asteriscos (\*\*\*) representan un p-valor  $< 0.001$  respecto al control (sh-C).

En comparación con el sh-C, se observó una reducción significativa de la expresión de *HDAC1* a nivel de ARNm, tanto en el sh-16 como en el sh-18. En concreto, hubo una menor reducción en el sh-16 (53 %) que en el sh-18 (64 %), lo que indica que este último shRNA tenía una capacidad de silenciamiento mayor. Posteriormente, se hizo un Western Blot para confirmar que los resultados obtenidos también se observaban a nivel de proteína. Tal y como se muestra en la Figura 8, los niveles de proteína de *HDAC1* se redujeron en un 47 % y un 86 % tras la inhibición con los sh-16 y sh-18, respectivamente. En este caso, el vector shRNA que más silenciamiento produjo también fue el sh-18, lo cual se correlaciona



**Figura 8.** Los niveles de proteína de *HDAC1* se reducen significativamente tras la infección lentiviral con shRNAs. El Western Blot muestra menores niveles de proteína en las líneas sh-16 y sh-18 en comparación con el control (sh-C). Se utilizaron 20  $\mu$ g de proteína para realizar la electroforesis.

con el resultado obtenido en la RT-qPCR y confirma que el vector sh-18 es el que generó un silenciamiento más eficiente. Estos resultados indicaron que el silenciamiento con los shRNAs mediante la infección lentiviral en la línea HCT116 se produjo de manera adecuada y se generó un modelo de silenciamiento robusto del gen *HDAC1*.

Sin embargo, pese a haber una reducción significativa de HDAC1 tras la infección lentiviral con el sh-16, sigue habiendo niveles de proteína relativamente elevados en comparación con el otro shRNA. Dichos niveles de HDAC1 podrían ser suficientes para mantener su actividad y, consecuentemente, sus funciones celulares, lo cual plantea la posibilidad de que los resultados obtenidos en futuros experimentos no reflejen correctamente los efectos de la inhibición tras la infección. Por lo tanto, los experimentos llevados a cabo en los siguientes pasos de este trabajo se realizaron únicamente con el sh-C y el sh-18.

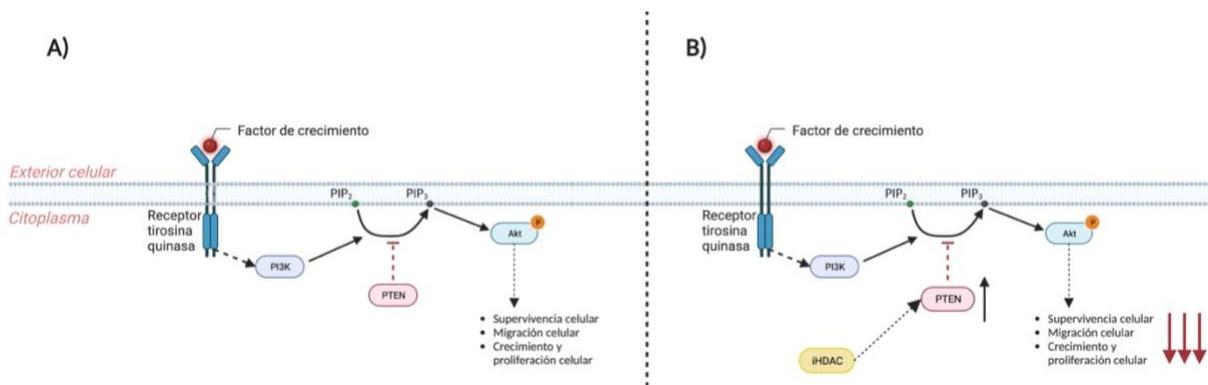
#### 4.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL *KNOCKDOWN* DE *HDAC1* SOBRE REGULADORES ONCOGÉNICOS CELULARES

En el contexto de las histonas deacetilasas y las implicaciones de su alteración en cáncer, hay numerosos estudios que han demostrado que el uso de iHDACs puede ejercer su efecto antitumoral mediante la modulación de la cantidad y la actividad de ciertos reguladores oncogénicos, como PTEN (Dhar *et al.*, 2015; H. Zhang *et al.*, 2014; Qian *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2020).

La fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa, o PTEN (de sus siglas en inglés *Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*), es una fosfatasa dual que actúa sobre lípidos y proteínas y ejerce su función como un gen supresor de tumores. Su expresión es constitutiva, presenta múltiples actividades celulares y controla importantes procesos biológicos, incluyendo el mantenimiento de la estabilidad genómica (Lee *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2012). Además, es un regulador negativo clave en la ruta de señalización celular PI3K/Akt, la cual está relacionada principalmente con el crecimiento, la supervivencia y la proliferación celular. En condiciones fisiológicas normales, la unión de algunos factores, como los de crecimiento epidérmico, a sus receptores tirosina quinasa correspondientes producen la activación de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), que fosforilará el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). El PIP<sub>3</sub> presenta un lugar de unión de dominios de pleckstrina que reclutará posteriormente a otros señalizadores celulares, como la quinasa de serina y treonina Akt, que se activará por fosforilación (Figura 9A). Finalmente, Akt activará numerosos efectores *downstream*, como mTOR (del inglés *mammalian Target Of Rapamycin*) o Mdm2, con diferentes funciones celulares relacionadas con la proliferación, crecimiento y supervivencia celular. En todo este proceso PTEN tiene un papel

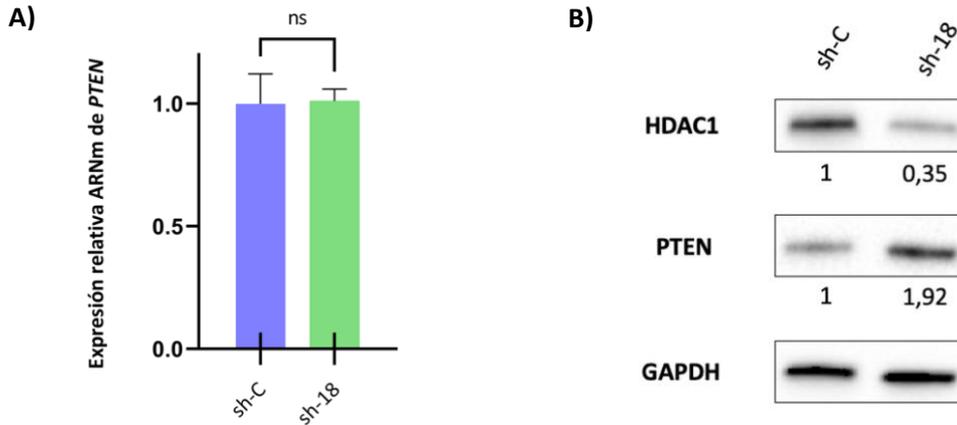
importante, ya que mediante su actividad fosfatasa lipídica puede defosforilar el  $PIP_3$  a  $PIP_2$ , con la consecuente reducción de la fosforilación de Akt y la inhibición de los efectos celulares mencionados anteriormente (He *et al.*, 2021).

En consecuencia, dado que algunos iHDACs producen un aumento de los niveles de PTEN en la célula, uno de los efectos antitumorales que presentan estas moléculas está relacionado con la disminución de la señalización de la vía PI3K/Akt (Figura 9B). Sin embargo, aún no se ha descrito el mecanismo exacto de interacción por el que se produce el aumento de los niveles de PTEN, ya que estos inhibidores pueden presentar diferentes efectos *off-target*. Por ello, considerando el importante papel regulador de este GST en múltiples vías de señalización celular, se decidió confirmar si los resultados observados sobre PTEN en diferentes investigaciones también se reproducían en el modelo de silenciamiento generado en este proyecto. Así, el modelo sería adecuado y permitiría realizar futuros experimentos con el objetivo de elucidar nuevas características de la interacción entre HDAC1 y PTEN.



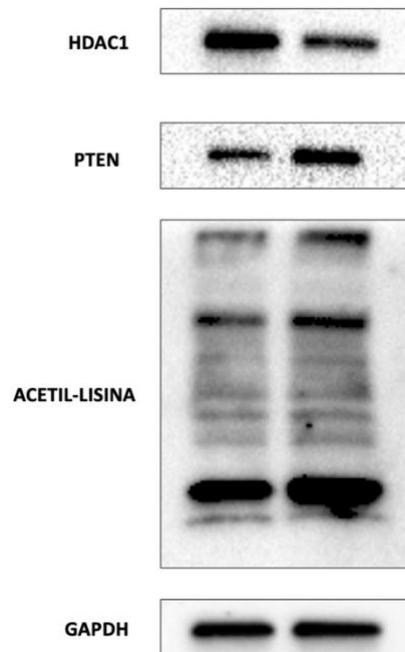
**Figura 9. Esquema de la vía de señalización PI3K/Akt y las funciones celulares asociadas.** A) La unión de un factor de crecimiento a su receptor, con actividad tirosina quinasa intrínseca, provoca la activación de la PI3K, que fosforilará el  $PIP_2$  a  $PIP_3$  para el reclutamiento de la quinasa Akt. Este enzima fosforilará una serie de proteínas efectoras *downstream* relacionadas con procesos de supervivencia, migración, crecimiento y proliferación celular. B) El uso de iHDAC en la célula produce un aumento de PTEN, cuya función principal es regular de forma negativa la señalización de esta ruta. En consecuencia, disminuirá la fosforilación de Akt y los procesos celulares relacionados mencionados. Imagen creada con BioRender.com

En primer lugar, para evaluar el posible efecto del *knockdown* de *HDAC1* sobre la expresión de *PTEN*, se realizó una RT-qPCR. Como se muestra en la Figura 10A, no existían diferencias significativas en cuanto a la expresión relativa de ARNm de *PTEN* en la línea celular sh-18 en comparación con el sh-C. Por tanto, el silenciamiento de *HDAC1* en este modelo no ejerce ningún efecto sobre la expresión de este GST a nivel de ARNm. Por otro lado, para comprobar si existía algún cambio a nivel de proteína, se realizó un Western Blot (Figura 10B). En este caso, se observó un aumento de casi el doble en los niveles de proteína de PTEN tras el silenciamiento de *HDAC1* con el sh-18, en comparación con el grupo control.



**Figura 10. Efecto del silenciamiento de *HDAC1* sobre la expresión y los niveles de proteína de *PTEN*.** Se representa la A) expresión relativa del ARNm y B) los niveles de proteína de *PTEN* tras el silenciamiento de *HDAC1*. Los resultados de la RT-qPCR se expresa como la media  $\pm$  la desviación estándar. La ns representa una diferencia no significativa entre el grupo de estudio respecto al control. Se utilizaron 5  $\mu$ g de proteína para realizar la electroforesis.

Estos resultados demuestran que el efecto de *HDAC1* sobre *PTEN* no se produce a nivel transcripcional, sino de proteína. Debido a esto, se planteó la hipótesis de que la modulación de los niveles de *PTEN* podría estar asociada con variaciones en sus modificaciones postraduccionales, específicamente con la regulación de la acetilación por *HDAC1*. Por lo tanto, se procedió a analizar los niveles generales de acetilación de las proteínas de la línea sh-18 con respecto al sh-C (Figura 11).



**Figura 11. Niveles totales de acetilación de proteína tras el *knockdown* de *HDAC1*.** El Western Blot muestra mayores niveles de acetilación total en la línea celular sh-18 en comparación con la línea control (sh-C). Se utilizaron 10  $\mu$ g de proteína para realizar la electroforesis.

Como se muestra en la Figura 11, se observaron niveles totales de acetilación más elevados en las proteínas de la línea que incorpora el vector sh-18 en comparación con el sh-C. Considerando que el

enzima de estudio es una deacetilasa, es lógico inferir que la inhibición de este gen produzca un aumento en los niveles de acetilación de las proteínas. Por lo tanto, HDAC1 podría modular la cantidad de PTEN en la célula de forma postraduccional mediante cambios en la acetilación de las lisinas. Sin embargo, para analizar de forma más precisa la influencia de HDAC1 sobre los niveles de acetilación de PTEN, sería necesario emplear un anticuerpo en el Western Blot capaz de reconocer la acetilación de una K específica de la proteína. En su defecto, se podría utilizar el anticuerpo de la acetil-lisina general junto con una técnica de inmunoprecipitación para aislar únicamente a PTEN y así poder evaluar sus niveles de acetilación de forma individual.

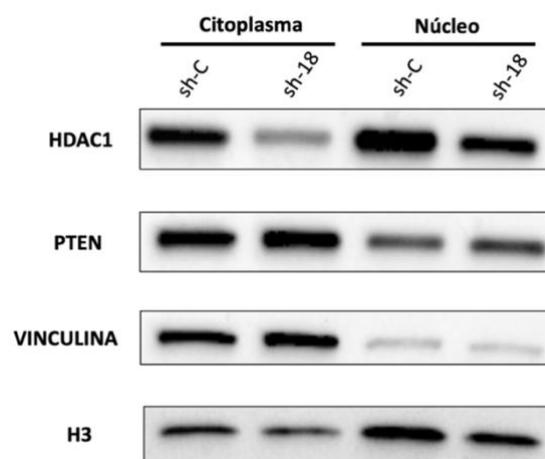
Asimismo, se ha demostrado que cambios en los niveles de acetilación de PTEN pueden afectar a ciertas características de la proteína, como su actividad (Chae y Broxmeyer, 2011). De hecho, en un estudio de 2016 se observó que el uso de SAHA, un inhibidor de las familias clásicas de las HDACs, aumentaba la actividad de PTEN mediante la acetilación de una lisina específica (K163), lo que contribuía significativamente a la inhibición tumoral (Meng *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha descrito que la acetilación es un mecanismo habitual de estabilización de proteínas, ya que previene la ubiquitinación y, por tanto, la degradación dependiente del proteasoma (Narita *et al.*, 2018). Esto puede deberse a la competencia directa entre la acetilación y la ubiquitinación por la modificación de los mismos residuos de K. Por ejemplo, la acetilación de SMAD7, un modulador de la expresión génica de múltiples vías de señalización celular, mediada por p300, una HAT, en los residuos K64 y K70 previene la ubiquitinación de la proteína e impide su degradación vía proteasoma (Grönroos *et al.*, 2002). Por ello, a pesar de que aún no existen evidencias que lo confirmen, estos estudios sirven de precedente para hipotetizar que la regulación de los niveles de acetilación de PTEN tras la inhibición de *HDAC1* podría contribuir al aumento de su estabilidad en la célula, aunque sería necesario llevar a cabo diferentes experimentos en el futuro para poder confirmarlo. Además, en cuanto a los efectos de la acetilación sobre proteínas no histónicas, se ha visto que los cambios en esta modificación postraduccional están estrechamente relacionados con la localización subcelular de PTEN, ya que este GST ejerce sus funciones tanto en el citoplasma como en el núcleo (Ikenoue *et al.*, 2008).

Aparte de la regulación de la proliferación mediante la vía PI3K/Akt, PTEN presenta otras actividades en este ámbito. En este sentido, se ha descrito que PTEN, cuando se encuentra en el núcleo, también puede modular el ciclo celular al reducir la actividad de la ciclina D1, una proteína necesaria para la transición de fase G<sub>1</sub> a S, ya sea por represión transcripcional o limitando su acumulación en este compartimento celular (Lee *et al.*, 2018). Adicionalmente, se ha visto que PTEN puede interactuar con complejos involucrados en la anafase para promover la división celular (Song *et al.*, 2011), así como modular procesos relacionados con la conformación de la cromatina (Gong *et al.*, 2011).

*al.*, 2015) y la apertura del ADN (Kang *et al.*, 2015). Por otro lado, PTEN tiene un importante papel en el mantenimiento de la integridad del genoma mediante la interacción con múltiples proteínas involucradas en sistemas de reparación del ADN. Por ello, este GST es capaz de coordinar una respuesta celular que determina el equilibrio entre los resultados de la reparación del ADN y la supervivencia celular, así como el daño en el ADN y la apoptosis, a través de la regulación dependiente de la fosfatasa lipídica de la señalización PI3K/Akt en el citoplasma y la regulación dependiente de la actividad de la fosfatasa proteica de la respuesta al daño del ADN en el núcleo (J. Ho *et al.*, 2020).

En el contexto del cáncer, se ha descrito que la localización subcelular de PTEN presenta importantes diferencias respecto a un tejido sano, ya que en los tejidos neoplásicos existe una disminución de esta proteína en el núcleo (Délérís *et al.*, 2003; Perren *et al.*, 2000). Esta disminución o total ausencia de proteína nuclear se ha asociado con cánceres más agresivos (Gimm *et al.*, 2000), lo que sugiere que la reserva nuclear de PTEN contribuye de forma importante a sus funciones como GST y que el análisis de su localización subcelular es en una importante característica patológica adicional para el pronóstico del cáncer (Langdon, 2023). Sin embargo, PTEN carece de una señal de localización nuclear canónica o de secuencias de exportación nuclear, por lo que numerosos mecanismos han sido propuestos para explicar el transporte nucleocitosólico de esta proteína (Lee *et al.*, 2018). Aunque se ha visto que PTEN puede entrar al núcleo por difusión simple, existen otras vías de importación mediadas por transportadores, así como modificaciones postraduccionales que regulan este proceso, como la acetilación (Okumura *et al.*, 2006).

Por todo ello, se decidió analizar si en este modelo existían variaciones en la localización subcelular de PTEN como consecuencia del silenciamiento de HDAC1. Para ello, se llevó a cabo un Western Blot con extractos de proteínas del citoplasma y del núcleo, tanto del sh-C como del sh-18 (Figura 12).



**Figura 12. Influencia de los niveles de acetilación de PTEN sobre su localización subcelular.** Se representan los niveles de proteína HDAC1 y PTEN, en el sh-C y en el sh-18 tanto en el citoplasma como en el núcleo. Se utilizó la Histona 3 (H3) como marcador de proteína nuclear y la vinculina como marcadores de proteína citoplasmática. Se cargaron 20  $\mu$ g de proteína para realizar la electroforesis.

En este experimento se utilizaron las proteínas vinculina y H3 como marcadores del citoplasma y del núcleo, respectivamente, con el objetivo de comprobar que los resultados obtenidos se correspondían únicamente a los niveles de proteína de las diferentes fracciones. Sin embargo, como se observa en la Figura 12, la presencia de H3 en el citoplasma indicó un error experimental durante el protocolo de fraccionamiento y extracción de proteínas nucleares, ya que la H3 es una proteína localizada exclusivamente en el núcleo. Por otro lado, la presencia de vinculina en las fracciones nucleares puede deberse a una recolección insuficiente del sobrenadante de la primera centrifugación del protocolo, dejando parte en el *pellet* donde se encontraban los núcleos. Además, la intensidad de las bandas de H3 en las fracciones citoplasmáticas sugiere que los primeros pasos del protocolo ocasionaron la lisis del núcleo antes de lo previsto. Finalmente, la HDAC1, como ya se ha mencionado previamente, es una proteína que sólo está presente en el núcleo, por lo que la presencia de bandas en la fracción del citoplasma también indica que la separación de las fracciones nucleares y citoplasmáticas no funcionó correctamente.

Por lo tanto, los resultados obtenidos de este experimento no son concluyentes en relación con la influencia de los niveles de acetilación de PTEN sobre su localización subcelular. Así, sería necesario analizar detenidamente la composición de los *buffers* utilizados, así como los diferentes pasos del protocolo de extracción nuclear, para identificar posibles fallos cometidos y poder optimizar el protocolo para la extracción de las diferentes fracciones mencionada minimizando o eliminando la contaminación entre ellas.



## **5. PROYECCIONES FUTURAS DE LA INVESTIGACIÓN**

En este trabajo se ha generado y validado un modelo de silenciamiento del gen *HDAC1* que ha permitido iniciar el estudio de su relación con uno de los reguladores oncogénicos más importantes de la célula, PTEN: A pesar de haber reproducido resultados previos de la asociación entre la HDAC1 y PTEN y haber planteado la hipótesis de la influencia de la acetilación sobre ciertas características importantes de este GST, es necesario realizar más experimentos sobre este modelo para dilucidar los mecanismos de interacción entre estas dos proteínas y los efectos sobre PTEN y el desarrollo tumoral.

En primer lugar, se ha de comprobar que la inhibición de *HDAC1* tiene un efecto directo sobre los niveles de acetilación de PTEN. Sin embargo, dado que no se conocen todas las K susceptibles de acetilación de esta proteína, y por tanto no se puede utilizar un anticuerpo que reconozca la modificación de una K específica, sería conveniente realizar una inmunoprecipitación de PTEN con el objetivo de evaluar sus niveles de acetilación de forma individual.

Por otro lado, debido a los problemas experimentales observados en el fraccionamiento y la extracción de proteína nucleares, se debe revisar detalladamente el protocolo utilizado y optimizarlo para las condiciones de trabajo seguidas. Así, se podría analizar de forma correcta la influencia de los niveles de acetilación de PTEN sobre su localización subcelular.

Además, otro aspecto relevante a estudiar sería la posible relación entre la acetilación y la estabilidad de PTEN en la célula. Para ello, se podría llevar a cabo un experimento con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica en eucariotas. Una vez inhibida la síntesis de proteínas, y según la vida media de la proteína, se podría medir la variación en los niveles de PTEN en diferentes tiempos en los dos grupos utilizados en el trabajo: sh-C y sh-18. Esto permitiría determinar la estabilidad de PTEN en la célula en presencia y ausencia de HDAC1, respectivamente.



## 6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer de este trabajo son las siguientes:

1. Se ha generado un modelo celular de silenciamiento estable del gen *HDAC1* en la línea HCT116 mediante infección lentiviral. De los dos vectores lentivirales utilizados en el trabajo, el sh-18 produjo un silenciamiento más efectivo de *HDAC1*, tanto a nivel génico (64 %) como de proteína (86 %).
2. Este modelo celular ha servido como herramienta para la identificación y el estudio de reguladores oncogénicos que podrían estar regulados por *HDAC1* y cuya expresión se puede ver modificada tras su inhibición.
3. El silenciamiento de *HDAC1* no tuvo ningún efecto sobre la expresión de *PTEN* a nivel de ARNm, pero sí que provocó un aumento en los niveles de proteína en la célula.
4. Los niveles totales de acetilación de proteínas aumentaron cuando *HDAC1* estaba inhibido.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, H; FRITZSCHE, F. R; DIRNHOFER, S; KRISTIANSEN, G; Y TZANKOV, A. (2010). Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in classical Hodgkin's lymphoma. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14(6), 577-584. <https://doi.org/10.1517/14728221003796609>
- AUDIA, J. E; Y CAMPBELL, R. M. (2016). Histone modifications and cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019521>
- BASTA, J; Y RAUCHMAN, M. (2015). The nucleosome remodeling and deacetylase complex in development and disease. En *Translational Research* (Vol. 165, Número 1, pp. 36-47). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.05.003>
- BERTRAND, P. (2010). Inside HDAC with HDAC inhibitors. En *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 45, Número 6, pp. 2095-2116). <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.02.030>
- BONDAREV, A. D; ATTWOOD, M. M; JONSSON, J; CHUBAREV, V. N; TARASOV, V. V; Y SCHIÖTH, H. B. (2021). Recent developments of HDAC inhibitors: Emerging indications and novel molecules. En *British Journal of Clinical Pharmacology* (Vol. 87, Número 12, pp. 4577-4597). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/bcp.14889>
- CASADO-PELAEZ, M; BUENO-COSTA, A; Y ESTELLER, M. (2022). Single cell cancer epigenetics. En *Trends in Cancer* (Vol. 8, Número 10, pp. 820-838). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2022.06.005>
- CHAE, H; & BROXMEYER, H. E. (2011). SIRT1 Deficiency Downregulates PTEN/JNK/FOXO1 Pathway to Block Reactive Oxygen Species-Induced Apoptosis in Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development*, 20(7), 1277-1285. <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0465>
- DÉLÉRIS, P; BACQUEVILLE, D; GAYRAL, S; CARREZ, L; SALLES, J. P; PERRET, B; Y BRETON-DOUILLON, M. (2003). SHIP-2 and PTEN are expressed and active in vascular smooth muscle cell nuclei, but only SHIP-2 is associated with nuclear speckles. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38884-38891. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300816200>

- DHAR, S; KUMAR, A; LI, K; TZIVION, G; Y LEVENSON, A. S. (2015). Resveratrol regulates PTEN/Akt pathway through inhibition of MTA1/HDAC unit of the NuRD complex in prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(2), 265-275. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.004>
- DUNAWAY, L. S; Y POLLOCK, J. S. (2022). HDAC1: An environmental sensor regulating endothelial function. *Cardiovascular Research*, 118(8), 1885-1903. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab198>
- FRITZSCHE, F. R; WEICHERT, W; RÖSKE, A; GEKELER, V; BECKERS, T; STEPHAN, C; JUNG, K; SCHOLMAN, K; DENKERT, C; DIETEL, M; Y KRISTIANSEN, G. (2008). Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in renal cell cancer. *BMC Cancer*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-381>
- GIMM, O; PERREN, A; WENG, L. P; MARSH, D. J; YEH, J. J; ZIEBOLD, U; GIL, E; HINZE, R; DELBRIDGE, L; LEES, J. A; MUTTER, G. L; ROBINSON, B. G; KOMMINOTH, P; DRALLE, H; Y ENG, C. (2000). Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *American Journal of Pathology*, 156(5), 1693-1700. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65040-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65040-7)
- GONG, L; GOVAN, J. M; EVANS, E. B; DAI, H; WANG, E; LEE, S. W; LIN, H. K; LAZAR, A. J; MILLS, G. B; Y LIN, S. Y. (2015). Nuclear PTEN tumor-suppressor functions through maintaining heterochromatin structure. *Cell Cycle*, 14(14), 2323-2332. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1044174>
- GROH, T; HRABETA, J; KHALIL, M. A; DOKTOROVA, H; ECKSCHLAGER, T; Y STIBOROVA, M. (2015). The synergistic effects of DNA-damaging drugs cisplatin and etoposide with a histone deacetylase inhibitor valproate in high-risk neuroblastoma cells. *International Journal of Oncology*, 47(1), 343-352. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2996>
- GRÖNROOS, E; HELLMAN, U; HELDIN, C.-H; Y ERICSSON, J. (2002). Control of Smad7 Stability by Competition between Acetylation and Ubiquitination. En *Molecular Cell* (Vol. 10).
- GUPTA, P; REID, R. C; IYER, A; SWEET, M. J; Y FAIRLIE, D. P. (2012). Towards Isozyme-Selective HDAC Inhibitors For Interrogating Disease. En *Current Topics in Medicinal Chemistry* (Vol. 12).

- HAI, R; HE, L; SHU, G; Y YIN, G. (2021). Characterization of Histone Deacetylase Mechanisms in Cancer Development. En *Frontiers in Oncology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.700947>
- HANAHAN, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. En *Cancer Discovery* (Vol. 12, Número 1, pp. 31-46). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- HANAHAN, D; Y WEINBERG, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. En *Cell* (Vol. 100).
- HANAHAN, D; Y WEINBERG, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. En *Cell* (Vol. 144, Número 5, pp. 646-674). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- HE, Y; SUN, M. M; ZHANG, G. G; YANG, J; CHEN, K. S; XU, W. W; Y LI, B. (2021). Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. En *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 6, Número 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00828-5>
- HENLEY, S. J; THOMAS, C. C; LEWIS, D. R; WARD, E. M; ISLAMI, F; WU, M; WEIR, H. K; SCOTT, S; SHERMAN, R. L; MA, J; KOHLER, B. A; CRONIN, K; JEMAL, A; BENARD, V. B; Y RICHARDSON, L. C. (2020). Annual report to the nation on the status of cancer, part II: Progress toward Healthy People 2020 objectives for 4 common cancers. *Cancer*, 126(10), 2250-2266. <https://doi.org/10.1002/cncr.32801>
- HO, J; CRUISE, E. S; DOWLING, R. J. O; Y STAMBOLIC, V. (2020). Pten nuclear functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036079>
- HO, T. C. S; CHAN, A. H. Y; Y GANESAN, A. (2020). Thirty Years of HDAC Inhibitors: 2020 Insight and Hindsight. En *Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 63, Número 21, pp. 12460-12484). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00830>
- IKENOUE, T; INOKI, K; ZHAO, B; Y GUAN, K. L. (2008). PTEN acetylation modulates its interaction with PDZ domain. *Cancer Research*, 68(17), 6908-6912. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1107>

- ITO, A; KAWAGUCHI, Y; LAI, C. H; KOVACS, J. J; HIGASHIMOTO, Y; APPELLA, E; Y YAO, T. P. (2002). MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO Journal*, 21(22), 6236-6245. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf616>
- JOHN, R. M; Y ROUGEULLE, C. (2018). Developmental epigenetics: Phenotype and the flexible epigenome. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(OCT). <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00130>
- KANG, X; SONG, C; DU, X; ZHANG, C; LIU, Y; LIANG, L; HE, J; LAMB, K; SHEN, W. H; YYIN, Y. (2015). PTEN stabilizes TOP2A and regulates the DNA decatenation. *Scientific Reports*, 5, 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep17873>
- KELLY, T. K; DE CARVALHO, D. D; Y JONES, P. A. (2010). Epigenetic modifications as therapeutic targets. En *Nature Biotechnology* (Vol. 28, Número 10, pp. 1069-1078). <https://doi.org/10.1038/nbt.1678>
- KESHELAVA, N; DAVICIONI, E; WAN, Z; JI, L; SPOSTO, R; TRICHE, T. J; Y REYNOLDS, C. P. (2007). Histone deacetylase 1 gene expression and sensitization of multidrug-resistant neuroblastoma cell lines to cytotoxic agents by depsipeptide. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(14), 1107-1119. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm044>
- LANE, A. A; Y CHABNER, B. A. (2009). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. En *Journal of Clinical Oncology* (Vol. 27, Número 32, pp. 5459-5468). <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.1291>
- LANGDON, C. G. (2023). Nuclear PTEN's Functions in Suppressing Tumorigenesis: Implications for Rare Cancers. En *Biomolecules* (Vol. 13, Número 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom13020259>
- LEE, Y. R; CHEN, M; Y PANDOLFI, P. P. (2018). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 19, Número 9, pp. 547-562). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0015-0>
- LI, Y; Y SETO, E. (2016). HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026831>

- LI, Z; Y ZHU, W. G. (2014). Targeting histone deacetylases for cancer therapy: From molecular mechanisms to clinical implications. En *International Journal of Biological Sciences* (Vol. 10, Número 7, pp. 757-770). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijbs.9067>
- LIU, X; YU, Y; ZHANG, J; LU, C; WANG, L; LIU, P; Y SONG, H. (2018). HDAC1 silencing in ovarian cancer enhances the chemotherapy response. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48(4), 1505-1518. <https://doi.org/10.1159/000492260>
- LIVAK, K. J; & SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- MANN, B. S; JOHNSON, J. R; COHEN, M. H; JUSTICE, R; Y PAZDUR, R. (2007). FDA Approval Summary: Vorinostat for Treatment of Advanced Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma. *The Oncologist*, 12(10), 1247-1252. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-10-1247>
- MARIADASON, J. M. (2008). HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer. En *Epigenetics* (Vol. 3, Número 1, pp. 28-37). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/epi.3.1.5736>
- MELESINA, J; SIMOBEN, C. V; PRAETORIUS, L; BÜLBÜL, E. F; ROBAA, D; Y SIPPL, W. (2021). Strategies To Design Selective Histone Deacetylase Inhibitors. En *ChemMedChem* (Vol. 16, Número 9, pp. 1336-1359). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000934>
- MENG, Z; JIA, L. F; Y GAN, Y. H. (2016). PTEN activation through K163 acetylation by inhibiting HDAC6 contributes to tumor inhibition. *Oncogene*, 35(18), 2333-2344. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.293>
- MILDE, T; OEHME, I; KORSHUNOV, A; KOPP-SCHNEIDER, A; REMKE, M; NORTHCOTT, P; DEUBZER, H. E; LODRINI, M; TAYLOR, M. D; VON DEIMLING, A; PFISTER, S; Y WITT, O. (2010). HDAC5 and HDAC9 in medulloblastoma: Novel markers for risk stratification and role in tumor cell growth. *Clinical Cancer Research*, 16(12), 3240-3252. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0395>
- MIRANDA FURTADO, C. L; DOS SANTOS LUCIANO, M. C; SILVA SANTOS, R. DA, FURTADO, G. P; MORAES, M. O; Y PESSOA, C. (2019). Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. En

- Epigenetics* (Vol. 14, Número 12, pp. 1164-1176). Taylor and Francis Inc.  
<https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1640546>
- MONTERO, A; BEIERLE, J. M; OLSEN, C. A; Y REZA GHADIRI, M. (2009). Design, synthesis, biological evaluation, and structural characterization of potent histone deacetylase inhibitors based on cyclic  $\alpha/\beta$ - tetrapeptide architectures. *Journal of the American Chemical Society*, 131(8), 3033-3041. <https://doi.org/10.1021/ja809508f>
- NARITA, T; WEINERT, B. T; & CHOUDHARY, C. (2018). Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 156-174.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0081-3>
- NEGANOVA, M. E; KLOCHKOV, S. G; ALEKSANDROVA, Y. R; Y ALIEV, G. (2022). Histone modifications in epigenetic regulation of cancer: Perspectives and achieved progress. En *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 83, pp. 452-471). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcan.2020.07.015>
- NISHIMOTO, K; NIIDA, H; UCHIDA, C; OHHATA, T; KITAGAWA, K; MOTEGI, A; SUDA, T; Y KITAGAWA, M. (2020). HDAC3 is required for XPC recruitment and nucleotide excision repair of DNA damage induced by UV irradiation. *Molecular Cancer Research*, 18(9), 1367-1378.  
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-20-0214>
- OEHME, I; DEUBZER, H. E; WEGENER, D; PICKERT, D; LINKE, J. P; HERO, B; KOPP-SCHNEIDER, A; WESTERMANN, F; ULRICH, S. M; VON DEIMLING, A; FISCHER, M; Y WITT, O. (2009). Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. *Clinical Cancer Research*, 15(1), 91-99.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0684>
- OKUMURA, K; MENDOZA, M; BACHOO, R. M; DEPINHO, R. A; CAVENEE, W. K; Y FURNARI, F. B. (2006). PCAF modulates PTEN activity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26562-26568.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M605391200>
- PERREN, A; KOMMINOTH, P; SAREMASLANI, P; MATTER, C; FEURER, S; LEES, J. A; HEITZ, P. U; Y ENG, C. (2000). Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. *American Journal of Pathology*, 157(4), 1097-1103. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64624-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64624-X)

- QIAN, Y. YUAN, LIU, Z. SU, YAN, H. JUN, YUAN, Y. FENG, LEVENSON, A. S; Y LI, K. (2018). Pterostilbene inhibits MTA1/HDAC1 complex leading to PTEN acetylation in hepatocellular carcinoma. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 101, 852-859. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.022>
- RANA, Z; DIERMEIER, S; HANIF, M; Y ROSENGREN, R. J. (2020). Understanding failure and improving treatment using HDAC inhibitors for prostate cancer. En *Biomedicines* (Vol. 8, Número 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8020022>
- SIEGEL, R. L; MILLER, K. D; FUCHS, H. E; Y JEMAL, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7-33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- SMOLEWSKI, P; Y ROBAK, T. (2017). The discovery and development of romidepsin for the treatment of T-cell lymphoma. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(8), 859-873. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1341487>
- SONG, M. S; CARRACEDO, A; SALMENA, L; SONG, S. J; EGIA, A; MALUMBRES, M; Y PANDOLFI, P. P. (2011). Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell*, 144(2), 187-199. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.020>
- SONG, M. S; SALMENA, L; Y PANDOLFI, P. P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 13, Número 5, pp. 283-296). <https://doi.org/10.1038/nrm3330>
- SUN, J; PIAO, J; LI, N; YANG, Y; KIM, K. Y; Y LIN, Z. (2020). Valproic acid targets HDAC1/2 and HDAC1/PTEN/Akt signalling to inhibit cell proliferation via the induction of autophagy in gastric cancer. *FEBS Journal*, 287(10), 2118-2133. <https://doi.org/10.1111/febs.15122>
- SUNG, H; FERLAY, J; SIEGEL, R. L; LAVERSANNE, M; SOERJOMATARAM, I; JEMAL, A; Y BRAY, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- TRAN, K. B; LANG, J. J; COMPTON, K; XU, R; ACHESON, A. R; HENRIKSON, H. J; KOCARNIK, J. M; PENBERTHY, L; AALI, A; ABBAS, Q; ABBASI, B; ABBASI-KANGEVARI, M; ABBASI-KANGEVARI, Z;

- ABBASTABAR, H; ABDELMASSEH, M; ABD-ELSALAM, S; ABDELWAHAB, A. A; ABDOLI, G; ABDULKADIR, H. A; ... MURRAY, C. J. L. (2022). The global burden of cancer attributable to risk factors, 2010–19: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 400(10352), 563-591. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01438-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01438-6)
- VINEIS, P; Y WILD, C. P. (2014). Global cancer patterns: Causes and prevention. En *The Lancet* (Vol. 383, Número 9916, pp. 549-557). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62224-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62224-2)
- VOGELSTEIN, B; Y KINZLER, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. En *Nature Medicine* (Vol. 10, Número 8, pp. 789-799). <https://doi.org/10.1038/nm1087>
- VON BURSTIN, J; ESER, S; PAUL, M. C; SEIDLER, B; BRANDL, M; MESSER, M; VON WERDER, A; SCHMIDT, A; MAGES, J; PAGEL, P; SCHNIEKE, A; SCHMID, R. M; SCHNEIDER, G; Y SAUR, D. (2009). E-Cadherin Regulates Metastasis of Pancreatic Cancer In Vivo and Is Suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 Repressor Complex. *Gastroenterology*, 137(1). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.04.004>
- WANG, L. H; WU, C. F; RAJASEKARAN, N; Y SHIN, Y. K. (2019). Loss of tumor suppressor gene function in human cancer: An overview. En *Cellular Physiology and Biochemistry* (Vol. 51, Número 6, pp. 2647-2693). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000495956>
- WEICHERT, W; RÖSKE, A; GEKELER, V; BECKERS, T; EBERT, M. P; PROSS, M; DIETEL, M; DENKERT, C; & RÖCKEN, C. (2008a). Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. *Lancet Oncology*, 9(2), 139-148. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(08\)70004-4](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(08)70004-4)
- WEICHERT, W; DENKERT, C; NOSKE, A; DARB-ESFAHANI, S; DIETEL, M; KALLOGER, S. E; HUNTSMAN, D. G; Y KÖBEL, M. (2008b). Expression of class I histone deacetylases indicates poor prognosis in endometrioid subtypes of ovarian and endometrial carcinomas. *Neoplasia*, 10(9), 1021-1027. <https://doi.org/10.1593/neo.08474>
- WITTA, S. E; JOTTE, R. M; KONDURI, K; NEUBAUER, M. A; SPIRA, A. I; RUXER, R. L; VARELLA-GARCIA, M; BUNN, P. A; Y HIRSCH, F. R. (2012). Randomized phase II trial of erlotinib with and without entinostat in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed on prior chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 30(18), 2248-2255. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.9411>

- YERUVA, S. L. H; ZHAO, F; MILLER, K. D; TEVAARWERK, A. J; WAGNER, L. I; GRAY, R. J; SPARANO, J. A; Y CONNOLLY, R. M. (2018). E2112: Randomized phase III trial of endocrine therapy plus entinostat/placebo in patients with hormone receptor-positive advanced breast cancer. En *npj Breast Cancer* (Vol. 4, Número 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41523-017-0053-3>
- YOON, S; Y EOM, G. H. (2016). HDAC and HDAC Inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Diseases. *Chonnam Medical Journal*, 52(1), 1. <https://doi.org/10.4068/cmj.2016.52.1.1>
- ZHANG, H; ZHAO, B; HUANG, C; MENG, X. M; BIAN, E. B; Y LI, J. (2014). Melittin restores PTEN expression by down-regulating HDAC2 in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095520>
- ZHANG, Z; YAMASHITA, H; TOYAMA, T; SUGIURA, H; ANDO, Y; MITA, K; HAMAGUCHI, M; HARA, Y; KOBAYASHI, S; Y IWASE, H. (2005). Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Research and Treatment*, 94(1), 11-16. <https://doi.org/10.1007/s10549-005-6001-1>

## ANEXO 1. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)

Objetivos de Desarrollo Sostenible	Alto	Medio	Bajo	No procede
<b>ODS 1.</b> Fin de la pobreza				X
<b>ODS 2.</b> Hambre cero				X
<b>ODS 3.</b> Salud y bienestar	X			
<b>ODS 4.</b> Educación e igualdad				X
<b>ODS 5.</b> Igualdad de género				X
<b>ODS 6.</b> Agua limpia y saneamiento				X
<b>ODS 7.</b> Energía asequible y no contaminante				X
<b>ODS 8.</b> Trabajo decente y crecimiento económico				X
<b>ODS 9.</b> Industria, innovación e infraestructuras				X
<b>ODS 10.</b> Reducción de las desigualdades				X
<b>ODS 11.</b> Ciudades y comunidades sostenibles				X
<b>ODS 12.</b> Producción y consumo responsables				X
<b>ODS 13.</b> Acción por el clima				X
<b>ODS 14.</b> Vida submarina				X
<b>ODS 15.</b> Vida de ecosistemas terrestres				X
<b>ODS 16.</b> Paz, justicia e instituciones sólidas				X
<b>ODS 17.</b> Alianzas para lograr objetivos				X

Este trabajo se relaciona con el siguiente ODS de la Agenda 2030: “ODS 3. Salud y Bienestar”, que trata sobre la importancia de garantizar una vida sana y la promoción del bienestar en todas las edades. En concreto, se puede establecer una relación con la meta 3.4, cuyo propósito reside en la reducción en un tercio la mortalidad prematura por enfermedades no transmisibles a través de su prevención y tratamiento para 2030.

La generación de un modelo de silenciamiento de *HDAC1* permite su uso como herramienta para la identificación y el estudio de posibles rutas de señalización reguladas por dicho gen en cáncer, así como otras proteínas que interactúen con HDAC1. Este modelo se podría emplear para caracterizar los mecanismos moleculares involucrados en la interacción y la identificación de futuras dianas terapéuticas, contribuyendo así a mejorar la comprensión del papel de HDAC1 en la carcinogénesis y al diseño de terapias dirigidas más efectivas contra el cáncer.