



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA EXPRESIÓN Y REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LAS BOMBAS DE CALCIO SERCA EN TUMORES Y EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER GÁSTRICO Y DE COLON”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
QFB. Ingrid Lara Espinosa

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg
Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Martha Robles Flores
Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Alfonso León del Río
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad de México. Marzo 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo de tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Ángel Zarain Herzberg en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Con el apoyo de beca de maestría No. 750667 otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM) IN219219.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por iluminar mi camino y permitirme llegar hasta este día.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, gracias por acogerme como estudiante, apoyarme y permitir mi crecimiento personal y profesional.

Al Dr. Ángel Zarain, por permitirme formar parte de su equipo, gracias por compartir sus conocimientos y experiencias, su comprensión, apoyo y guía. Gracias por todo lo aprendido.

A la Biól. Gabriela Rodríguez gracias por todo su apoyo, asesorías y conocimientos que contribuyeron al desarrollo de esta tesis y por su valiosa amistad.

Al Dr. Andrés Hernández, por su invaluable apoyo en este trabajo, por sus conocimientos y asesorías brindadas en los análisis bioinformáticos.

A la Dra. Cristina Castañeda, gracias por sus aportaciones al desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Eduardo Izquierdo, por sus consejos en la realización de este trabajo.

A mi comité tutorial, a la Dra. Martha Robles Flores y al Dr. Alfonso León del Río, por su tiempo y conocimientos que enriquecieron este proyecto.

A Melba Espinosa López, mi mamá, gracias por apoyarme siempre, a motivarme a seguir adelante, gracias por tu ejemplo de fortaleza y tu amor incondicional. ¡Te amo!

A Manuel de Jesús Lara Mejía, mi papá, gracias por tu ejemplo de superación, por motivarme y apoyarme siempre. ¡Te amo!

A mis hermanos, Isa, Jazmín y Alberto, gracias por estar siempre. Nada sería igual sin ustedes. ¡Los amo!

A mis amigos Jessy, Vero y Barut, por ser mi segunda familia, gracias por todo.

A Carolina Gómez, por acompañarme en este camino, gracias por todo tu apoyo y amistad.

A Beni, por tu valiosa amistad y apoyo incondicional.

Muchas gracias a todos.

CONTENIDO

RECONOCIMIENTO	2
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
ABREVIATURAS	8
R E S U M E N.....	9
A B S T R A C T	10
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. ANTECEDENTES.....	12
2.1 Regulación epigenética	12
2.2 La metilación de citocinas en el DNA	12
2.3 Modificación de histonas	17
2.4 Epigenética y cáncer	20
2.5 El ion calcio	21
2.6 Ion calcio y cáncer.....	24
2.7 Las bombas de calcio SERCA.....	25
2.8 Enzimas SERCA y cáncer.....	32
2.9 El cáncer gástrico y el cáncer de colon.....	33
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	39
III. HIPÓTESIS	39
IV. OBJETIVO GENERAL	40
V. OBJETIVOS PARTICULARES	40
VI. METODOLOGÍA.....	41
VII. RESULTADOS.....	45
IX. DISCUSIÓN.....	58
X. CONCLUSIONES.....	63
XI. PERSPECTIVAS	64
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo general de la regulación epigenética.....	13
Figura 2. La metilación del DNA.....	14
Figura 3. Metilación del DNA en las islas CpG.....	16
Figura 4. La modificación de histonas por acetilación/desacetilación.....	18
Figura 5. Ion calcio como segundo mensajero.....	22
Figura 6. Proteínas que participan en la homeostasis del Ca ²⁺	23
Figura 7. Estructura 3D de las enzimas SERCA.....	26
Figura 8. La estructura de las enzimas SERCA.....	27
Figura 9. Esquema de reacción del ciclo catalítico de las enzimas SERCA.....	28
Figura 10. Generación de múltiples isoformas de SERCA por splicing alternativo de los genes ATP2A1-3.....	30
Figura 11. Distribución de casos y muertes a nivel mundial por los 10 tipos de cáncer más comunes en 2020 (ambos sexos, todas las edades).....	34
Figura 12. Distribución de casos y muertes en México por los 10 tipos de cáncer más comunes en 2020 (ambos sexos, todas las edades).....	35
Figura 13. Diagrama de flujo del enfoque analítico empleado en este estudio.....	43
Figura 14. La expresión del gen <i>ATP2A3</i> se encuentra disminuida en tejidos de cáncer gástrico.....	45
Figura 15. La expresión del gen <i>ATP2A3</i> se encuentra disminuida en biopsias de cáncer de colon.....	46
Figura 16. La expresión del gen <i>ATP2A3</i> se encuentra disminuida en biopsias de cáncer de colon.....	47
Figura 17. La expresión del gen <i>ATP2A3</i> se encuentra disminuida en líneas celulares de cáncer gástrico poco diferenciadas.....	48
Figura 18. La expresión del gen <i>ATP2A3</i> se encuentra disminuida en líneas celulares de cáncer de colon tipo C.....	49
Figura 19. La expresión del gen <i>ATP2A3</i> se encuentra disminuida en líneas celulares de cáncer de colon indiferenciadas.....	50
Figura 20. El tratamiento con iHDACs aumenta la expresión del gen <i>ATP2A3</i> en la línea celular HCT116.....	51
Figura 21. La expresión del gen <i>ATP2A3</i> se relaciona con la supervivencia del paciente con cáncer gástrico.....	52
Figura 22. Niveles de metilación de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en cáncer gástrico.....	53

Figura 23. Niveles de metilación de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en cáncer de colon.....	53
Figura 24. Abundancia de las marcas de histonas H3K27ac y H3K4me3 en la región del promotor de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en líneas celulares de cáncer gástrico.	54
Figura 25. Abundancia de la marca de histona H3K27ac en la región del promotor de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en líneas celulares de cáncer de colon.....	55
Figura 26. Abundancia de la marca de histona H3K27ac en la región del promotor de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en líneas celulares de cáncer de colon.....	56
Figura 27. Abundancia de las marcas de histonas H3K27ac y H3K4me3 en la región del promotor de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en dos líneas celulares de cáncer de colon.....	56
Figura 28. Abundancia de las marcas de histonas H3K27ac y H3K4me3 en la región del promotor de los de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en tejido de colon normal y tumoral	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Parámetros bioquímicos de las isoformas de las bombas SERCA	31
Tabla 2.	Descripción de los estadios tumorales de cáncer gástrico.....	37
Tabla 3.	Descripción de los estadios tumorales de cáncer de colon.....	38
Tabla 4.	Número de acceso para cada estudio original	44

ABREVIATURAS

AJCC: American Joint Committee on Cancer

ATP: Trifosfato de adenosina

Ca²⁺: Ion calcio

CC: Cáncer de colon

CG: Cáncer gástrico

CpG: Dinucleótido de citosina y guanina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNMT: DNA metiltransferasa

E1: Estado de conformación 1 del ciclo catalítico de SERCA

E1P: Estado de conformación 1 fosforilado del ciclo catalítico de SERCA

E2: Estado de conformación 2 del ciclo catalítico de SERCA

GEO: Gene Expression Omnibus

HAT: Histona acetiltransferasa

HDAC: Histona desacetilasa

IP3R: Receptor Inositol trifosfato

kb: kilobases

mRNA: RNA mensajero

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica

PMCA: ATPasa de Ca²⁺ de la membrana plasmática

RNA: Ácido ribonucleico

RyR: Receptor de rianodina

SERCA: ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarco (endo) plásmico

SRA: Sequence Read Archive

tRNA: RNA de transferencia

TSS: Sitio de inicio de la transcripción

UICC: Union for International Cancer Control

RESUMEN

La señalización del calcio (Ca^{2+}) es fundamental en diversas funciones celulares como la diferenciación, proliferación, transcripción, muerte celular y metabolismo, entre otros. La regulación de esta señalización depende de varias proteínas, entre ellas las ATPasas- Ca^{2+} del Retículo Sarco (endo) Plásmico (SERCA) y las alteraciones de estas enzimas SERCA se asocian el desarrollo de diversas enfermedades, como el cáncer. El objetivo de este trabajo es explorar mediante análisis bioinformáticos si los genes que codifican para las bombas SERCA, *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* se encuentran alterados en muestras de tumores y en líneas celulares de cáncer gástrico (CG) y cáncer de colon (CC) y si su expresión es regulada por mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA y las modificaciones postraduccionales de histonas. Los resultados muestran que la expresión gen *ATP2A3* se encuentra disminuido en muestras de tumores y líneas celulares de CG y CC en comparación con tejido normal en ambos casos, observándose que la expresión de este gen disminuye conforme avanza la enfermedad y esto se correlaciona negativamente con la sobrevida de los pacientes, mientras que no se observan alteraciones en la expresión de los genes *ATP2A1* y *ATP2A2*. Por otra parte, se sugiere que el uso de inhibidores de HDACs induce la expresión de *ATP2A3*. En el análisis de metilación de la región promotora de estos genes se observó que el gen *ATP2A1* presenta altos niveles de metilación sin cambios en muestras de tejido normal y en tejido tumoral y en los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* se observaron valores muy bajos de metilación y sin cambios entre muestras. En los genes que no se expresan o se encuentra disminuida su expresión mostraron una marcada disminución de las marcas de histonas transcripcionalmente activas, mientras que el gen *ATP2A2* mostró ganancia de estas marcas. En conclusión, el gen *ATP2A3* se encuentra disminuido en CG y CC y se correlaciona negativamente con la sobrevida de los pacientes, además, se sugiere que la alteración de la expresión de estos genes es regulada por modificaciones epigenéticas las cuales podrían servir en estudios futuros.

Palabras clave:

Calcio, *ATP2A1*, *ATP2A2*, *ATP2A3*, SERCA, cáncer, expresión génica, modificaciones epigenéticas.

ABSTRACT

Calcium (Ca^{2+}) signaling is fundamental in diverse cellular functions such as differentiation, proliferation, transcription, cell death, and metabolism, among others. The regulation of this signaling depends on several proteins, including the Sarco (endo) Plasmic Reticulum ATPases- Ca^{2+} (SERCA), and alterations of these SERCA enzymes facilitate the development of various diseases, such as cancer. This work aims to explore by bioinformatics analysis whether genes encoding for SERCA, *ATP2A1*, *ATP2A2*, and *ATP2A3* pumps are altered in tumor samples and gastric cancer (GC) and colon cancer (CC) cell lines and whether their expression is regulated by epigenetic mechanisms such as DNA methylation and histone post-translational modifications. The results show that the *ATP2A3* gene expression is decreased in tumor samples and cell lines of GC and CC compared to normal tissue in both cases, observing that the expression of this gene decreases as the disease progresses and this correlates with the survival of patients, while no alterations in the expression of *ATP2A1* and *ATP2A2* genes are observed. On the other hand, it is suggested that the use of HDAC inhibitors induces *ATP2A3* expression. In the analysis of methylation of the promoter region of these genes, it was observed that the *ATP2A1* gene shows high levels of methylation without changes in samples of normal tissue and tumor tissue, and in the *ATP2A2* and *ATP2A3* genes very low methylation values were observed, with no differences between samples. The genes that are not expressed or have decreased expression showed a marked decrease in transcriptionally active histone marks, while the *ATP2A2* gene showed a gain in these marks. In conclusion, the *ATP2A3* gene is found to be decreased in GC and CC and correlates with patient survival and suggests that the alteration of the expression of these genes is regulated by epigenetic modifications, which could be helpful in future studies.

Keywords:

Calcium, *ATP2A1*, *ATP2A2*, *ATP2A3*, SERCA, cancer, gene expression, epigenetic modifications.

I. INTRODUCCIÓN

La epigenética se define como el estudio de los cambios heredables en la expresión génica causada por mecanismos distintos a modificaciones en la secuencia del DNA (Sánchez et al., 2015). Estos mecanismos son esenciales para el desarrollo normal y mantenimiento de los patrones de expresión génica ya que una alteración de estos procesos epigenéticos puede conducir a la expresión génica alterada y a la transformación celular maligna (Sharma et al., 2010). Comprender todos estos mecanismos es de suma importancia ya que juegan un papel importante en la patogénesis de diversas enfermedades como el cáncer.

Diversos estudios han mostrado evidencia de que algunos de los genes desregulados en cáncer y que su expresión génica se encuentra alterada por mecanismos epigenéticos son aquellos que están implicados en la señalización del Ca^{2+} y esto es de gran importancia ya que el Ca^{2+} es un segundo mensajero que regula diversos procesos como son la señalización intracelular, ciclo celular, expresión génica, apoptosis, entre otros (Monteith et al., 2007; Roderick & Cook, 2008).

Unos de estos genes implicados en la señalización del Ca^{2+} son los que codifican para las enzimas SERCA, los cuales juegan un papel importante en estos procesos celulares. La expresión de estos genes se ha encontrada alterada, ya sea disminuida o ausente en diversas enfermedades, entre ellas, el cáncer y se ha mostrado evidencia de que estas alteraciones están reguladas por diferentes mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA y las modificaciones de histonas (Endo et al., 2004; Korosec et al., 2006; Pacifico et al., 2003; Papp et al., 2004). Entre los tipos de cáncer en que se han encontrado alteraciones de estos genes se encuentran el cáncer gástrico y de colon. Estos se encuentran entre los 10 tipos de cáncer con mayor tasa de incidencia y mortalidad a nivel mundial y nacional (GLOBOCAN, 2020) y además han servido para el estudio de cambios genéticos y epigenéticos debido al amplio rango de lesiones patológicas.

Sin embargo, hace falta conocer más sobre los mecanismos epigenéticos que están regulando la expresión de los genes SERCA en estos tipos de cáncer, por lo tanto, una mejor comprensión de las distintas modificaciones epigenéticas como la metilación y las modificaciones de histonas puede resultar útil desde la detección hasta el tratamiento del cáncer gástrico y de colon.

II. ANTECEDENTES

2.1 Regulación Epigenética

Este concepto de epigenética propuesto por Conrad Waddington en la década de 1950 hasta la actualidad se ha definido como el área de estudio de aquellos rasgos que se heredan de forma estable y surgen de cambios en los cromosomas que no resultan en alteración de la secuencia de nucleótidos (Berger et al., 2009). Actualmente, comprender todos los mecanismos involucrados en los estados epigenéticos es de suma importancia ya que juegan un papel importante en la patogénesis de las enfermedades como afecciones cardiovasculares, metabólicas, obesidad, inflamatorias, cáncer y en el proceso de envejecimiento (Daoud De Daoud, 2016)

Estas modificaciones pueden ser de naturaleza diversa y permiten incrementar o disminuir la expresión de un gen sin que esto afecte la secuencia del DNA. Entre estas se incluyen la regulación por RNAs no codificantes, las modificaciones postraduccionales de histonas como las acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones, ubiquitinaciones, entre otras. (Figura 1) (Maresca et al., 2015).

2.2 La metilación de citocinas en el DNA

Entre las diversas alteraciones epigenéticas la metilación es considerada como el principal mecanismo epigenómico implicado en cáncer. La metilación del DNA es una modificación catalizada por las enzimas DNA metiltransferasas o DNMTs (Corvalán, 2013). Esta modificación representa una unión covalente entre un grupo metilo y una citosina, la cual típicamente precede a una guanina en los dinucleótidos CpG (Figura 2). Este mecanismo puede ser a través de un fenómeno de hipometilación global o de hipermetilación localizada en el promotor de determinados genes. Los dos niveles de metilación pueden presentarse en forma individual o simultánea, en general, la hipermetilación está involucrada con el silenciamiento de genes y la hipometilación con la sobreexpresión de ciertas proteínas involucradas en los procesos de invasión o metástasis (Corvalán, 2013.)

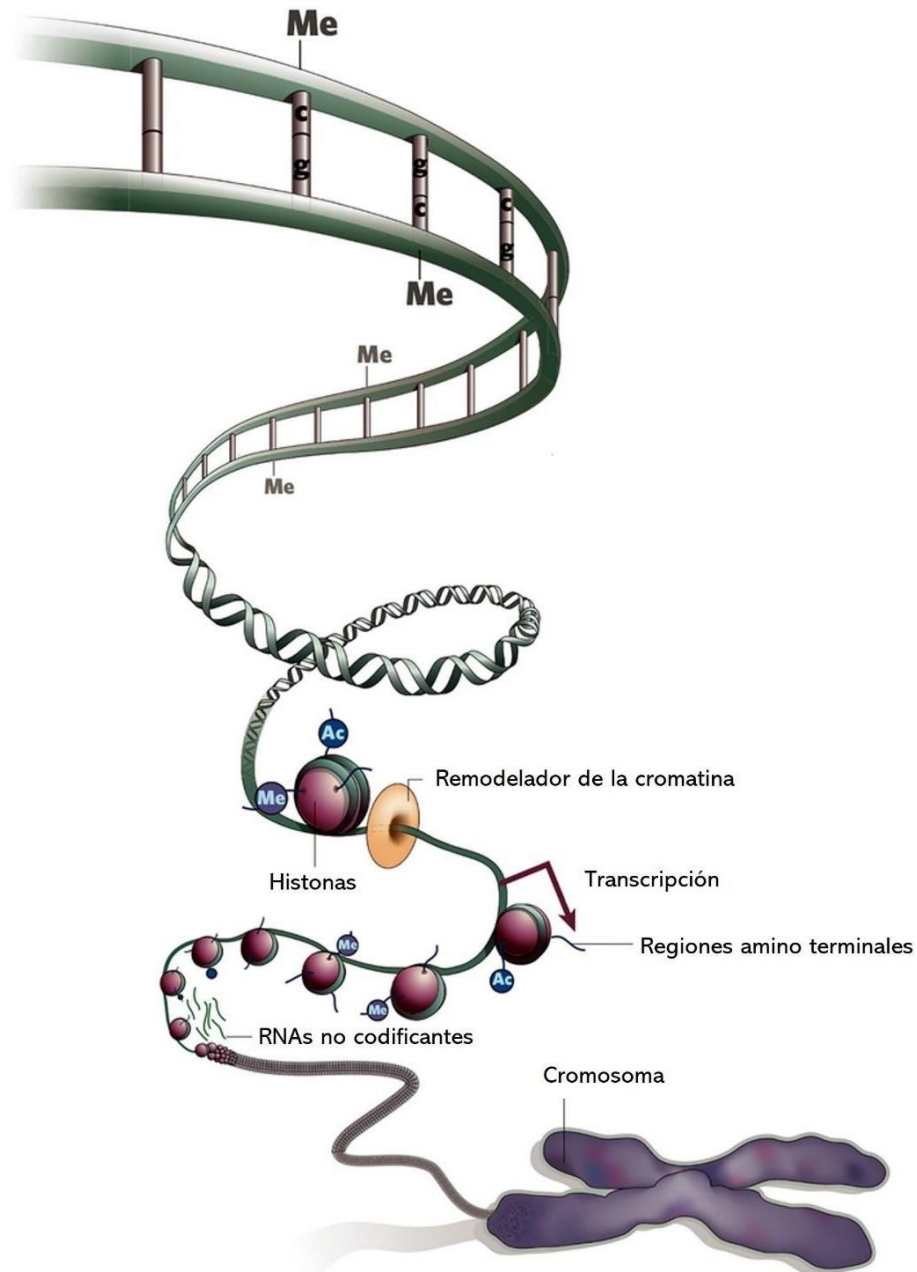


Figura 1. Modelo general de la regulación epigenética. La información estructural y de codificación en la secuencia de bases del DNA se organiza en la cromatina para formar múltiples epigenomas. La metilación de la citosina del DNA y las modificaciones covalentes de las colas de las histonas y las variantes de las histonas aportan información a las máquinas de remodelación nucleosomal que hacen que los genes y los RNA no codificantes sean susceptibles de transcripción. Los factores de transcripción (no mostrados) también juegan un papel importante en la competencia y organización del epigenoma (Tomada y modificada del Grupo de Trabajo sobre el Epigenoma Humano de la Asociación Estadounidense para la Investigación del Cáncer y la Unión Europea, Red de Excelencia, Consejo Asesor Científico (2008))

Los mecanismos efectores de silenciamiento de un gen metilado son dos, por un lado, la inhibición directa de la interacción entre promotor y factores transcripcionales y por otro lado la unión de proteínas que reconocen al DNA metilado, conocidas como “Methyl-CpG-binding proteins”, unen co-represores y estos además reclutan desacetilasas de histonas, generando una cromatina altamente compacta (Kelly et al., 2010; Kimura, 2013; Zaidi et al., 2010).

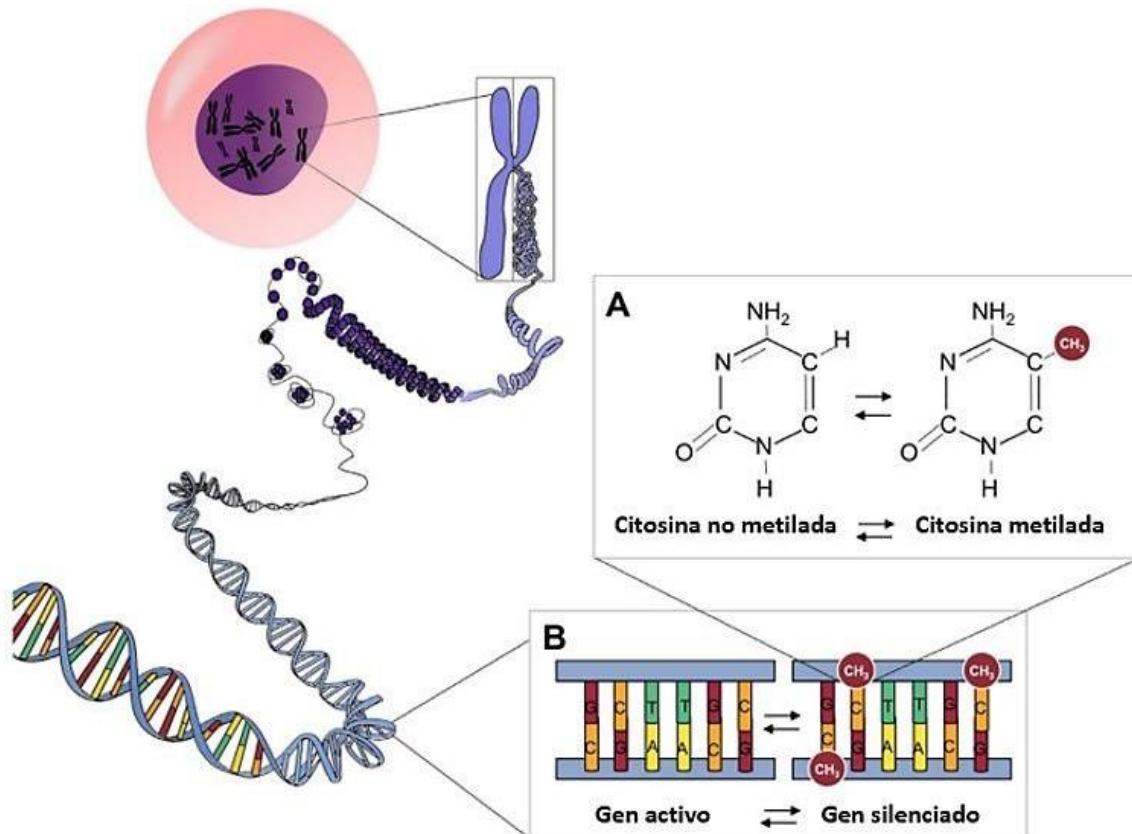


Figura 2. La metilación del DNA. Los cromosomas llevan la secuencia de DNA, esta secuencia de doble hélice, en la que cada cadena de DNA está compuesta por unidades más pequeñas denominadas nucleótidos. Los nucleótidos forman pares de bases, en los que la adenina (A) se empareja con la timina (T) y la citosina (C) con la guanina (G). Como se muestra en el recuadro A, la metilación del ADN se produce cuando se añade un grupo metilo (CH₃) a la citosina de un par de bases citosina-guanina (CpG) ligado a un fosfato. La eliminación de los grupos metilo puede llevarse a cabo mediante la conversión de la 5-metilcitosina en 5-hidroximetilcitosina. Como se muestra en el Recuadro B, cuando los CpGs están metilados, la expresión génica puede ser reprimida. Cuando los CpGs se desmetilan, la expresión génica puede verse reforzada (Tomado de Gillespie et al., 2019).

Se han identificado cuatro enzimas con actividad metiltransferasa, DNMT1, DNMT2, DNMT3a y DNMT3b. La DNMT1 se ha relacionado con la metilación de mantenimiento que tiene lugar tras cada ronda de replicación, para asegurar un patrón de metilación idéntico en ambas células hijas. Las DNMT3a y DNMT3b están implicados en la metilación *de novo*, que tiene lugar durante el desarrollo embrionario, siendo estas tres, las más importantes. Por otro lado, la DNMT2 muestra una actividad débil de DNA metiltransferasa *in vitro* y parece más involucrada en la metilación de tRNA (RNA de transferencia). Por último, otro miembro de la familia, DNMT3L (DNMT3-like) carece de actividad metiltransferasa, pero está directamente relacionada con la represión epigenética al reclutar actividad histona desacetilasa a promotores metilados, además, DNMT3L induce la actividad metiltransferasa de DNMT3a (Kelly et al., 2010; Kohli & Zhang, 2013).

En el genoma humano hay 56 millones de sitios CpG, de los cuales el 70-80% están metilados y corresponden al 4-6% de todas las citosinas, esto se correlaciona con la actividad transcripcional de los promotores asociados, es decir, las islas CpG están asociados a promotores muy activos, mientras que los promotores que no están asociados a islas CpG presentan menores niveles de transcripción (Jones, 2012; Kelly et al., 2010; Sharma et al., 2010).

Los genes activos usualmente están hipometilados en sitios de inicio transcripcional (TSS) y los altos niveles de metilación se encuentran en los cuerpos génicos para bloquear la iniciación de transcripciones aberrantes dentro de genes (Figura 3) (Li et al., 2007). En estudios de cáncer, se ha demostrado que la generación de patrones aberrantes de hipermetilación conduce a cambios en la estructura de la cromatina y al silenciamiento de genes supresores de tumores contribuyendo al fenotipo tumoral afectando diferentes procesos que se desregulan en cáncer como adhesión celular, proliferación, diferenciación y control del ciclo celular (Jones, 2012; Laurent et al., 2010; Zaidi et al., 2010). A pesar de ser potencialmente heredables, las modificaciones epigenéticas son reversibles. La metilación del DNA puede ser restituida por procesos de pérdida de metilación o desmetilación del DNA. Se han propuesto mecanismos de desmetilación pasiva que implicarían la pérdida de metilación durante la replicación del DNA por inhibición de la acción de DNMT1 sobre la cadena hemimetilada. De este modo y, tras varios ciclos de replicación, se conseguiría eliminar la metilación del DNA de esa región genómica. Otros mecanismos alternativos para explicar la re-expresión de genes silenciados por metilación, implican el proceso llamado desmetilación activa (Klose & Bird, 2006; Laurent et al., 2010).

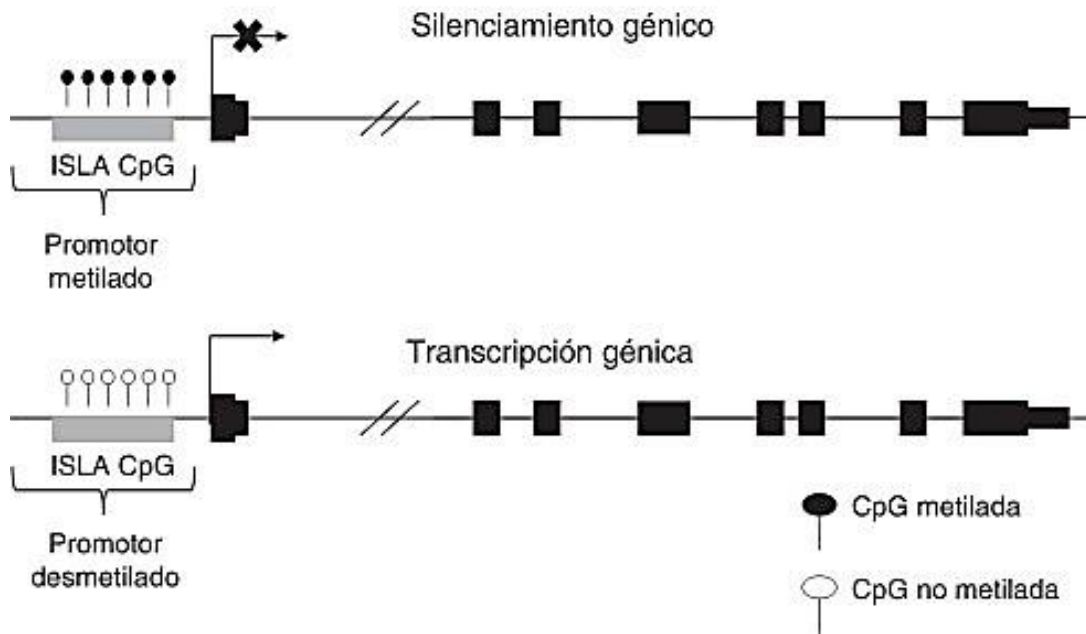


Figura 3. Metilación del DNA en las islas CpG. Esquema de un gen en 2 situaciones de regulación epigenética, el silenciamiento génico o inhibición de la transcripción y la transcripción génica a mRNA. La metilación de las islas CpG situadas en los promotores de los genes habitualmente inhibe los procesos de transcripción génica, con el resultado del silenciamiento del gen (Tomado de Mendioroz et al., 2015).

En los mamíferos, la desmetilación activa del DNA tiene lugar de manera dependiente de las proteínas TET (“Ten - Eleven Translocation”). Se conocen 3 miembros de esta familia (TET1, TET2 y TET3) los cuales oxidan a la 5 metilcitosina (5mC), a la 5 hidroximetilcitosina (5hmC), 5 formilcitosina y la 5 carboxilcitosina, seguido por la escisión de bases mediada por TDG (Thymine DNA Glycosylase) y reparación del DNA para generar una citosina no modificada. En otras palabras, en la hidroximetilación del DNA, un átomo de hidrógeno del grupo metilo de la 5mC es reemplazado por un grupo hidroxilo que genera un hidroximetilo (Kaas et al., 2013; Wu & Zhang, 2017). El descubrimiento de 5hmC y las enzimas TET sugieren importantes mecanismos de regulación en los distintos procesos biológicos, considerando la hidroximetilación del DNA un paso intermedio de la vía de desmetilación del DNA, aunquetambién se considera como una señal para factores moduladores de la cromatina. De esta manera, mientras que la metilación del DNA es generalmente asociada con la represión transcripcional, el DNA con marcas de 5hmC está relacionado con activación de la transcripción y se ha reportado enriquecido en elementos *enhancer* activos (Kaas et al., 2013; Wu & Zhang, 2017)

2. 3 Modificación de histonas

Las histonas son proteínas esenciales en el empaquetamiento del DNA en el núcleo e interviene en la regulación de la expresión génica. Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 conforman un octámero al que se pliega el DNA constituyendo los nucleosomas (Jenuwein & Allis, 2001; Kelly et al., 2010; Kondo, 2009). Las histonas además de empaquetar el DNA sufren cambios postraduccionales que modifican la compactación de la cromatina, estos cambios se dan en las regiones amino terminales de las histonas que son los extremos que sobresalen del nucleosoma y generalmente están más expuestos a dichas modificaciones, dentro de las que se incluyen metilación de los residuos de arginina (R) y lisina (K), acetilación en lisinas, ubiquitinación, sumoilación de lisinas y fosforilación de serinas y treoninas, entre otras (Jenuwein & Allis, 2001; Kelly et al., 2010; Kondo, 2009). Estudios han revelado que las histonas funcionan tanto positiva como negativamente en la regulación de la expresión génica, es decir, algunas modificaciones están asociadas a actividad transcripcional, conocidas como modificaciones de eucromatina, laxa y accesible a los factores de transcripción y otras están relacionadas a la inactivación de genes o regiones y se conocen como modificaciones heterocromáticas, compacta e inactiva (Figura 4) (Kimura, 2013; Li et al., 2007).

La acetilación de histonas juega un papel fundamental en la regulación de la expresión de los genes. Las enzimas denominadas lisina acetiltransferasas se encargan de añadir grupos acetilos a los residuos de lisina de proteínas específicas (Kurdistani & Grunstein, 2003).

Las histona-acetiltransferasas (HAT) actúan acetilando a las lisinas facilitando el acceso de factores de transcripción a regiones promotoras de la cromatina y se plasma en una mayor expresión génica. El proceso inverso, la desacetilación de las histonas es llevado a cabo por las desacetilasas de histonas (HDACs) las cuales producen una represión en la transcripción génica porque los factores de transcripción necesarios, factores regulatorios y el complejo de la RNA polimerasas son incapaces de tener acceso al DNA (Figura 4) (Kurdistani & Grunstein, 2003). Las HDACs identificadas desempeñan múltiples funciones celulares de gran importancia y se agrupan en cuatro categorías: clase I, II, III y IV. La clase I abarca las HDACs 1, 2, 3 y 8. Las HDACs 1, 2 y 3 forman parte de complejos multiproteicos nucleares cuya principal función es la represión de la transcripción y la participación en procesos de regulación epigenética, regulación del ciclo celular, en procesos de proliferación de células madre embrionarias y en el desarrollo correcto de órganos. La

HDAC 8 es el subgrupo menos conocido. La clase II se subdivide en clase IIA (HDAC 4,5,7 y 9) y clase IIB (HDAC 6,10) esta clase de HDACs, tras ser fosforiladas desempeñan funciones muy importantes en varias rutas de señalización, en la regulación de proteínas entre el citoplasma y el núcleo, la movilidad celular, la adhesión y la función de las chaperonas. Las HDAC de clase III, conocidas como sirtuinas participan en la regulación genética y epigenética, en la regulación del ciclo celular, proliferación, apoptosis y en algunas especies de animales llevan funciones como el retraso del envejecimiento. La clase IV comprende las HDAC 11 de las cuales no se dispone de mucha información (Belmonte, n.d.; Li et al., 2007).

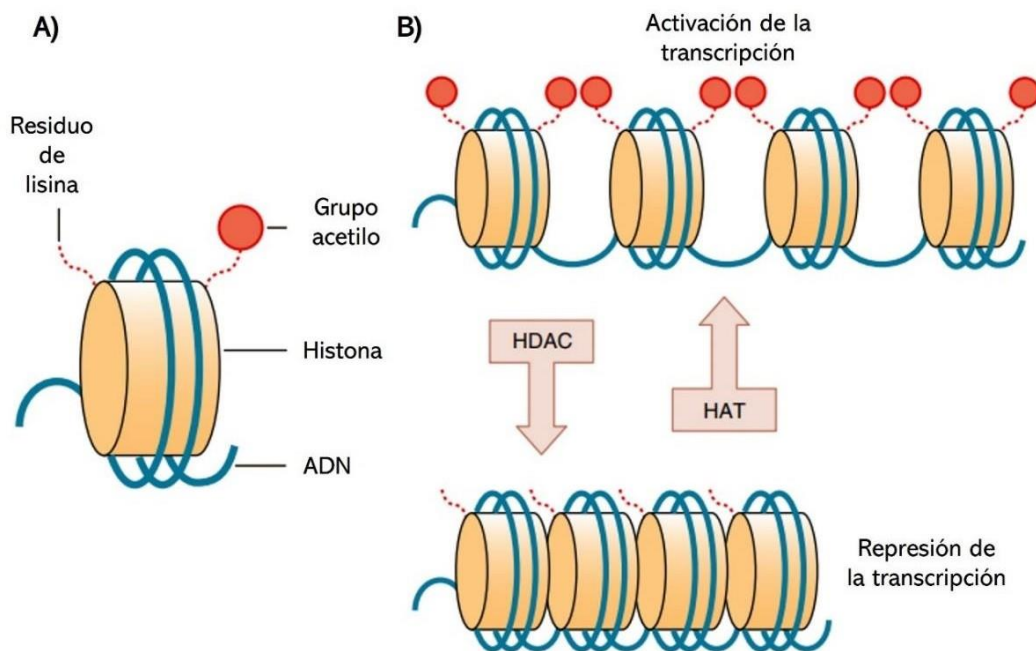


Figura 4. La modificación de histonas por acetilación/desacetilación. (A) El nucleosoma es la principal unidad estructural de la cromatina al que se pliega el DNA. Los grupos acetilos se unen a residuos de lisina en las histonas. (B) La modificación de las histonas por acetilación/desacetilación representa un mecanismo epigenético específico que regula la remodelación de la cromatina y, por tanto, influye en la transcripción de los genes. En particular, la adición de grupos acetilo en los residuos de lisina (acetilación), dada por las histonas acetiltransferasas (HAT), reduce la afinidad entre las histonas y el ADN, relajando la cromatina y activa los factores de transcripción. Por otro lado, la desacetilación inducida por las histonas desacetilasas (HDACs) conduce a un estado más compacto de la cromatina y, por tanto, a la represión de la transcripción de genes (Tomado y modificado de Felice et al., 2015).

Los principales sitios de acetilación en la histona H3 son K9, K14, K18, K23 y K27 y se correlaciona esencialmente con la activación transcripcional, localizándose en los sitios de inicio de la transcripción y/o en los potenciadores o *enhancers* de genes transcritos activamente, siendo H3K9ac y H3K27ac marcas activas mayormente estudiadas en las histonas (Kimura, 2013).

Las histonas también pueden ser metiladas, en donde la metilación resulta del balance entre enzimas metil transferasas (HMTs) y desmetilasas (HDMTs). La metilación de las histonas afecta a lisinas que pueden ser mono, di o trimetiladas y también modifica a las argininas sujetas a mono o dimetilación. Esta marca se asocia tanto a activación como a represión transcripcional, por ejemplo, la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3) y la di y trimetilación de H3K27 se asocian con dominios de heterocromatina transcripcionalmente inactivos. Por otro lado, la trimetilación de H3K4 y H3K36, así como la metilación de argininas (R) en posición H4R3 y H3R2, se asocian con promotores transcripcionalmente activos (Berger et al., 2009; Kimura, 2013).

Se ha reportado que la metilación del DNA favorece la desacetilación de las histonas a través del reclutamiento de desacetilasas de histonas que remueven grupos acetilo unidos a los residuos de lisinas en las histonas debido a la unión de proteínas al DNA metilado promoviendo el empaquetamiento de la cromatina y en consecuencia el bloqueo de la transcripción (Belmonte, n.d.).

La combinación de todas estas modificaciones según el aminoácido en que se den o el número de modificaciones por residuo condicionan la interacción con los complejos proteicos efectores de los que depende la actividad transcripcional de los genes afectados (Berger et al., 2009).

Estas alteraciones epigenéticas son reversibles ya sea en el contexto fisiológico con la participación de las diversas enzimas o por medio del tratamiento con fármacos inhibidores de las HDACs o DNMTs permitiendo el restablecimiento de los niveles de expresión génica normales. Por ejemplo, unos de los agentes desmetilantes, 5-Azacitidina (Vidaza) y 5-aza-2'deoxicitidina (Dacogen), ambos compuestos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration), actúan bloqueando la actividad de las DNMTs e interrumpiendo el mantenimiento de los patrones de metilación aberrantes restaurando los niveles normales de metilación (Beaulieu et al., 2002; Robert et al., 2003). Por otro lado, el uso de agentes inhibidores de HDACs como SAHA (ácido suberoilánilido hidroxámico) o TSA (tricostatina

A) ha demostrado un efecto sinérgico en combinación con agentes desmetilantes en la reversión de la metilación aberrante de genes supresores tumorales. (Kirschbaum et al., 2011; Stathis et al., 2011).

2.4 Epigenética y cáncer

La alteración de los patrones epigenéticos normales está considerada como una característica intrínseca del desarrollo tumoral y entre las consecuencias de estos cambios epigenéticos se encuentran la alteración de la transcripción del DNA, la activación aberrante de determinados genes, la predisposición a la inestabilidad génica y el silenciamiento de genes implicados en el inicio y progresión del cáncer (Gonzalo et al, 2008). Entre estos genes se incluyen aquellos que a través de diferentes vías regulan varias funciones celulares como el crecimiento, metabolismo, el ciclo celular, la proliferación, la expresión génica y la muerte celular, entre otras (Monteith et al., 2007; Roderick & Cook, 2008).

Todas las alteraciones en estos mecanismos surgen desde estadios o etapas tempranas de la enfermedad y se van acumulando durante el progreso de esta. En cáncer se ha observado alteraciones como cambios en los patrones de metilación del DNA que generan una reprogramación del epigenoma y una alteración en los patrones de expresión de determinados genes, por ejemplo, por un lado se produce la hipermetilación de genes supresores de tumores que afecta a los procesos que se desregulan en cáncer, como la proliferación celular, adhesión, diferenciación, control del ciclo celular, entre otros y por otro lado la hipometilación global del DNA generando el desarrollo, progresión y metástasis de las células tumorales (Esteller, 2007, 2008).

Por otra parte, las alteraciones en las modificaciones de histonas también participan en el desarrollo tumoral y actúan en sinergia con las alteraciones de metilación promoviendo el fenotipo tumoral. Por ejemplo, la trimetilación de H3K9 (H3K9ac) una marca de heterocromatina se ha asociado a la expresión génica aberrante en cáncer y la acetilación del mismo residuo H3K9ac se asocia con inicios de transcripción activos que protege al DNA de ser metilado (Derks et al., 2009). En cáncer de próstata y ovario se ha correlacionado la disminución de la marca H3K9ac con la progresión tumoral mientras que el aumento de H3K9me3 se asocia con el desarrollo de otros tumores (Pogribny et al., 2007). En cáncer de mama, colon, gástrico, pulmón, entre otros, se han reportado alteraciones en las modificaciones epigenéticas y se han asociado desde el desarrollo hasta

la metástasis tumoral (Gélébart et al., 2002; Izquierdo et al., 2020; Flores et al., 2017., Korosec et al., 2006, 2009; Pacifico et al., 2003).

Algunos de los genes desregulados en todos estos tipos de cáncer y que su expresión génica se encuentra alterada por mecanismos epigenéticos son aquellos que están implicados en la señalización del Ca^{2+} , los cuales son fundamentales para mantener la homeostasis del calcio intracelular y las diversas funciones celulares, de ahí la importancia de una mejor comprensión de la epigenética y su relación con la señalización del Ca^{2+} . (Izquierdo et al., 2020; Monteith et al., 2007).

2.5 El ion calcio

Existen diversos agentes involucrados en las señales esenciales para el buen funcionamiento celular, entre ellos se encuentra el ion calcio (Ca^{2+}) (Brini & Carafoli, 2009). El Ca^{2+} es un segundo mensajero que juega un papel fundamental en diversas funciones del organismo, modificando sus funciones intracelulares y activando diversas vías de señalización, estas funciones van desde el origen de la vida celular en la fertilización hasta el proceso de muerte celular programada. Entre estos dos eventos la participación de Ca^{2+} es importante en la contracción muscular, diferenciación, proliferación, transcripción de genes, síntesis, plegamiento de proteínas y generación de combustibles en diversas vías metabólicas, esto a través de la activación/represión de vías de señalización celular o por proteínas dependientes de Ca^{2+} (Figura 5) (Berridge et al., 2003; Brini & Carafoli, 2009; Monteith et al., 2007; Roderick & Cook, 2008).

Los principales compartimentos del almacenamiento y regulación del Ca^{2+} intracelular son tanto el retículo endoplásmico (RE) de todos los tipos celulares, como el sarcoplásmico (RS) en las células musculares y la correcta distribución de Ca^{2+} en los espacios intra- y extracelulares hace que para su uso y movilización se requieran bombas y canales especializados y la influencia del estado de despolarización o repolarización celular (Izquierdo et al., 2019, 2020).

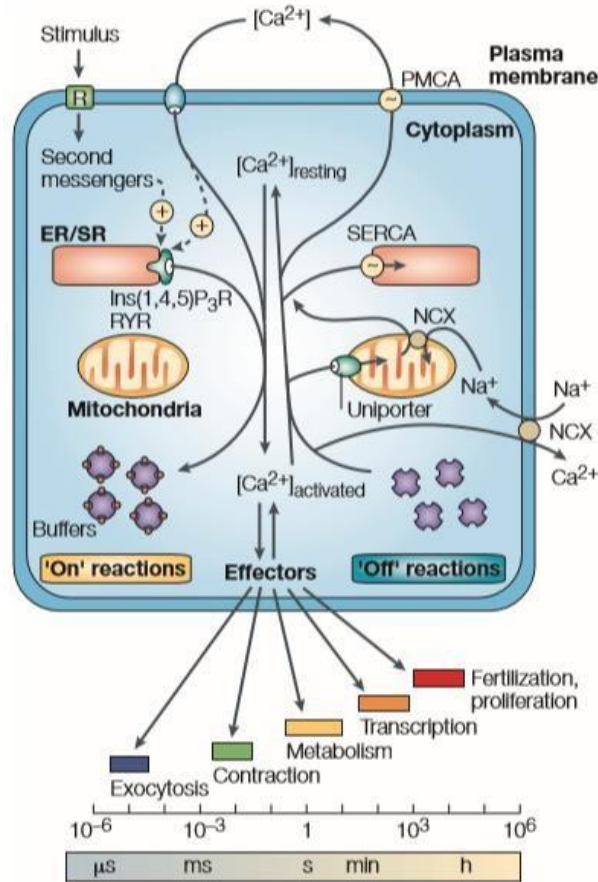


Figura 5. Ion calcio como segundo mensajero. Durante las reacciones “ON” los diferentes estímulos inducen tanto la entrada de Ca^{2+} externo y la formación de segundos mensajeros que liberan el Ca^{2+} interno que se almacena en el retículo endoplásmico/sarcoplásmico (RE/RS). El Ca^{2+} se une a los efectores que activan varios procesos celulares. Durante las reacciones “OFF” el Ca^{2+} es eliminado de la célula mediante varios intercambiadores y bombas. El intercambiador Na^+/Ca^+ (NCX) y la ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) transportan el Ca^{2+} hacia el exterior, mientras que las bombas SERCA bombea Ca^{2+} hacia el interior del RE (Tomado de Berridge et al., 2003).

Se conocen cuatro grandes grupos de proteínas que participan directamente en la homeostasis del Ca^{2+} celular: canales de Ca^{2+} , ATPasas de Ca^{2+} , proteínas intercambiadoras de Ca^{2+} y las proteínas que unen Ca^{2+} (Figura 6). Los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática y del RE/RS facilitan la difusión de Ca^{2+} a favor de un gradiente de concentración; por ejemplo, el receptor de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3R), el cual se encuentra en la membrana del RE/RS y conduce a la liberación de Ca^{2+} de los sitios de almacenamiento intracelular. Las ATPasas de Ca^{2+} son enzimas que transportan Ca^{2+} en contra del gradiente de concentración a expensas de la hidrólisis de ATP. Las

ATPasas de Ca^{2+} del retículo sarco (endo) plásmico (SERCA) transportan el Ca^{2+} del citoplasma hacia el lumen de este organelo; mientras que las de la membrana plasmática (PMCA) transportan el Ca^{2+} del citoplasma al espacio extracelular (Brini & Carafoli, 2009). En el tercer grupo se encuentra el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática de células excitables que utiliza el gradiente de Na^+ para transportar el Ca^{2+} al exterior de la célula (Monteith et al., 2007) y el último grupo son las proteínas que unen Ca^{2+} como la calcineurina que es una proteína fosfatasa del citoplasma dependiente de calmodulina que tiene un dominio de unión con el Ca^{2+} y la calsecuestrina que es una proteína del RE/RS que une Ca^{2+} para regular el flujo del calcio hacia el citoplasma, así como su disponibilidad dentro del mismo (Zarain et al., 2011).

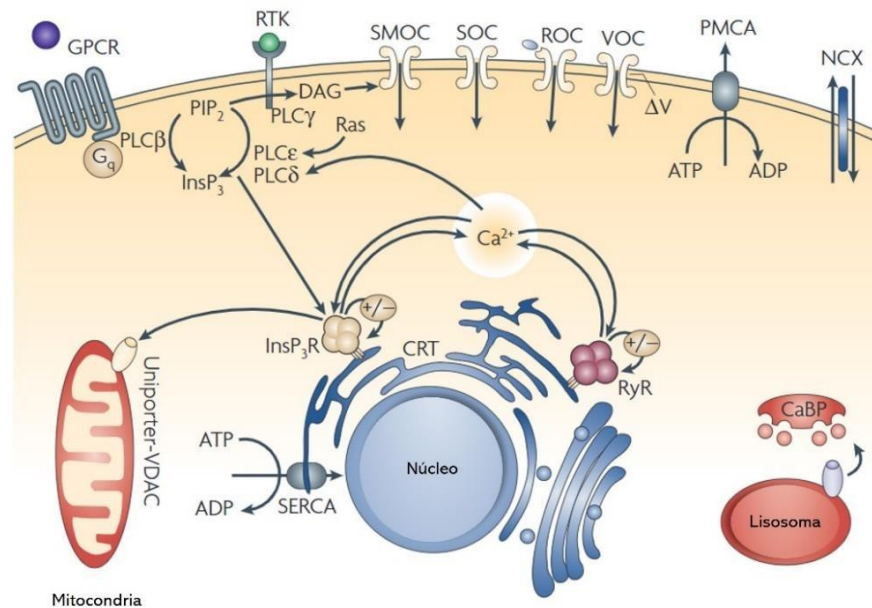


Figura 6. Proteínas que participan en la homeostasis del Ca^{2+} . En respuesta a un cambio en su entorno, los niveles de Ca^{2+} intracelulares aumentan e inducen cambios en la fisiología celular. Las señales de Ca^{2+} se generan como resultado de la afluencia desde el espacio extracelular a través de canales localizados en la membrana plasmática (canales operados por receptores (ROC), canales operados por voltaje (VOC), canales operados por segundos mensajeros (SMOC) y canales operados por almacenes (SOC)) o mediante la liberación de almacenes intracelulares, a través de (InsP₃R) o (RyR). Los canales y bombas de Ca^{2+} también se expresan funcionalmente en los lisosomas y el Golgi. Las señales de Ca^{2+} debe volver a los niveles preestimulados, ya que la elevación sostenida de calcio es dañina para la célula y esto lo hace a través de la acción de las proteínas tampón de Ca^{2+} citosólicas (CaBPs), las mitocondrias, las bombas SERCA y PMCA, así como a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (Tomado de Roderick & Cook, 2008).

La cantidad y duración del flujo del Ca^{2+} van a determinar el tipo y duración de sus efectos en la señalización celular (Izquierdo et al., 2020). Las concentraciones de Ca^{2+} , en estado de reposo, varían para cada compartimento celular: en el citosol la concentración es aproximadamente 10-100 nM, pero a través de la movilización de los almacenes intracelulares (como el RE/RS, Golgi o lisosomas), o la entrada a través de la membrana plasmática, puede incrementar a concentraciones mayores a 1 μM (Roderick & Cook, 2008); en el RE/RS que es el principal reservorio de este catión al interior celular la concentración es de 100-500 μM , mientras que en el espacio extracelular es aproximadamente 1-2 mM (Brini & Carafoli, 2009; Monteith et al., 2007; Zarain et al., 2011).

Después de que el Ca^{2+} ha llevado a cabo sus funciones de señalización, la célula no puede permanecer en estado activado por mucho tiempo (Figura 6), ya que la elevación sostenida de Ca^{2+} es dañina para la célula llevando a la activación permanente de enzimas perjudiciales como proteasas, fosfolipasas y nucleasas. Lo cual conducirá a varios grados de incomodidad celular hasta la muerte, esto provocando diversas alteraciones patológicas, entre ellas se incluyen enfermedades musculoesqueléticas, neurológicas, neurodegenerativas, cardiomiopatías, cáncer, entre otras (Berridge et al., 2003; Brini & Carafoli, 2009; Roderick & Cook, 2008).

2.6 Ion calcio y cáncer

Diversos estudios han mostrado evidencia que las células cancerosas remodelan la expresión de los componentes de la señalización de calcio, aunque su importancia se ejemplifica más en las decisiones de vida o muerte celular (Berridge et al., 2003; Monteith et al., 2007; Roderick & Cook, 2008).

El Ca^{2+} desempeña un papel importante a lo largo del ciclo celular de los mamíferos y es especialmente importante al principio de G1, en las transiciones G1/S y G2/M, esto debido a que las células son más sensibles al agotamiento del Ca^{2+} extracelular en G1, en el que el Ca^{2+} es importante para la expresión de los genes tempranos inmediatos, como *FOS*, *JUN* y *MYC*, y más tarde hacia el límite G1, donde el Ca^{2+} es necesario para la fosforilación del retinoblastoma (RB1) (Berridge et al., 2003; Monteith et al., 2007; Roderick & Cook, 2008).

La tumorigénesis confiere un conjunto de rasgos o características distintivas del cáncer, como la autosuficiencia en las señales de crecimiento y la evasión de la apoptosis, en donde

algunas células transformadas y líneas celulares tumorales muestran una menor dependencia del Ca^{2+} para mantener la proliferación y mantener la metástasis lo que ha llevado a sugerir que la pérdida de la dependencia del Ca^{2+} proliferativo es un indicador de tumorigenicidad, además, en diversos estudios se ha observado aumentos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la muerte celular apoptótica demostrando que son necesarios para que se produzca la apoptosis (Berridge et al., 2003; Roderick & Cook, 2008).

Algunos estudios sugieren que algunos de los cambios que sustentan la remodelación de la señalización de Ca^{2+} reflejan cambios epigenéticos en la expresión de los genes y/o cambios postraduccionales en las propiedades de los componentes de señalización existentes, siendo este un proceso en que las vías dependientes de oncogenes pueden remodelar las señales de Ca^{2+} y el Ca^{2+} puede refinar la señalización regulada por oncogenes, adquiriendo las células cancerosas mayor capacidad de supervivencia. (Berridge et al., 2003; Monteith et al., 2007; Roderick & Cook, 2008).

Aún existe una serie de retos enfocados en la señalización del Ca^{2+} en cáncer lo que permitirá determinar objetivos principales para la intervención terapéutica. En años recientes se ha evidenciado la importancia de los diferentes canales y bombas de Ca^{2+} y su participación en cáncer, entre ellos, las bombas SERCA, así como las diferentes modificaciones epigenéticas que están implicados en esta enfermedad (Korosec et al., 2009; Papp & Brouland, 2011).

2.7 Las bombas de Calcio SERCA

Las bombas de calcio SERCA son las proteínas encargadas de transportar Ca^{2+} del citoplasma hacia el interior del RE/RS y están formadas por una sola cadena de aproximadamente 1000 aminoácidos, con una masa molecular aproximada de 110kDa (Figura 7) (Wuytack et al., 2002) y su correcta expresión y función, así como el trabajo en conjunto con el canal de Ca^{2+} o IP3R y el receptor de rianodina (RyR) mantienen el equilibrio del Ca^{2+} citoplasmático y del RE/RS evitando alterar la expresión de genes, la proliferación celular, causar toxicidad o muerte celular (Gelebart et al., 2002; Legrand et al., 2001; Papp & Brouland, 2011).

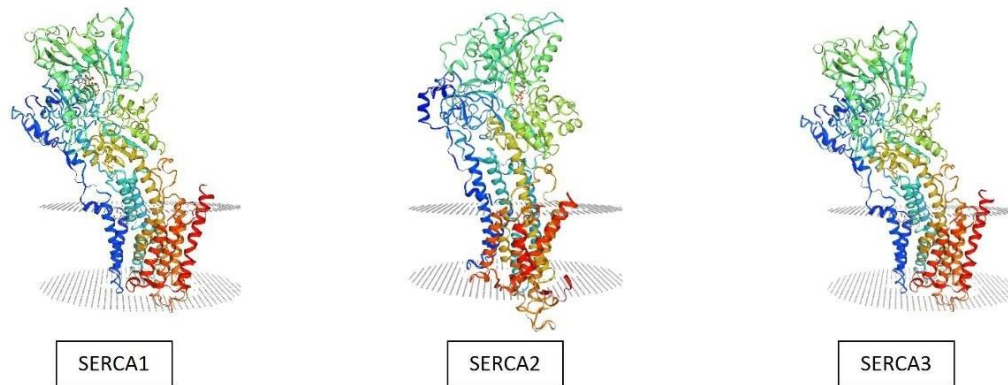


Figura 7. Estructura 3D de las enzimas SERCA. Representación de las bombas de calcio SERCA (Imágenes obtenidas de Uniprot y Protein Data Bank (2021)).

La estructura de estas enzimas SERCA consta de 4 dominios principales: un dominio M formado por 10 alfa-hélices transmembranales y 3 dominios citosólicos que conforman la cabeza globular de la enzima: el dominio de unión al nucleótido (N), el dominio de fosforilación (P) y juntos forman el dominio catalítico y el dominio accionador (A). El dominio A y el dominio P están conectados al dominio M, que rodean el sitio de unión al Ca^{2+} (McLennan et al. 1985; Toyoshima et al., 2000). El dominio P está cargado negativamente y contiene el residuo Asp351 que es sitio de autofosforilación por el ATP. El dominio N está cargado positivamente y se ubica entre dos segmentos del dominio P; en él se encuentran los residuos Phe487, Lys515, Lys492, Arg560 y Thr441 que se han identificado como componentes importantes para la unión del ATP. El dominio A es un segmento localizado entre las hélices transmembrana M2 y M3, es un dominio con alta movilidad lo que le permite adquirir distintas posiciones para regular la unión y la liberación de Ca^{2+} (Figura 8) (Toyoshima & Nomura, 2002).

Estas bombas SERCA transportan dos iones Ca^{2+} en contra de un gradiente de concentración y para ello pasan por un complejo ciclo catalítico que involucra dos estados conformacionales de la proteína (Brini & Carafoli, 2009). En la primera etapa del ciclo, dos iones Ca^{2+} se unen al dominio M en E1 (estado de alta afinidad), casi de inmediato el ATP se une a un residuo de Lys515 localizado en el dominio N. La enzima tiene un cambio conformacional que favorece el acercamiento del ATP, del dominio N al P para fosforilar un residuo de ácido aspártico generando un intermediario fosforilado (E1P), posteriormente la enzima cambia su conformación de E1P a E2P (estado de baja afinidad) quedando el Ca^{2+} expuesto hacia el interior del lumen del RE o RS, se produce la liberación de Ca^{2+} y la

hidrólisis del intermediario fosforilado. Tras la disociación del intermediario fosforilado la enzima SERCA vuelve a su conformación E1 para iniciar otro ciclo catalítico (Figura 9) (Brini & Carafoli, 2009).

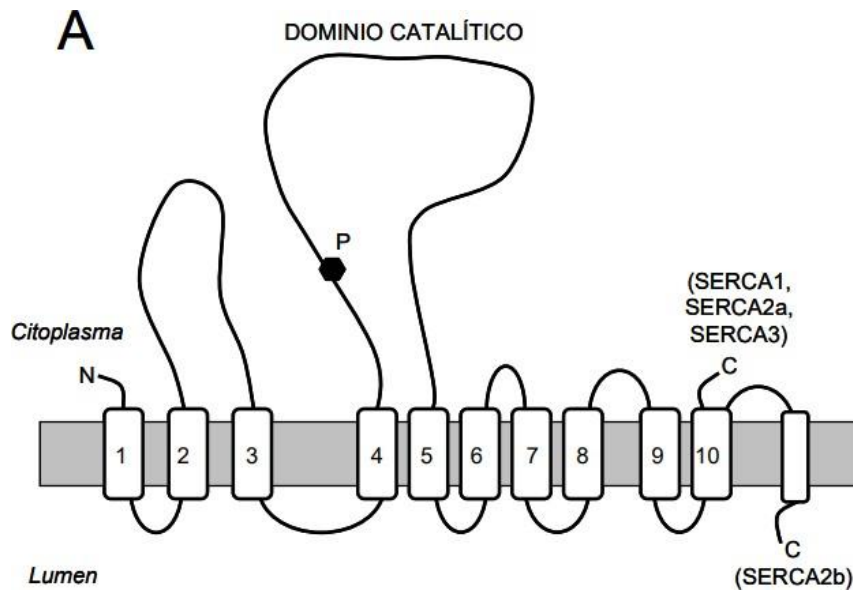


Figura 8. La estructura de las enzimas SERCA. Representación esquemática de las bombas SERCA1, SERCA2b, y SERCA3, mostrando los segmentos transmembranales numerados, el dominio catalítico, el sitio de fosforilación (P) y el extremo C-terminal para las distintas isoformas (Tomado de Sepúlveda, 2006).

Se han descrito tres genes que codifican para las enzimas SERCA, *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*, cuyos mensajeros dan origen a diversas isoformas a través del splicing alternativo (Figura 10) (Brini & Carafoli, 2009; Wuytack et al., 2002).

El gen *ATP2A1*, que codifica para SERCA1 se localiza en el brazo corto del cromosoma 16 en la banda 12.1, comprende 12.29 kb, contiene 23 exones y se expresa exclusivamente en músculo esquelético de contracción rápida (Wuytack et al., 2002) dando origen a dos isoformas por la edición alterna del RNA mensajero (mRNA), SERCA1 que se expresa en adultos y está formado por 994 aminoácidos y SERCA1b que se expresa en etapa neonatal formado por 1001 aminoácidos (Brandl et al., 1987; Korczak et al., 1988).

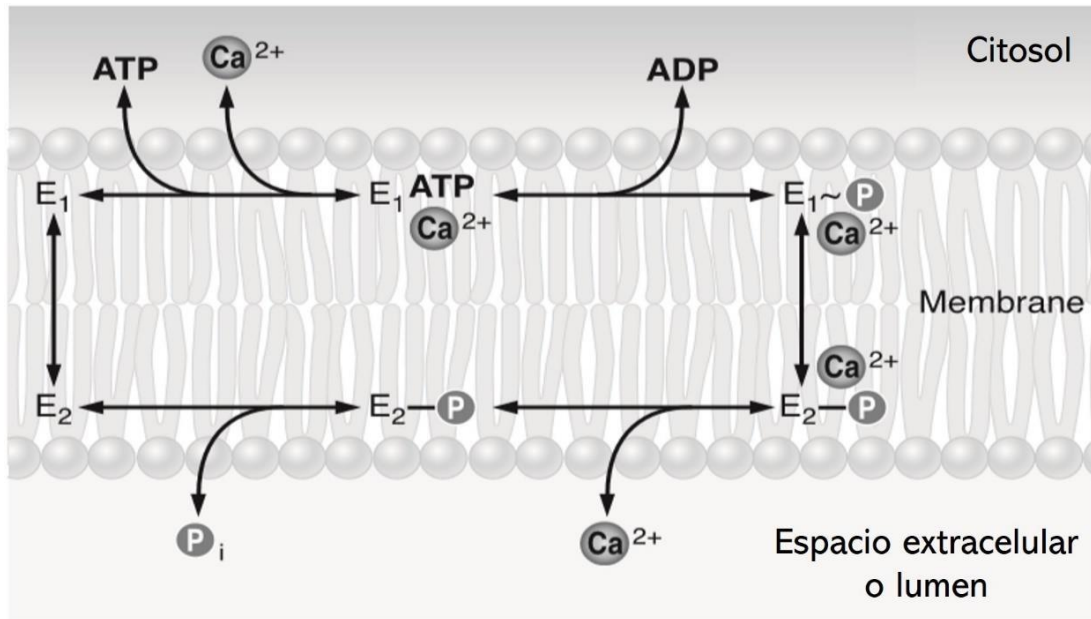


Figura 9. Esquema de reacción del ciclo catalítico de las enzimas SERCA. Las bombas existen en dos estados conformacionales principales: E1 se une a Ca^{2+} con alta afinidad en el sitio citosólico y E2 tiene una baja afinidad por el Ca^{2+} por lo tanto, lo libera en el interior del RE. El ATP fosforila un residuo de ácido aspártico muy conservado, permitiendo la translocación del Ca^{2+} (Tomado y modificado de Brini & Carafoli, 2009).

El gen *ATP2A2* se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 (12q23-24), abarca 65.69 kb y se encuentra organizado en 22 exones y por splicing alternativo da origen a 3 isoformas, SERCA2a, SERCA2b y SERCA2c. La isoforma SERCA2a con 997 aminoácidos se expresa predominantemente en el músculo cardíaco, en el músculo esquelético de contracción lenta y también se expresa en niveles bajos en músculo liso y en tejidos no musculares. SERCA2b con 1042 aminoácidos, muestra una expresión ubicua, con alta expresión en músculo liso y en células no musculares, mientras que SERCA2c con 999 aminoácidos se expresa durante la diferenciación monocítica y en algunos tipos no musculares (Contreras et al., 2010.; Wuytack et al., 2002)

El gen *ATP2A3* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 en la banda 13.3 y comprende 40.59 kb y está formado por 22 exones y por splicing alternativo se generan 6 isoformas SERCA3a-f de aproximadamente 100 kDa (Dode et al., 1998; Martin et al., 2002). Todas estas isoformas, SERCA3a (999 aa), SERCA3b (1023 aa), SERCA3c (1024 aa), SERCA3d (1044 aa), SERCA3e (1052 aa) y SERCA3f (1033 aa) se expresan

diferencialmente entre los tejidos, teniendo una expresión marcada en células endoteliales, hematopoyéticas y pancreáticas y siempre se co-expresan con la isoforma SERCA2b (Chandrasekera et al., 2009). La expresión de SERCA3 también varía según el grado de maduración de las células en donde se ha observado que durante este proceso en los tejidos analizados su expresión incrementa conforme aumenta el grado de diferenciación (Brouland et al., 2005; Gélébart et al., 2002; Lacabartz-Porret et al., 2000; Papp et al., 2004).

Estas enzimas SERCA también difieren en la afinidad y capacidad de transporte de Ca^{2+} . La isoforma SERCA2b tiene mayor afinidad por Ca^{2+} pero menor velocidad catalítica que SERCA2a; mientras que SERCA3 tiene menor afinidad por Ca^{2+} que la enzima SERCA2b, pero mayor capacidad de transporte de Ca^{2+} . Tanto las enzimas SERCA3 como SERCA1 poseen mayor velocidad catalítica que las enzimas de SERCA2 (Tabla 1) (Lytton et al., 1992; Martin et al., 2002).

El correcto funcionamiento de estas bombas SERCA mantiene la homeostasis del calcio, pero al encontrarse mutaciones en estos genes o alteraciones en su expresión pueden llevar al desarrollo de diversas enfermedades como musculares, cardíacas e incluso cáncer.

Diversos autores han estudiado estas bombas y han reportado mutaciones en el gen *ATP2A1* en pacientes con la enfermedad de Brody que es una enfermedad muscular que se caracteriza por la rigidez de los músculos especialmente después de una actividad intensa necesitando mayor tiempo para relajarse por completo. En esta enfermedad las mutaciones producen una proteína trunca con pérdida de la función de SERCA1a y como resultado el Ca^{2+} no se transporta de vuelta al RS después de su liberación (Odermatt et al., 1997).

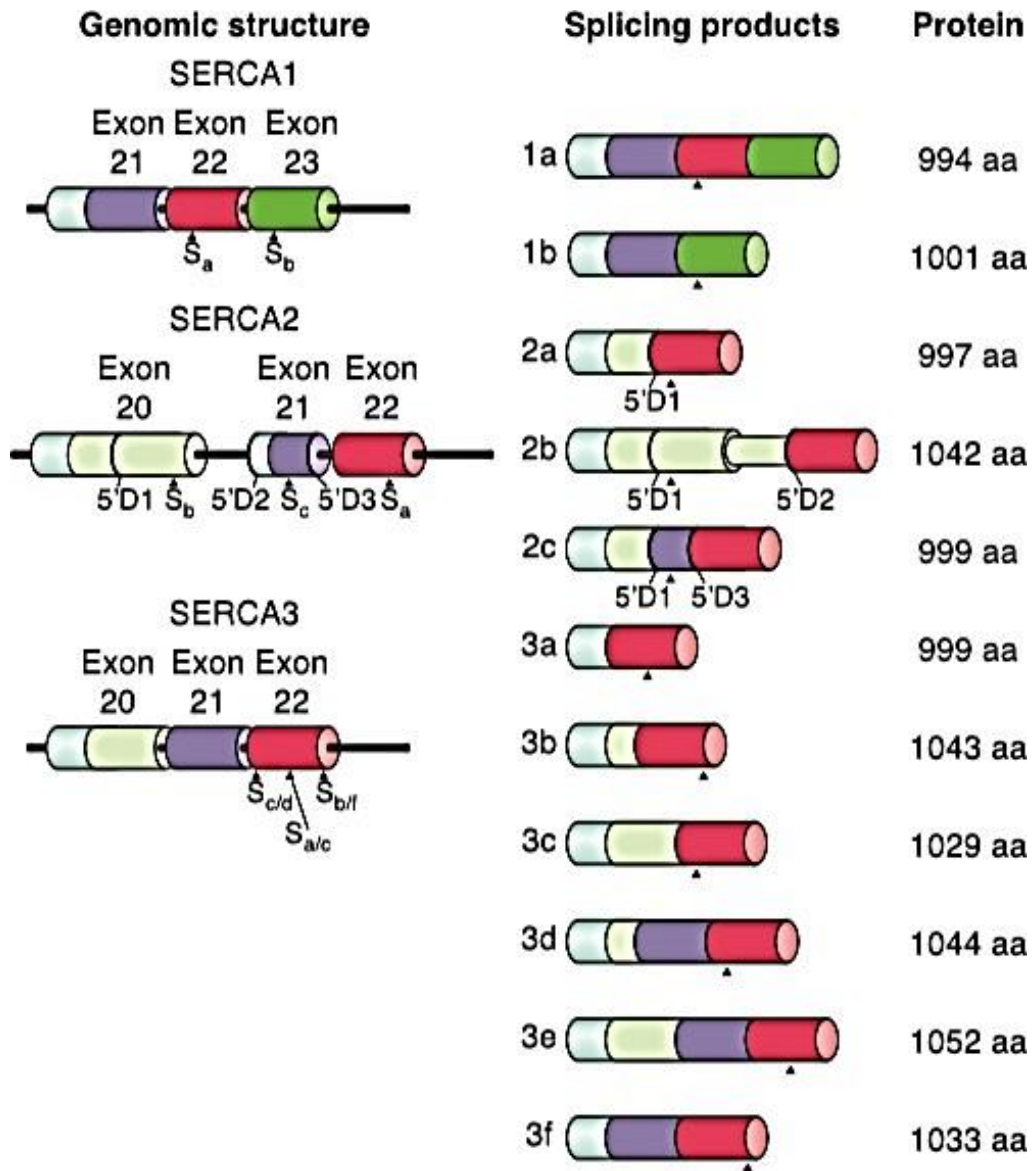


Figura 10. Generación de múltiples isoformas de SERCA por splicing alternativo de los genes ATP2A1-3. Los cilindros de colores representan los exones y los intrones están representados por las líneas negras. El cilindro más delgado en el transcrito de SERCA2 representa un pseudoexón que no se traduce a proteína. 5'D1, 5'D2 y 5'D3 indican los sitios donadores para el splicing que da lugar a los transcritos de SERCA2a, b y c respectivamente. Sa-f indica la posición de los diferentes codones de paro para generar las isoformas. El tamaño de los productos proteicos se indica en la derecha (Tomado de Brini & Carafoli, 2009).

Tabla 1. Parámetros bioquímicos de las isoformas de las bombas SERCA

Isoforma de SERCA	K _{0.5} (μM)	Velocidad de hidrólisis de ATP (s ⁻¹)	Velocidad de disociación de calcio (s ⁻¹)
SERCA1a	0.32 ± 0.02 ^a 0.31 ± 0.02 ^b	95 ^a 130 ^c	27 ^{a, b}
SERCA2a	0.21 ± 0.01 ^b	70 ^c	23 ^b
2b	0.13 ± 0.01 ^b	35 ^c	2.5 ^b
2c	**c	36 ^c	ND
SERCA3a	1.47 ± 0.17 ^a	132 ^a	85 ^a
3b	1.27 ± 0.10 ^a	149 ^a	73 ^a
3c	1.57 ± 0.14 ^a	134 ^a	73 ^a

^a Estudio de SERCA1 y SERCA3 (Dode et al., 2002);

^b Estudio de SERCA1 y SERCA2 (Dode et al., 2003); ND. - No detectada

^c (Dally et al., 2006) El valor de K_{0.5} reportado es 0.604 el cual es muy similar al reportado para 2b 0.508, sin embargo, no se coloca en la tabla porque no se encuentra en el mismo orden de magnitud que los ya citados (Tomado de Flores, 2017).

También se ha reportado disminución de la expresión de SERCA2a en modelos animales y humanos con insuficiencia cardiaca e hipertrofia a nivel de mRNA y de proteína resultando en la disminución del transporte de Ca²⁺ hacia el lumen del RE (Frank et al., 2003; Hasenfuss, 1998) y, además, se han encontrado mutaciones en el gen *ATP2A2* en pacientes con la enfermedad de Darier, esta enfermedad es una disqueratosis folicular caracterizada por pequeñas erupciones en la piel y estas mutaciones en este gen llevan a la disminución de la concentración del Ca²⁺ en el RE/RS (Ahn et al., 2003; Bchetnia et al., 2009; Miyauchi et al., 2006).

Por otra parte, se ha reportado disminución o ausencia de la expresión de las proteínas SERCA2 y SERCA3 en muestras de tumores y en líneas celulares de cáncer oral, próstata, pulmón, tiroides, mama, colon y gástrico y una mayor expresión de este gen en las células epiteliales normales (Endo et al., 2004; Korosec et al., 2006; Pacifico et al., 2003).

2.8 Enzimas SERCA y Cáncer

En diversos estudios se ha evidenciado la relación de las enzimas SERCA y cáncer. La primera evidencia de esto se dio por Liu et al., (2001) quienes observaron que ratones mutantes con una copia funcional de *ATP2A2* desarrollaron cáncer en células escamosas de estómago, mucosa oral y piel y a partir de ahí diversas investigaciones han demostrado que la expresión de los genes SERCA se encuentra alterada en cáncer, ya sea que se encuentre disminuida o casi nula. Por ejemplo, un grupo determinó la participación del gen *ATP2A2* en la carcinogénesis en el epitelio escamoso oral a nivel de mRNA y proteína en tumores y en líneas celulares y los resultados sugirieron que la regulación a la baja de *ATP2A2* es un evento temprano durante el desarrollo del carcinoma oral y que la metilación del DNA podría estar desempeñando un papel en la inactivación del gen (Endo et al., 2004). En otro estudio, investigaron la expresión de SERCA2b en tejido tiroideo y en líneas celulares de ratas normales y transformadas por varios oncogenes, observando que en tiroides normal SERCA2b se expresó a un nivel más alto que en otros tejidos no musculares como hígado o bazo y que en células tiroides altamente tumorigénicas la expresión de mRNA de SERCA2b disminuyó drásticamente (Pacífico et al., 2003).

Gélébart et al., (2002) informaron que la expresión de SERCA3 se reduce o se pierde significativamente en los carcinomas de colon en comparación con las células epiteliales colónicas normales, que expresan esta enzima a un nivel alto, adicionalmente, para estudiar la participación de las enzimas SERCA en la diferenciación, se investigó el cambio en la expresión de SERCA y para ello se trataron líneas celulares de cáncer gástrico y de colon con butirato y otros agentes inductores de diferenciación y observaron la inducción marcada de SERCA3, mientras que la expresión de SERCA2 ubicua no cambió significativamente en ambas líneas.

Por otro lado, en tejido de mama y de colon la expresión de SERCA3 es abundante, pero se ha visto que disminuye notablemente conforme va progresando el desarrollo del tumor en cáncer de mama, mucosa gástrica y colon (Gélébart et al., 2002a; Korosec et al., 2006; Papp et al., 2004; Papp & Brouland, 2011). Adicionalmente se estudió la expresión de estos genes después del tratamiento con inhibidores de desacetilasas de histonas en líneas celulares de cáncer de colon, gástrico, mama y pulmón, observando que se induce la expresión de SERCA3 y esto lleva a un fenotipo diferenciado en las líneas de cáncer de colon y gástrico (Contreras et al., 2016; Gelebart et al., 2002; Papp & Brouland, 2011).

Por lo tanto, el cáncer de colon y el cáncer gástrico han servido para el estudio de cambios genéticos y epigenéticos debido al amplio rango de lesiones patológicas y la observación de las células tumorales ha permitido establecer que en el origen de estas enfermedades las alteraciones epigenéticas pueden ser tan importantes como las modificaciones genéticas, contribuyendo a la progresión y desarrollo del cáncer (Sharma et al., 2010; Valeri et al., 2009).

Dada la importancia de la homeostasis del Ca^{2+} y la participación de las bombas SERCA en cáncer, una mejor comprensión de las distintas modificaciones epigenéticas puede resultar útil desde la detección hasta el tratamiento del cáncer gástrico y de colon.

2.9 El cáncer gástrico y el cáncer de colon

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todos los países del mundo y la carga de la incidencia y la mortalidad está creciendo rápidamente (Sung et al., 2021).

Con base a las estimaciones de incidencia y mortalidad por cáncer producidas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer GLOBOCAN 2020, los 10 tipos de cáncer más frecuentes son el cáncer de mama, pulmón, próstata, colorrectal y estómago; ocupando el cáncer colorrectal el tercer lugar a nivel mundial en incidencia y el segundo lugar en mortalidad y el cáncer de estómago el quinto lugar en incidencia y el cuarto en mortalidad (Figura 11). A nivel nacional, el cáncer en México se encuentra como la tercera causa de muerte, sólo después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes, ocupando el cáncer de colon el tercer lugar en incidencia, pero el segundo en mortalidad y el cáncer gástrico el sexto lugar en incidencia y mortalidad (Figura 12) (Sung et al., 2021).

Por otra parte, de acuerdo con la estimación realizada por la Sociedad Americana del Cáncer (Siegel et al., 2022), el número de muertes por cáncer que se espera en 2022 sólo en Estados Unidos es de aproximadamente 1,918,030 casos, el equivalente a unos 5,250 nuevos casos cada día, con una estimación de 26,380 nuevos casos y 11,090 muertes estimadas de cáncer gástrico y 106,180 nuevos casos y 52,580 muertes estimadas de cáncer de colon para ambos sexos (Siegel et al., 2022).

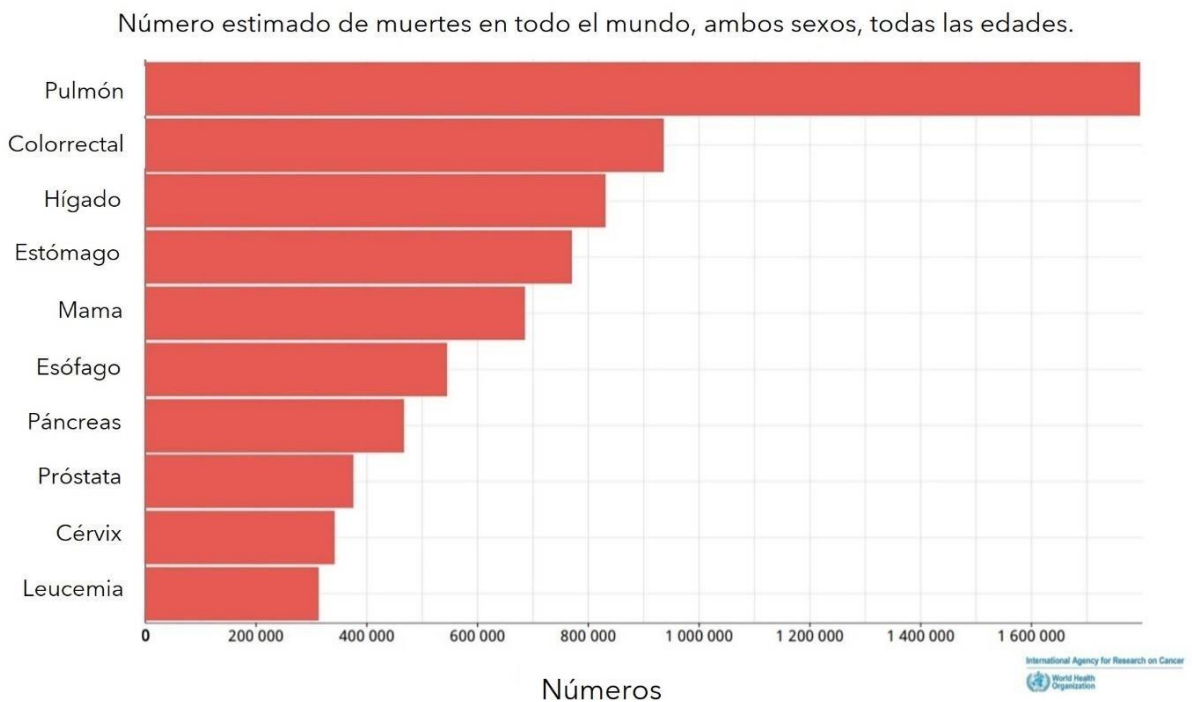
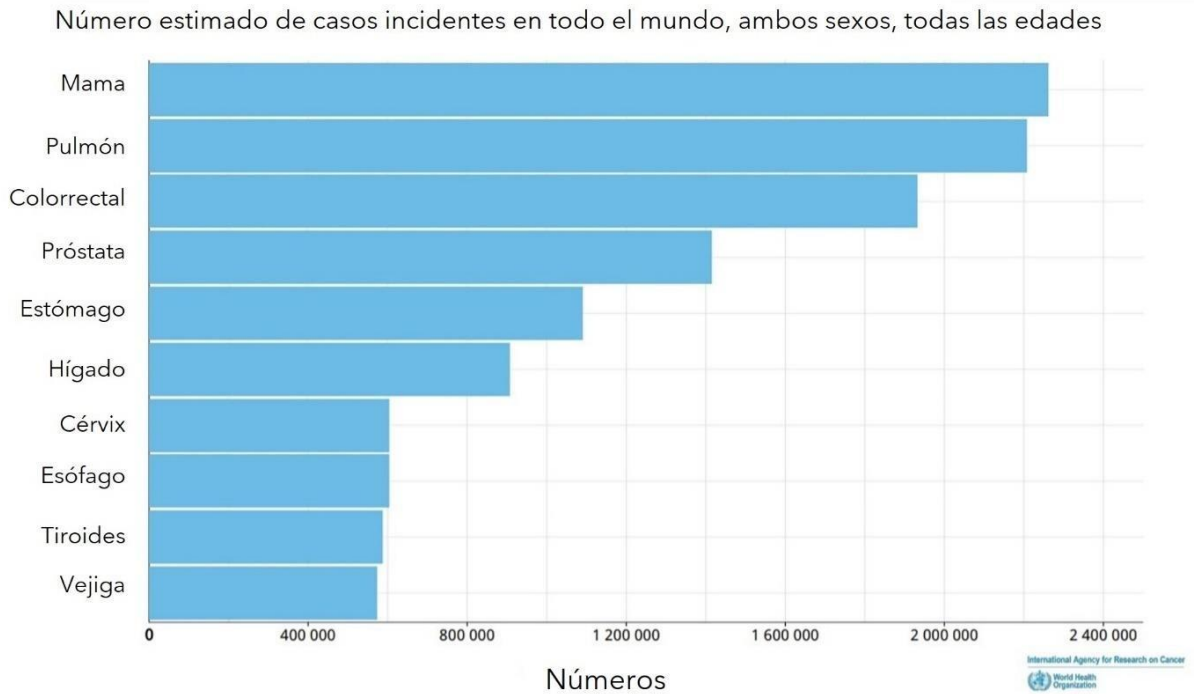


Figura 11. Distribución de casos y muertes a nivel mundial por los 10 tipos de cáncer más comunes en 2020 (ambos sexos, todas las edades). Los 10 tipos de cáncer se muestran en orden descendente. Fuente: GLOBOCAN 2020

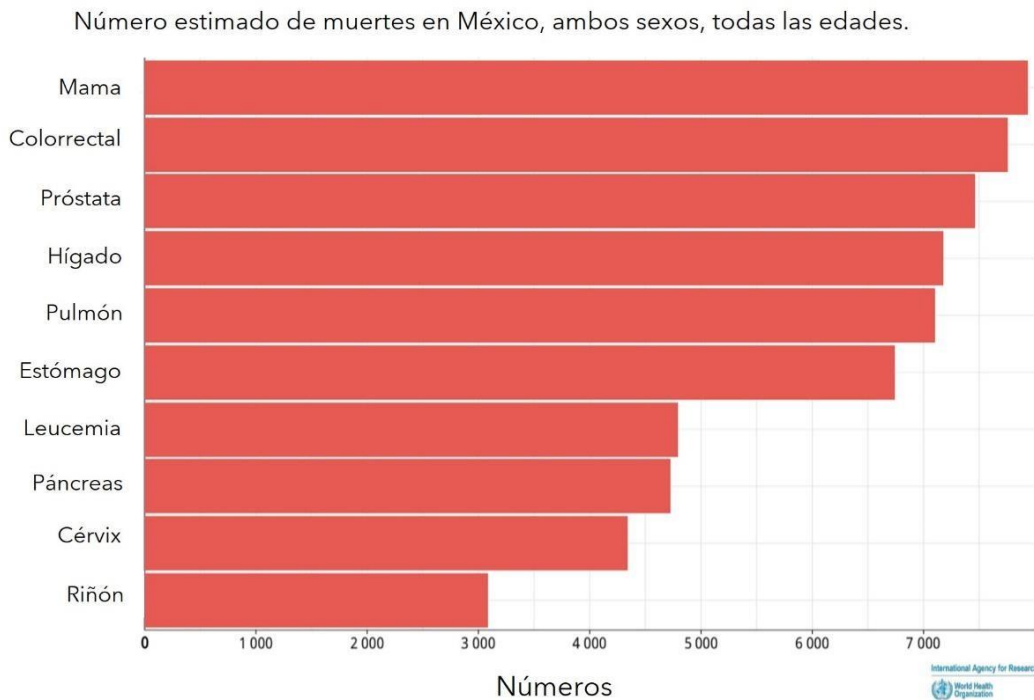
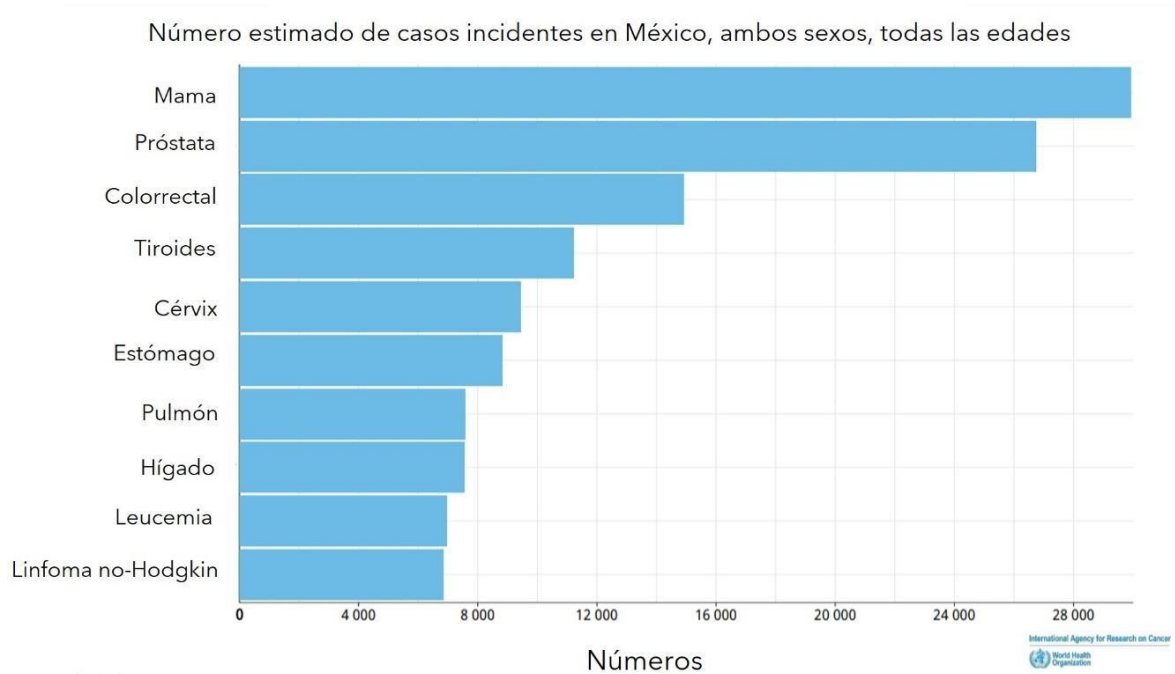


Figura 12. Distribución de casos y muertes en México por los 10 tipos de cáncer más comunes en 2020 (ambos sexos, todas las edades). Los 10 tipos de cáncer se muestran en orden descendente. Fuente: GLOBOCAN 2020

El cáncer de estómago, también conocido como cáncer gástrico, es el crecimiento anormal de las células que surge en alguna de las capas del estómago. La mayoría de los cánceres gástricos se originan en la mucosa, siendo el adenocarcinoma el tipo histológico más frecuente (> 90% de los casos), por tanto, al hablar de cáncer gástrico se hace referencia en general, al adenocarcinoma gástrico. Otros tipos histológicos de menor incidencia son los linfomas, los sarcomas, los tumores del estroma gastrointestinal (GIST), los tumores neuroendocrinos y los melanomas (Smyth et al., 2016).

El riesgo de desarrollar un cáncer gástrico aumenta a partir de los 50 años y es máximo en la séptima década de la vida, siendo 2 veces más frecuentes en varones que en mujeres (Smyth et al., 2016).

Las causas exactas del cáncer gástrico no se conocen, aunque se sabe que existen factores de riesgo que favorecen su aparición, como factores nutricionales, factores ambientales, tabaco, enfermedades o condiciones predisponentes como gastritis crónica atrófica, anemia perniciosa, infección por *H. pylori*, el reflujo gastroesofágico y factores genéticos (Martin-Richard et al., 2015; Smyth et al., 2016).

Los diferentes tipos de cáncer se clasifican por etapas o estadios, la clasificación más empleada para el cáncer gástrico es el TNM de la UICC/AJCC: T por Tumor, N por ganglios (Nodes en inglés) y M por Metástasis. Para establecer los estadios, se tienen en consideración el nivel de afectación de la pared gástrica como el número de ganglios afectados por el tumor (Tabla 2) (American Joint Committee on Cancer, 2017).

El cáncer de colon es una enfermedad desarrollada por medio de la mucosa del colon, la cual contiene un pólipo que evoluciona por diferentes causas y se convierte en tumor maligno, normalmente las células malignas se localizan en el intestino grueso (Reyes et al., 2020) y es la afección cancerosa más común del tubo digestivo. El 60% de los casos de cáncer de colon se diagnostican cuando la enfermedad ya se encuentra avanzada a nivel regional o a distancia (metástasis) siendo este el principal factor que influye en la supervivencia global, pero cuando el diagnóstico se efectúa en etapas tempranas (estadios I y II) la supervivencia global puede superar el 90% (Tabla 3) (Reyes et al., 2020).

Tabla 2. Descripción de los estadios tumorales de cáncer gástrico.

ESTADIOS	DESCRIPCIÓN
Estadio 0 o carcinoma in situ	Etapa más inicial del cáncer, se localiza en la parte más superficial de la mucosa.
Estadio I	El tumor invade la capa más profunda de la mucosa (lámina propia) o la submucosa sin afectación de ganglios linfáticos (estadio IA) o con afectación de 1 a 6 ganglios (IB), o invade la capa muscular o la subserosa sin afectación ganglionar (IB). No hay metástasis a distancia.
Estadio II	Etapa intermedia. Tiene mejor pronóstico que el III.
Estadio III	Etapa intermedia.
Estadio IV	Etapa más avanzada. Peor pronóstico. Existe metástasis a distancia en hígado, pulmón, huesos, ovarios, ganglios alejados del estómago, etc.

La etiología del cáncer de colon es multifactorial, la gran mayoría de los pacientes con cáncer de colon siguen siendo quienes tienen 50 años o más y las tasas son un 30% mayores en hombres que en mujeres y se ha demostrado que los factores del estilo de vida, incluida la dieta, se asocian con el riesgo de cáncer de colon. La obesidad es un problema de salud con una alta prevalencia y múltiples repercusiones (Reyes et al., 2020) y se relaciona con el síndrome metabólico que se define por un conjunto de factores de riesgo cardio-metabólico y se asocia con un mayor riesgo de incidencia y mortalidad del cáncer de colon (Zauber et al., 2012).

Tabla 3. Descripción de los estadios tumorales de cáncer de colon.

ESTADIOS	DESCRIPCIÓN
Estadio 0	El cáncer se limita a la capa interna del colon.
Estadio I	El cáncer ha crecido, atravesado la mucosa e invadido la capa muscular del colon. No se ha diseminado a los tejidos cercanos o ganglios linfáticos
Estadio II	El cáncer ha crecido y atravesado la pared del colon, pero no se ha diseminado a los tejidos o ganglios linfáticos cercanos (IIA). El cáncer ha crecido a través de las capas musculares hasta llegar al revestimiento del abdomen, denominado peritoneo visceral. No se ha diseminado (IIB).
Estadio III	El cáncer ha crecido a través del revestimiento interno o en las capas musculares del intestino, se ha diseminado hacia 1 a 3 ganglios linfáticos o hacia un ganglio del tumor en tejidos que rodean el colon (IIIA). El cáncer ha crecido a través de la pared intestinal o en los órganos circundantes y en 1 a 3 ganglios, o hacia un ganglio del tumor en tejidos que rodean el colon (IIIB). Independientemente de la profundidad con que se extendió el cáncer de colon, se ha diseminado a 4 o más ganglios linfáticos, pero no a otras partes distantes del cuerpo (IIIC).
Estadio IV	El cáncer se ha diseminado a uno o más órganos distales.

Esto representa un grave problema de salud, por lo tanto, el progreso contra el cáncer se ha acelerado en la última década debido a los avances en la detección temprana, las técnicas quirúrgicas y la variedad de terapias dirigidas (Sung et al., 2021). Sin embargo, es necesario ampliar el conocimiento en investigación en cáncer porque aún constituye una causa relevante en cuanto al número de muertes.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La correcta distribución del Ca^{2+} en los espacios intra y extracelulares es importante para el buen funcionamiento celular y para ello se requieren bombas y canales que mantienen su homeostasis y entre ellos se encuentran las bombas SERCA. La expresión de estas bombas SERCA se encuentra disminuida o ausente en muestras de tumores y líneas celulares de diversos tipos de cáncer. Actualmente se conocen estas alteraciones en cáncer gástrico y de colon, sin embargo, faltan más estudios para entender cómo se está regulando la expresión de estos genes y qué mecanismos epigenéticos están involucrados en su expresión. Estudiar esto, resultará útil como estrategia desde la prevención hasta el tratamiento de estos tipos de cáncer. Para ello, mediante análisis bioinformáticos a partir de bases de datos públicas se plantea responder las siguientes preguntas de investigación:

¿La expresión de los genes que codifican para las bombas SERCA está alterada en muestras de tumores y en líneas celulares de cáncer gástrico y de colon? ¿Su expresión es regulada por mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA o acetilación/metilación de histonas en la región promotora en cáncer gástrico y de colon?

III. HIPÓTESIS

La expresión de los genes que codifican para la bomba SERCA disminuye conforme progresa el tumor, siendo menor la expresión en etapas avanzadas de la enfermedad asociándose negativamente con la supervivencia de los pacientes con cáncer gástrico y de colon y estos cambios de la expresión son regulados por mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA y por la actividad de las desacetilasas de histonas en la región del promotor de estos genes.

IV. OBJETIVO GENERAL

Estudiar mediante análisis bioinformático la expresión y las modificaciones epigenéticas involucradas en la regulación de la expresión de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en tumores y en diferentes líneas celulares de cáncer gástrico y cáncer de colon.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Analizar la expresión de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en biopsias de cáncer gástrico y de colon mediante análisis bioinformático de RNA-seq y microarray.
- 2.- Analizar la relación entre la expresión de las bombas de calcio SERCA y el pronóstico de sobrevida en pacientes con cáncer gástrico mediante el plotter Kaplan-Meier.
- 3.- Determinar mediante análisis *in silico* el estado de metilación del promotor de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en tumores y en líneas celulares de cáncer gástrico y de colon.
- 4.- Investigar mediante análisis bioinformático en bases de ChIP-seq la presencia de marcas de histonas presentes en el promotor de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer gástrico y de colon.

VI. METODOLOGÍA

Análisis bioinformático en bases de datos públicas

Para el análisis bioinformático se utilizó el sitio del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), un centro dentro de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Institutos Nacionales de Salud (Cañedo et al., 2009) conformado por un amplio y diverso banco de bases de datos, herramientas y otros medios que permite la búsqueda simultánea de información generalmente de carácter público sobre los más diversos aspectos de las ciencias de la vida y la salud. Este sistema busca contenido de toda su red de bases de datos integradas incluidos PubMed, GenBank, Genomas, Taxonomía y muchos otros, una de estas bases es el Gene Expression Omnibus (GEO) (Cañedo et al., 2009; Clough & Barrett, 2016).

Análisis de expresión por microarray en Phantasus

Para el análisis de expresión en Phantasus se utilizaron los siguientes datos de microarray obtenidos de GEO: GEO: GSE79973 (He et al., 2016), GSE10950 (Jiang et al., 2008) y GSE22061 (Liu et al., 2010) (Tabla 4). Los datos fueron transformados en Log₂, normalizados por cuantil y posteriormente se colapsaron las sondas para eliminar aquellas que reconocían el mismo gen, esto se realizó mediante Maximum Median Probe y por el Gene ID. Para realizar el análisis de expresión de genes se empleó la paquetería Limma, este software permite leer, normalizar y explorar dichos datos (Ritchie et al., 2015). Finalmente, los datos se filtraron y seleccionaron los genes de interés que presentaron un valor de P ajustado <0.05, considerándolos estadísticamente significativos.

Análisis de expresión de RNA-seq en la plataforma Galaxy

Para analizar datos de RNA-seq se empleó el Sequence Read Archive (SRA), una base de datos de acceso público disponible en NCBI que almacena datos de secuenciación en bruto e información para mejorar la reproducibilidad y facilitar nuevos descubrimientos a través de análisis de datos (Liononen et al., 2011). Desde esta base se descargaron los archivos con las listas de accesos: GSE136630 (Orouji et al., 2022) y GSE144259 (Ji et al., 2020) (Tabla 4) y se importaron los archivos a Galaxy Europe (<https://usegalaxy.eu/>) para realizar los análisis. Los datos usados para iniciar estos análisis corresponden a muestras pareadas y simples que provienen de estudios en los que analizan la expresión de genes de cáncer de colon. Se debe realizar el análisis de calidad de las secuencias para asegurar la calidad

de los análisis posteriores, identificando cualquier tipo de problema que afecte los datos de interés y eliminarlo o excluirlo del análisis, también para retirar los adaptadores, que son pequeños oligonucleótidos unidos a los extremos de las secuencias de interés durante la secuenciación. Para el análisis de calidad se utiliza el software Trim-galore! y el software FASTQC que indica la calidad de la secuencia base a base, el contenido de GC por base y por secuencia, entre otras cosas. Para el análisis de datos de RNA-seq, el alineamiento se realizó empleando la paquetería HISAT2 (Genoma de referencia: Human (homo sapiens): hg38full).

Análisis de supervivencia general en conjunto de datos de cáncer gástrico

Para evaluar la importancia de la expresión de los genes de las bombas de calcio SERCA en el pronóstico de supervivencia en pacientes con cáncer gástrico se utilizó el plotter Kaplan-Meier (<https://kmplot.com/analysis/index.php?p=service>), una base de datos en línea en la cual el número de pacientes en términos de mortalidad se reporta en el área inferior de la gráfica principal, en conjunto con las tasas de riesgo (Hazard ratios, HR) en intervalos de confianza (confidence intervals, CI) del 95%, junto con los correspondientes valores P (log-rank test). Para el análisis del valor pronóstico de los genes las muestras se dividieron en grupos con expresión alta y baja para cada gen.

Análisis de metilación del promotor.

Para el análisis de metilación del promotor de los genes se obtuvieron los siguientes conjuntos de datos desde NCBI: GSE25869 (Kwon et al. 2011) y GSE27130 (Kim et al. 2011) (Tabla 4) y se analizaron en GEO2R que permite comparar dos o más grupos de muestras dentro de un único experimento GEO, para esto se analizaron sondas de la región del promotor TS1500 (ubicada de -1500 a -200 pb del TSS) para cada gen. Se obtuvieron los códigos cg para cada gen de interés y el análisis estadístico se realizó en GraphPad Prism8. Se realizaron pruebas no pareadas con corrección de Welch y se consideró un valor de P ajustado <0.05 estadísticamente significativo.

Análisis de marcas de histonas en bases de ChIP-seq en Galaxy

Para analizar los datos de ChIP-seq se empleó el SRA disponible en NCBI (Liononen, 2011). Como se realizó en el análisis de expresión, se descargaron los archivos con las listas de accesos: GSE76153 (Ooi et al., 2016), GSE136888 (Orouji et al., 2022) y GSE106921 (Teng et al., 2020) (Tabla 4) y se importaron a Galaxy Europe (<https://usegalaxy.eu/>) para procesar los datos de ChIP-Seq. Se realizó el análisis de

calidad en FastQC y para el análisis de los datos de ChIP-seq el alineamiento se realizó empleando la paquetería Bowtie2. Para la visualización de los datos se accedió a WashU (<http://epigenomegateway.wustl.edu/browser/>) para visualizar las marcas de histonas de eucromatina H3K27ac y H3K4me3.

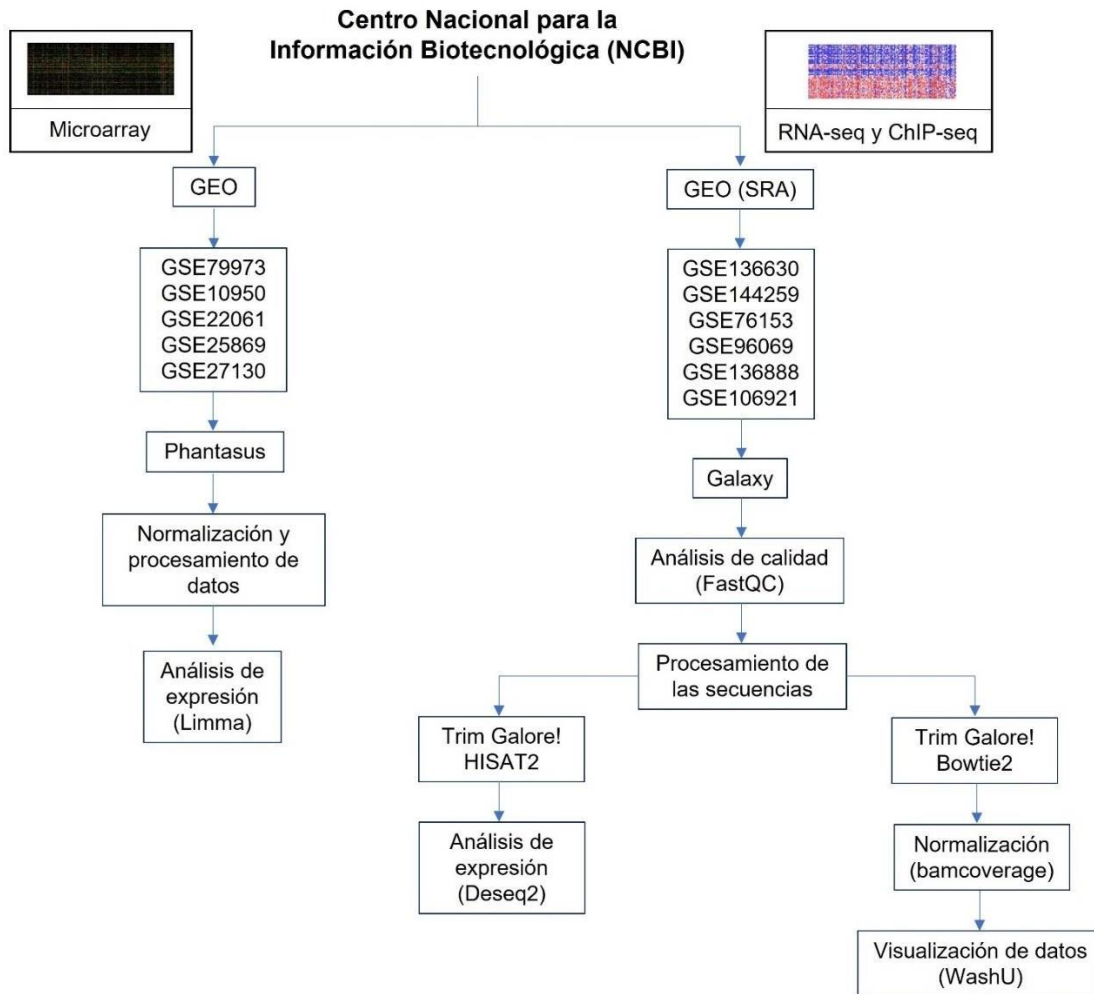


Figura 13. Diagrama de flujo del enfoque analítico empleado en este estudio. Para el análisis bioinformático de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* se empleó el NCBI, se realizó la búsqueda de conjuntos de datos en GEO y se utilizaron dos plataformas: Phantasus (Análisis de expresión por microarray) en donde los datos fueron normalizados y procesados (transformados a Log₂, normalizado por cuantiles, se colapsaron las sondas por sonda mediana máxima) y el análisis de expresión diferencial se realizó con la paquetería Limma. Para el análisis de expresión de datos de RNA-seq en Galaxy se realizó el análisis de calidad (FastQC), se procesaron las secuencias (Visualización de análisis de calidad (MultiQC), Trimming (Trim Galore!) el alineamiento y conteo de reads) y posteriormente el análisis de expresión diferencial empleando DESeq2 y creación del heatmap. Para el análisis de ChIP-seq, de la misma manera que el análisis de expresión se realizó el análisis de calidad y procesamiento de las secuencias, el alineamiento se realizó empleando la paquetería Bowtie2 y para la visualización de los datos se accedió a WashU.

Tabla 4. Número de acceso para cada estudio original

Número de accesos	Autor	Título	Experimentos	Base de datos
GSE79973	(He et al., 2016)	Downregulation of ALDOB is associated with poor prognosis of patients with gastric cancer/ Overexpression of HS6ST2 is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer.	Expression profiling by array	GEO
GSE10950	(Jiang et al., 2008)	DACT3 is an epigenetic regulator of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer and is a therapeutic target of histone modifications.	Expression profiling by array	GEO
GSE136630	(Orouji et al., 2022)	Chromatin state dynamics confers specific therapeutic strategies in enhancer subtypes of colorectal cancer.	Expression profiling by high throughput sequencing.	GEO
GSE144259	(Ji et al., 2020)	Primary tumors release ITGBL1-rich extracellular vesicles to promote distal metastatic tumor growth through fibroblast-niche formation.	Expression profiling by high throughput sequencing	GEO
GSE22061	(Liu et al., 2010)	Anticolon cancer activity of largazole, a marine-derived tunable histone deacetylase inhibitor.	Expression profiling by array	GEO
GSE25869	Kwon et al. 2011	Aberrant up-regulation of LAMB3 and LAMC2 by promoter demethylation in gastric cancer.	Methylation profiling by array	GEO
GSE27130	Kim Yh et al., 2011	Epigenomic analysis of aberrantly methylated genes in colorectal cancer identifies genes commonly affected by epigenetic alterations.	Methylation profiling by array	GEO
GSE76153	(Ooi et al., 2016)	Epigenomic profiling of primary gastric adenocarcinoma reveals super-enhancer heterogeneity.	Genome binding/occupancy profiling by high throughput sequencing	GEO
GSE96069	Nakamura et al. 2017	Targeting of super-enhancers and mutant BRAF can suppress growth of BRAF-mutant colon cancer cells via repression of MAPK signaling pathway.	Genome binding/occupancy profiling by high throughput sequencing	GEO
GSE136888	(Orouji et al., 2022)	Chromatin state dynamics confers specific therapeutic strategies in enhancer subtypes of colorectal cancer.	Genome binding/occupancy profiling by high throughput sequencing	GEO
GSE106921	(Teng et al., 2020)	Tissue-specific transcription reprogramming promotes liver metastasis of colorectal cancer.	Genome binding/occupancy profiling by high throughput sequencing	GEO

VII. RESULTADOS

8. 1 La expresión del gen *ATP2A3* se encuentra disminuida en tejidos de cáncer gástrico y de colon.

Uno de los primeros objetivos era analizar los niveles de expresión de estos genes SERCA, por lo tanto, mediante análisis bioinformático utilizando datos de microarray en Phantasus (<https://artyomovlab.wustl.edu/phantasus/>), los niveles de expresión de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* se determinaron en muestras de tejido gástrico y tejido de colon no neoplásico y canceroso. Se encontró que en las muestras de tejido gástrico (Figura 14) y tejido de colon tumoral (Figura 15) existe una disminución significativa en la expresión del gen *ATP2A3* en comparación con tejido gástrico y de colon normal (Adjust. P. Value. = 0.011901 y 0.015574, respectivamente). En contraparte, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de los genes *ATP2A1* y *ATP2A2* en muestras de tejidos gástrico y de colon normal y tumoral. Este resultado sugiere que la expresión del gen *ATP2A3* sí se encuentra disminuida en muestras de tumores de cáncer gástrico y de colon.

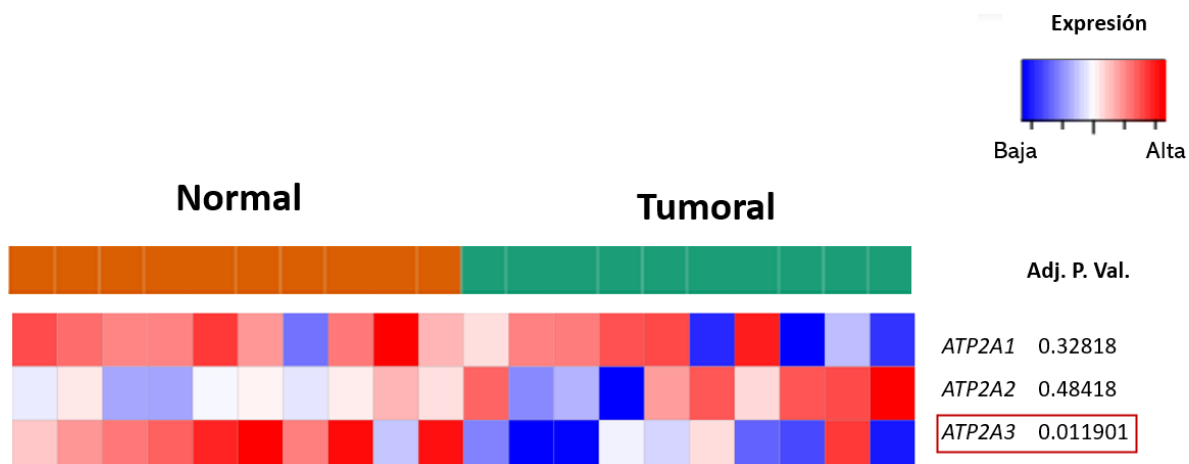


Figura 14. La expresión del gen *ATP2A3* se encuentra disminuida en tejidos de cáncer gástrico. Análisis bioinformático con datos de microarray de los niveles de expresión de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en 20 muestras de tejido gástrico normal y tumoral. GSE79973.

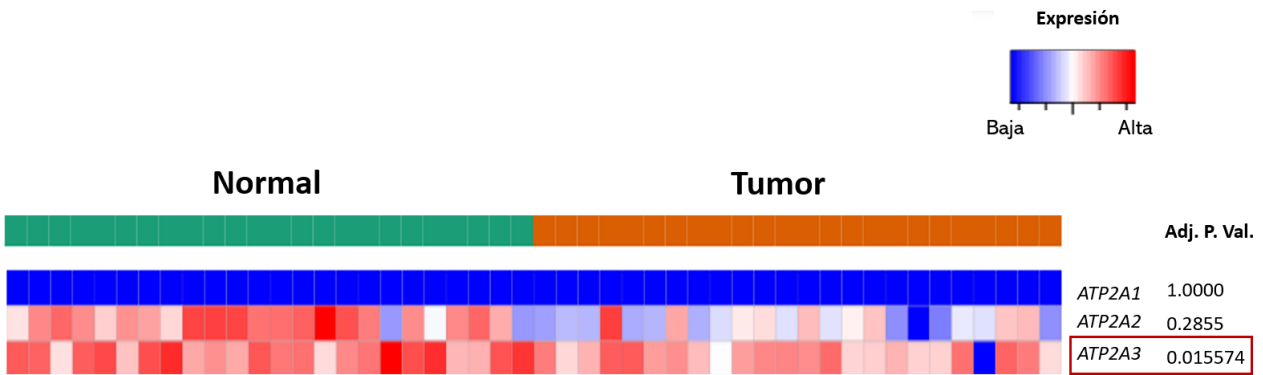


Figura 15. La expresión del gen ATP2A3 se encuentra disminuida en biopsias de cáncer de colon. Análisis bioinformático con datos de microarray de los niveles de expresión de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en 48 muestras de tejido de colon normal y tumoral. GSE10950.

Para corroborar los datos de microarreglo, utilizando datos de RNAseq se analizó la expresión de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en muestras de tejido de colon normal, tumoral y metastásico a partir de las bases de datos GSE136630 y GSE144259 en Galaxy Europe (<https://usegalaxy.eu/>). Los resultados demuestran que, en muestras de tejido de colon tumoral y tejido metastásico (Figura 16), existe una disminución significativa en la expresión del gen *ATP2A3* en comparación con tejido normal en ambos casos y no se encontró diferencias en la expresión de los genes *ATP2A1* y *ATP2A2* en muestras de tejido tumoral, metastásico y tejido de colon normal por lo tanto el análisis de estos dos genes no aparece en el heatmap. Con esto se corroboró los resultados de microarreglo observando que la expresión del gen *ATP2A3* sí se encuentra disminuida en muestras tumorales.

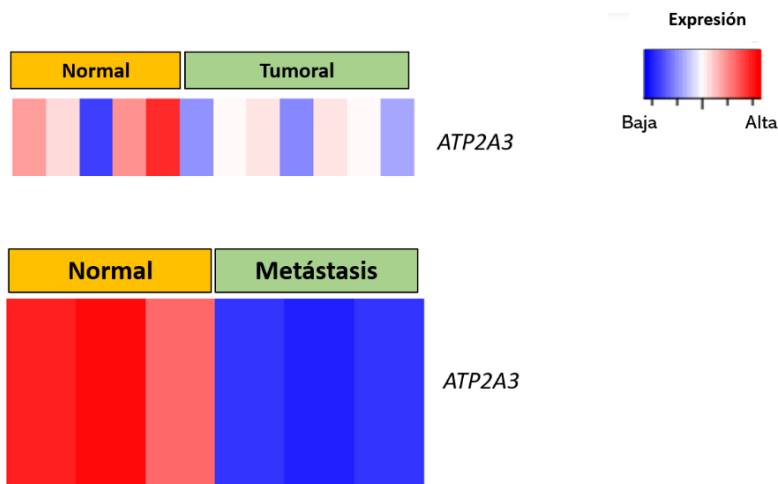


Figura 16. La expresión del gen *ATP2A3* se encuentra disminuida en biopsias de cáncer de colon. Análisis bioinformático con datos de RNA-seq de los niveles de expresión de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en muestras de tejido de colon normal, tumoral y metastásico. GSE136630-GSE144259.

8.2 La expresión del gen *ATP2A3* se encuentra disminuida en líneas celulares de cáncer gástrico y cáncer de colon.

Conociendo la expresión de estos genes en tejido normal y en muestras de tumores, se decidió estudiar también si la expresión de los genes SERCA en líneas celulares se encontraba alterada. Este análisis de expresión de mRNA de los genes se realizó en distintas líneas celulares de cáncer gástrico y de colon utilizando la plataforma del Instituto Europeo de Bioinformática EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>). Las líneas celulares se clasificaron de acuerdo con el grado de diferenciación celular, siendo más diferenciadas aquellas que se encuentran en etapas tempranas, y están ordenadas de más diferenciadas a menor diferenciadas. Las líneas celulares de cáncer gástrico se dividieron en líneas bien diferenciadas (NCI-N87), moderadamente diferenciadas (SNU-719) y poco diferenciadas (KATO-III, SNU-484, SNU-5, SNU-638) (Figura 17). En los resultados se observa que no hay cambios en la expresión de *ATP2A1* y *ATP2A2* en todas las líneas celulares, pero en el caso de *ATP2A3* se observa cómo disminuye la expresión de este gen conforme las líneas se vuelven más indiferenciadas, siendo mayor la expresión de este gen en las líneas NCI-N87 y SNU-719.

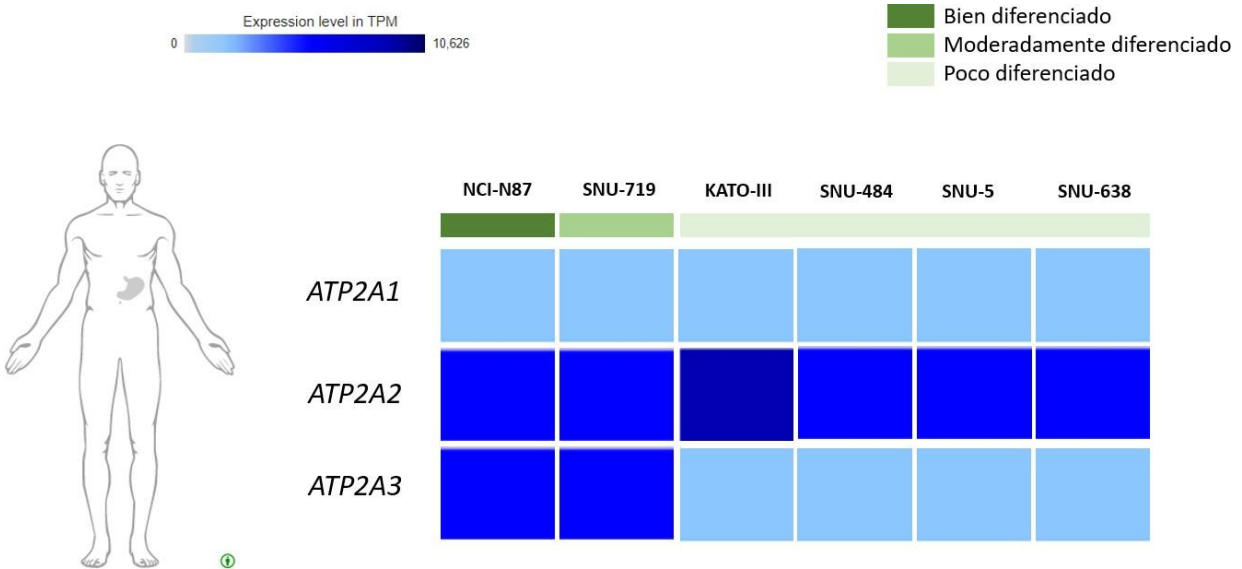


Figura 17. La expresión del gen *ATP2A3* se encuentra disminuida en líneas celulares de cáncer gástrico poco diferenciadas. Análisis bioinformático de los niveles de expresión de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer gástrico ordenadas de mayor a menor diferenciación.

Las líneas celulares de cáncer de colon se dividieron de acuerdo con la clasificación ABCD, siendo AB las líneas más diferenciadas y CD menos diferenciadas. Las líneas aquí empleadas son de tipo B (SW-480, SW-403) y tipo C (DLD-1, LoVo, SW-620, SW-948) (Figura 18). Los resultados indican que no hay cambios en la expresión de los genes *ATP2A1* y *ATP2A2* en todas las líneas celulares a diferencia del gen *ATP2A3* en el que se observa que la expresión es menor en las líneas celulares de tipo C en comparación con las de tipo B, es decir la expresión de este gen es mayor en las líneas más diferenciadas y menor en las menos diferenciadas.

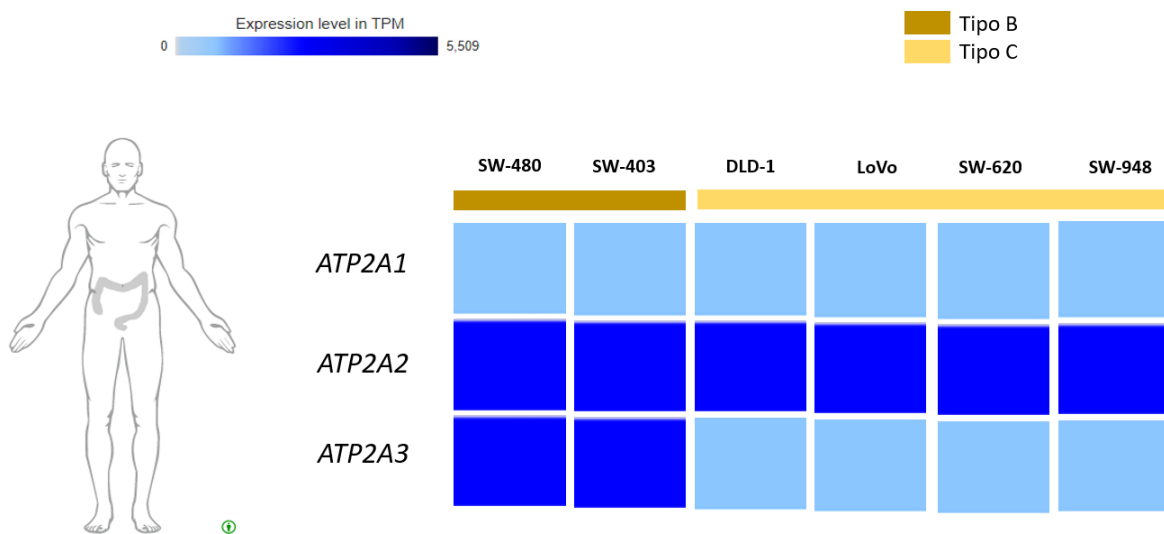


Figura 18. La expresión del gen ATP2A3 se encuentra disminuida en líneas celulares de cáncer de colon tipo C. Análisis bioinformático de los niveles de expresión de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer de colon ordenadas de mayor a menor diferenciación.

Adicionalmente, otro conjunto de líneas celulares de cáncer de colon se analizó, clasificándolas en líneas celulares similares a colon que son células que comparten características a tejido normal y en células indiferenciadas (Figura 19). En este análisis se observó que las líneas celulares similares a colon tienen mayor expresión de *ATP2A3* que las líneas indiferenciadas. En contraparte, se observa mayor expresión de *ATP2A2* en todas las líneas celulares sin diferencias significativas y no hay expresión de *ATP2A1* en todas las líneas.

En general, estos resultados de las líneas celulares sugieren que tanto en las líneas de cáncer gástrico y cáncer de colon la expresión de *ATP2A3* va disminuyendo conforme va progresando el tumor, es decir es menor la expresión en etapas más avanzadas de la enfermedad.

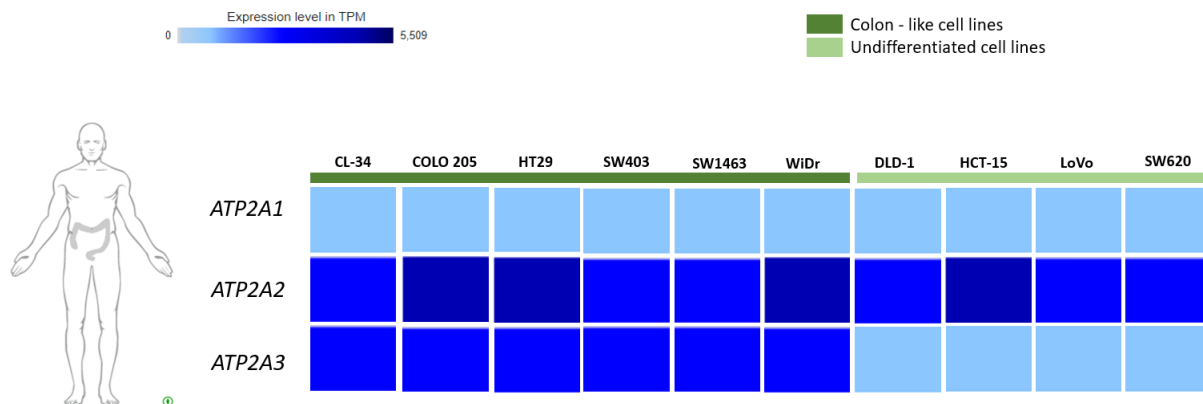


Figura 19. La expresión del gen ATP2A3 se encuentra disminuida en líneas celulares de cáncer de colon indiferenciadas. Análisis bioinformático de los niveles de expresión de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer de colon clasificadas en células similares a colon normal (Colon-like cell lines) y células cancerosas indiferenciadas.

8.3 El tratamiento con iHDACs aumenta la expresión del gen *ATP2A3* en la línea celular de cáncer de colon HCT116.

Una vez conociendo que sí hay cambios en la expresión de estos genes en tejidos canceroso en comparación con tejido no neoplásico, así como en líneas celulares, se exploró si empleando algún tratamiento se inducía la expresión de estos, por esta razón se analizó en la línea celular de cáncer de colon metastásico HCT116 empleando el conjunto de datos de microarreglos GSE22061 en Phantasus. La expresión de estos genes se analizó después del tratamiento con inhibidores de HDACs, los tratamientos empleados fueron SAHA, largazole y FK228. En el análisis se observa que al emplear estos tres tratamientos no hay cambios en la expresión de *ATP2A1* y *ATP2A2*, pero sí hay aumento en la expresión de mRNA de *ATP2A3* en las células HCT116 tratadas con los tres inhibidores, SAHA (Adj. P. Val. = 0.047195), Largazole (Adj. P. Val. = 0.017250) y FK228 (Adj. P. Val. = 0.012945) en comparación con el control (Figura 20). Estos resultados sugieren que estos inhibidores pueden reestablecer la expresión de *ATP2A3* y nos da un

panorama de que hay mecanismos epigénéticos que estén participando en la regulación de estos genes, principalmente de SERCA3.



Figura 20. El tratamiento con iHDACs aumenta la expresión del gen *ATP2A3* en la línea celular HCT116.

Análisis bioinformático con datos de microarray de los niveles de expresión de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en cáncer de colon tras tratamiento con 3 inhibidores de HDACs. Se utilizó el conjunto de datos GSE22061.

8.4 La expresión del gen *ATP2A3* se relaciona con la sobrevida del paciente con cáncer gástrico.

Dado que la expresión del gen *ATP2A3* en nuestros análisis se ha encontrado disminuida en muestras y líneas celulares cancerosas, nos preguntamos si la expresión de los tres genes que codifican para las bombas SERCA se relaciona con la sobrevida de los pacientes con cáncer gástrico. Esto se realizó en el plotter Kaplan-Meier (<https://kmplot.com/analysis/index.php?p=service>). Para el análisis, las muestras se dividieron en grupos con expresión alta y baja para cada gen y se observó que los pacientes con una alta expresión de SERCA3 tienen una mayor probabilidad de sobrevida en comparación con pacientes con una baja expresión. En contraparte, no se encontró diferencias significativas en la sobrevida de pacientes con alta y baja expresión de SERCA1 y SERCA2 (Figura 21). Estos resultados proponen que *ATP2A3* tiene un papel importante en la sobrevida de los pacientes, ya que aquellos pacientes con alta expresión de este gen tienen mayor probabilidad de supervivencia.

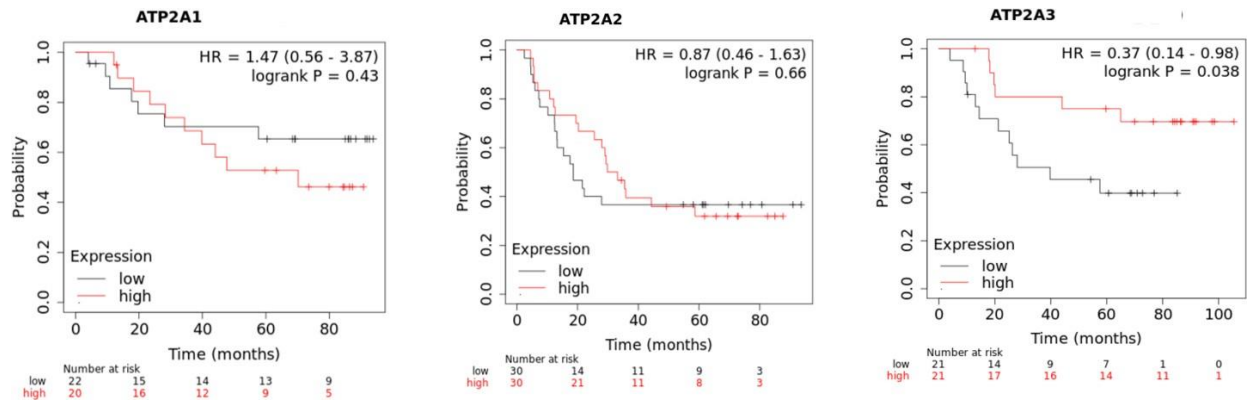


Figura 21. La expresión del gen ATP2A3 se relaciona con la sobrevida del paciente con cáncer gástrico. Análisis de sobrevida en pacientes con cáncer gástrico, para el análisis se dividieron en grupos de alta y baja expresión de cada uno de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*.

8.5 Niveles de metilación del promotor de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en cáncer gástrico y cáncer de colon.

Una vez analizados los niveles de expresión de estos genes y al observar que la expresión del gen *ATP2A3* se encuentra disminuida en cáncer y que esto sí se relaciona con la sobrevida del paciente se decidió evaluar si las alteraciones en los mecanismos epigenéticos se asocian con los cambios de expresión, para ello se decidió analizar el nivel de metilación en la región promotora de estos genes. Esto se realizó utilizando la plataforma GEO2R. La escala de metilación se representa por el valor Beta (β) y va de 0 a 1, de nada metilado a completamente metilado, respectivamente. Los resultados indican que en cáncer gástrico (Figura 22) y cáncer de colon (Figura 23) en el gen *ATP2A1* se observan altos niveles de metilación, pero en el caso de *ATP2A2* y *ATP2A3* los niveles de metilación son bajos, menores de 0.1 comparados con los niveles de metilación de *ATP2A1* que es el gen que no se expresa y sus niveles de metilación en muestras normal y tumoral es mayor a 0.5. Este análisis indica que la metilación en esta zona del promotor puede no estar participando en la regulación de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*, pero sí regula la expresión de *ATP2A1* que es el gen que no se expresa ni en tejido normal ni tumoral.

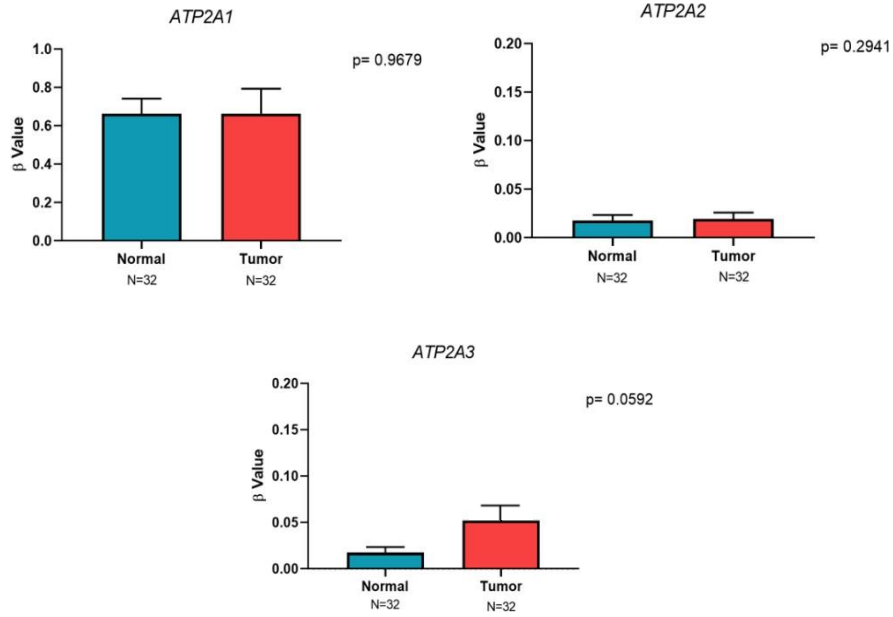


Figura 22. Niveles de metilación de los genes ATP2A1, ATP2A2 y ATP2A3 en cáncer gástrico. La escala de metilación se representa por el valor Beta (β) y va de 0 a 1, de nada metilado a completamente metilado, respectivamente.

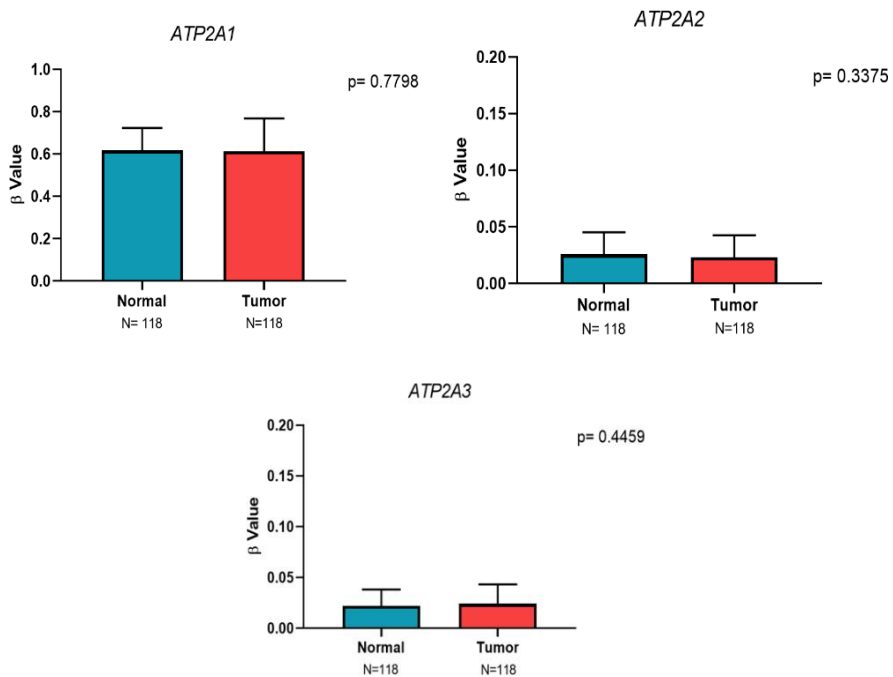


Figura 23. Niveles de metilación de los genes ATP2A1, ATP2A2 y ATP2A3 en cáncer de colon. La escala de metilación se representa por el valor Beta (β) y va de 0 a 1, de nada metilado a completamente metilado, respectivamente.

8.6 Abundancia de las marcas de histonas en la región del promotor de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en cáncer gástrico y cáncer de colon.

Finalmente, debido a los cambios de expresión y al no encontrar diferencias significativas en los niveles de metilación en los genes *SERCA*, nos preguntamos si las modificaciones de histonas estaban participando en estos cambios de expresión, por lo que decidimos explorar en la región promotora de estos genes, las marcas de eucromatina H3K27ac y H3K4me3. Para ello, se analizó el conjunto de datos GSE76153; para la marca H3K27ac se analizaron 3 líneas celulares clasificadas como poco diferenciadas, SNU1750, SNU16 y KATOIII (Figura 24).

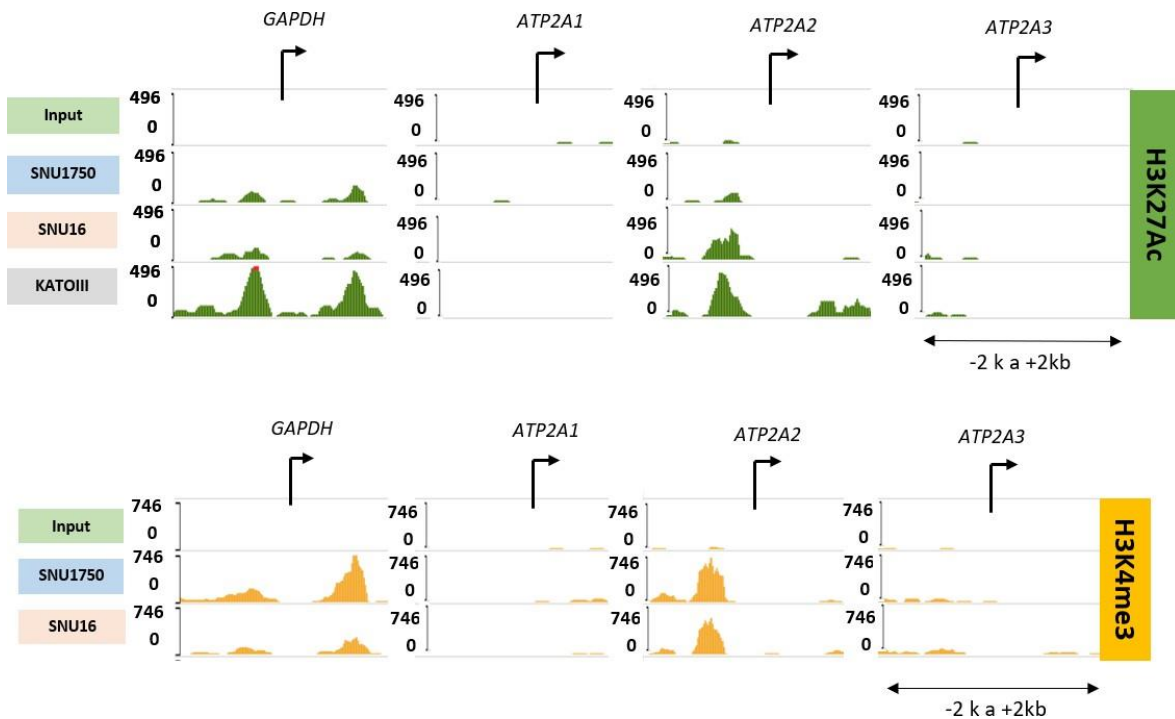


Figura 24. Abundancia de las marcas de histonas H3K27ac y H3K4me3 en la región del promotor de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer gástrico. Para el análisis de ambas marcas de eucromatina se utilizó el conjunto de datos GSE76153.

En este análisis se observa que el gen *ATP2A1* que no se expresa en este tejido no presenta abundancia de esta marca en la región del promotor, contrario al gen *ATP2A2* en que sí se ve abundancia en las tres líneas celulares, caso contrario a *ATP2A3* que no hay presencia de esta marca en la región promotora en las tres líneas celulares. En el análisis de la marca H3K4me3 se observa que no hay presencia de esta marca en el promotor de

ATP2A1 y *ATP2A3*, pero sí hay abundancia en el gen *ATP2A2* en las líneas celulares SNU1750 y SNU16.

Para el análisis de marcas de histonas en cáncer de colon se evaluó el conjunto de datos GSE96069 en cuatro líneas celulares indiferenciadas, Caco2, RKO, SW48 y SW620, observándose que en el gen *ATP2A1* no hay abundancia de la marca H3K27ac y tampoco en *ATP2A3*, pero sí se observó mayor abundancia en el gen *ATP2A2* (Figura 25).

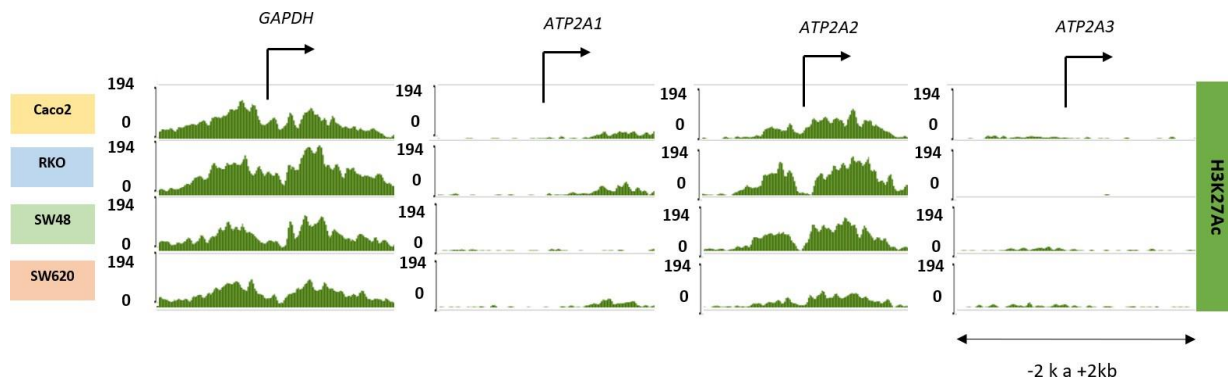


Figura 25. Abundancia de la marca de histona H3K27ac en la región del promotor de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer de colon. Para el análisis de esta marca se utilizó el conjunto de datos GSE96069.

Posteriormente, la marca H3K27ac se analizó en otro conjunto de datos GSE136888 en diferente grupo de líneas celulares indiferenciadas y nuevamente se observó que no hay abundancia de esta marca en los genes *ATP2A1* y *ATP2A3*, pero sí en el promotor del gen *ATP2A2* (Figura 26). Las dos marcas de euromatina H3K4me3 y H3K27ac se analizaron en el conjunto de datos GSE106921 en dos líneas celulares, SW480 (línea celular no metastásica) y SW620 (línea celular metastásica) ambas derivadas del mismo paciente. En el gen *ATP2A1* en ambas líneas celulares no se presentaron marcas de H3K4me3 y H3K27ac en la región del promotor. Para el gen *ATP2A2*, en las células SW480 y SW620, se observó abundancia de estas marcas, pero en mayor proporción en la línea no metastásica en comparación con la metastásica, observándose el mismo patrón en el gen *ATP2A3* para ambas líneas y ambas marcas de euromatina (Figura 27).

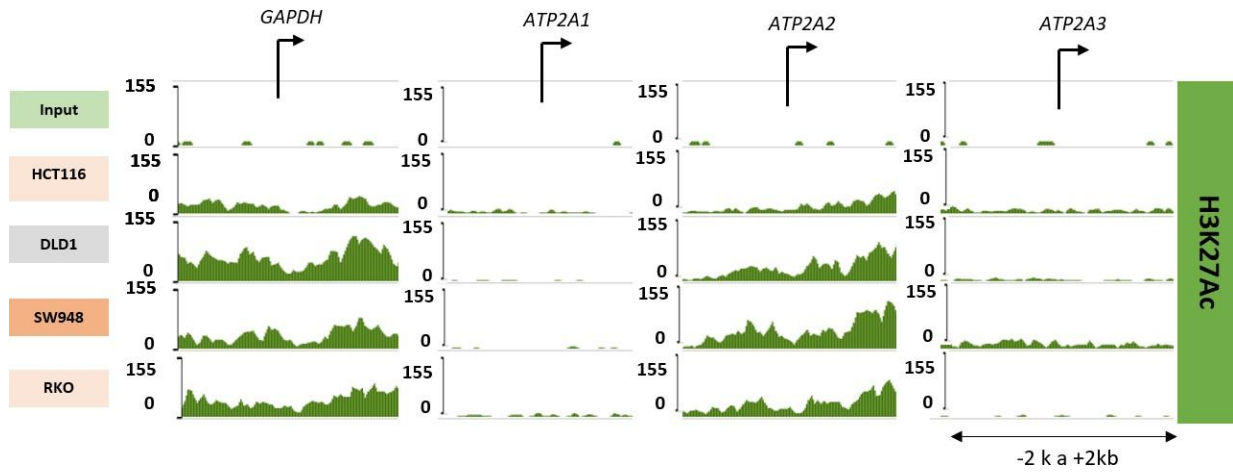


Figura 26. Abundancia de la marca de histona H3K27ac en la región del promotor de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer de colon. Para el análisis de esta marca se utilizó el conjunto de datos GSE136888.

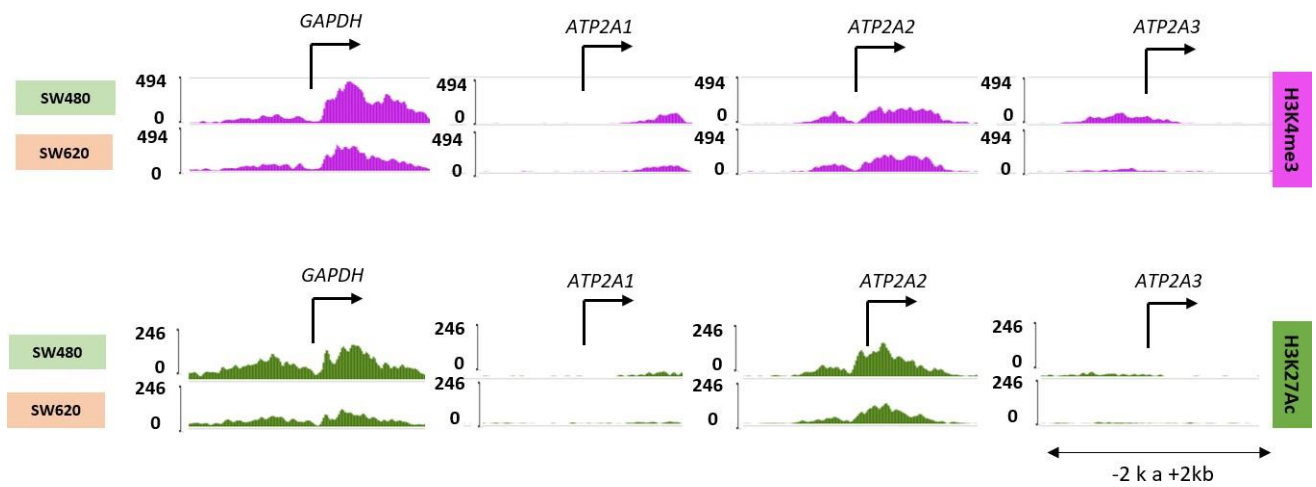


Figura 27. Abundancia de las marcas de histonas H3K27ac y H3K4me3 en la región del promotor de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en dos líneas celulares de cáncer de colon. Para el análisis de esta marca se utilizó el conjunto de datos GSE106921. Las líneas empleadas SW480 (no metastásica) y SW620 (metastásica).

Adicionalmente, se analizó el conjunto de datos GSE13688 en que se estudiaron las marcas de eucromatina, pero en células de tejido de colon normal y tumoral. En este análisis se observó que no hay presencia de esta marca en el gen *ATP2A1* en tejidos normal y tumoral pero sí en los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*, siendo mayor la abundancia de estas marcas en las células de tejido normal para ambos casos (Figura 28). Estos resultados proporcionan evidencia que la expresión de estos genes, principalmente de *ATP2A3* puede estar regulada por la acetilación/desacetilación de histonas.

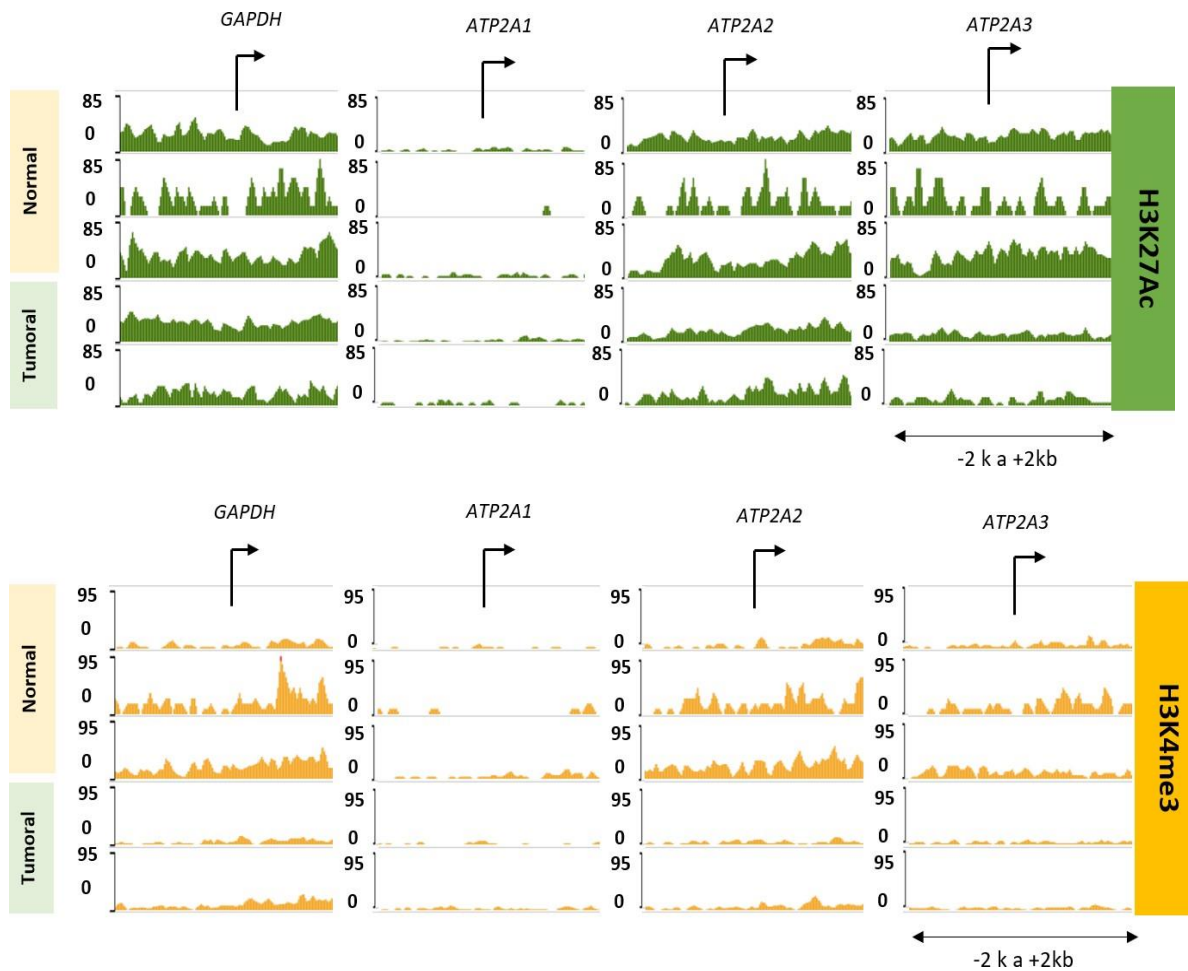


Figura 28. Abundancia de las marcas de histonas H3K27ac y H3K4me3 en la región del promotor de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en tejido de colon normal y tumoral. Para el análisis de esta marca se utilizó el conjunto de datos GSE136888.

IX. DISCUSIÓN

Actualmente se conoce que las alteraciones en las concentraciones de Ca^{2+} facilitan el desarrollo de diversas enfermedades, por lo que la correcta función de las bombas de calcio SERCA es de suma importancia para mantener la homeostasis del Ca^{2+} .

En este trabajo de tesis se analizaron los niveles de expresión de los genes que codifican para las bombas de calcio SERCA (*ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*) mediante análisis bioinformático por microarray y por RNA-seq; así como los mecanismos epigenéticos que pueden estar regulando su expresión.

Para el análisis de expresión de mRNA basado en las bases de datos públicos de microarreglos y RNA-seq se analizaron los genes en muestras de tumores y líneas celulares. Los resultados indican que la expresión del gen *ATP2A3* disminuye en los tumores de colon y estómago y en líneas celulares cancerosas de ambos casos, además expresión de *ATP2A3* disminuye significativamente al comparar tejido normal con tejido metastásico; mientras que, la expresión de *ATP2A2* no muestra diferencias significativas en ambas condiciones. No se observa expresión de *ATP2A1* en muestras de tejido normal y tumoral de estómago y colon como es de esperarse, ya que este gen se expresa exclusivamente en músculo esquelético de contracción rápida. Por lo tanto, estos resultados demuestran que la expresión de *ATP2A3* se encuentra disminuida en muestras de tejidos y líneas celulares de cáncer gástrico y cáncer de colon.

Esto concuerda con lo que se ha reportado, que la expresión de SERCA3 disminuye drásticamente en cáncer de mama, colon y mucosa gástrica (Gelebart et al., 2002; Korosec et al., 2006; Korosec et al., 2009; Pacifico et al., 2003).

Adicionalmente, se analizó la expresión de estos genes en distintas líneas celulares de cáncer gástrico y de colon. Con respecto al cáncer gástrico, los tumores malignos comprenden carcinomas, linfomas, sarcomas y otros de menos frecuencia, siendo el adenocarcinoma el tipo histológico más frecuente (Espejo y Navarrete, 2003) El adenocarcinoma ha sido clasificado de muchas maneras y por diversos autores en temprano, avanzado, tipo 1, 2, 3 y 4 y en diferenciado e indiferenciado. En este análisis al clasificar las líneas celulares de cáncer gástrico y cáncer de colon de acuerdo con el grado de diferenciación celular se observa que la expresión de *ATP2A3* disminuye conforme las líneas celulares se vuelven más indiferenciadas, coincidiendo con el análisis de microarray en las muestras de tumores, en que se observó que en tejido canceroso disminuye la

expresión de este gen, mientras que no hay cambios en *ATP2A1* y *ATP2A2* (Espejo y Navarrete, 2003).

En general, se observa que las líneas indiferenciadas son aquellas derivadas de metástasis y representan a etapas más avanzadas de cáncer presentando menor expresión de *ATP2A3* a diferencia de aquellas líneas más diferenciadas que presentan mayor expresión de este gen. Con esto se observa que la expresión de estos genes va disminuyendo conforme va progresando el tumor, es decir, durante la progresión de la enfermedad, siendo menor en etapas más avanzadas. Esto concuerda con lo reportado en otros estudios en que han asociado la disminución de *SERCA3* con el desarrollo y progresión de la enfermedad (Brouland et al., 2005; Gelebart et al., 2002).

Una vez conociendo los resultados del análisis de expresión de estos genes y debido a la alteración de la expresión de *ATP2A3* en muestras de tejidos y en líneas celulares, se analizó un conjunto de datos en la línea celular HCT116 de cáncer de colon que tiene grado D de Dukes, teniendo origen metastásico. En esta línea celular se estudia el efecto de distintos tratamientos que inhiben a las HDACs. Se sabe que al inhibir a las HDACs se aumenta la accesibilidad del DNA a la maquinaria transcripcional, modulando la expresión génica. Los tratamientos empleados fueron SAHA (ácido hidroxámico suberoilánilida), largazole y FK228 (romidepsina). Ya ha sido comprobada la eficacia de SAHA y FK228 para el tratamiento del linfoma cutáneo de células T (Lansigan & Foss, 2010; Marks & Breslow, 2007) y recientemente se ha identificado al largazole, un producto natural anti proliferativo de origen marino que es un profármaco que libera un potente inhibidor de HDAC, el largazole tiol (Liu et al., 2010). Estos inhibidores se encuentran entre los inhibidores de HDACs más potentes hasta la fecha e inhiben la actividad de las HDACs de clase I, especialmente HDAC 1 y 3 y se sabe específicamente que estas HDACs están sobre expresadas en cáncer de colon. Los resultados obtenidos en este análisis muestran que SAHA, largazole y FK228 inducen la expresión de *ATP2A3* en comparación con la línea control (HCT116 sin tratamiento), pero no de *ATP2A1* y *ATP2A2*. Estos resultados sugieren que estos inhibidores pueden reestablecer la expresión de *ATP2A3* y nos da un panorama en que hay mecanismos epigenéticos que están participando en la regulación de estos genes, principalmente de *SERCA3* y están favoreciendo el estado relajado de la cromatina. Esto se necesita confirmar experimentalmente para profundizar en los mecanismos de estos inhibidores que activen la transcripción de *ATP2A3*.

Similar a este resultado fue lo reportado en otros estudios en donde al emplear la línea celular de cáncer gástrico KATOIII y tratarla con inhibidores de HDACs la expresión de SERCA3 aumentaba y no había cambios en los niveles de expresión de SERCA2 (Flores et al., 2017; Gélébart et al., 2002). También en un estudio realizado por Contreras (2016) se trató dos líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 con inhibidores de HDACs y se observó que la expresión de SERCA3 incrementó después del tratamiento.

Una vez conociendo los niveles de expresión de estos genes y principalmente la alteración de *ATP2A3* en muestras de tumores y líneas celulares de cáncer gástrico y de colon, se analizó si esta alteración está asociada con la sobrevida de pacientes con cáncer gástrico; por lo tanto, al realizar la curva de sobrevida se observó en el caso de los genes *ATP2A1* y *ATP2A2* que no hay correlación entre los niveles de expresión y la sobrevida de los pacientes. Pero en el caso de *ATP2A3* que es el gen que se ha encontrado alterado en cáncer, se observa que aquellos pacientes que tienen mayor expresión de este gen tienen mejor pronóstico de sobrevida que los que tienen menor expresión, por lo tanto, la alteración de la expresión de *ATP2A3* sí se correlaciona con la sobrevida del paciente y tiene un papel importante en el cáncer gástrico.

Se sabe que existen mecanismos epigenéticos que regulan la expresión génica y están involucrados en todas las etapas de la carcinogénesis y han sido objetivos atractivos para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Jenuwein & Allis, 2001); por lo tanto, se analizó la metilación del DNA y las modificaciones de histonas para saber si están participando en la regulación de la expresión de estos genes SERCA. La metilación del DNA en promotores de genes se asocia con la represión génica (Tough et al., 2016) y la alteración en los patrones de metilación del DNA es un evento bien conocido en tumorigénesis, así como en otras enfermedades. Por lo tanto, se analizó en GEO2R la metilación de la región promotora(-200 a TSS) de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*.

Los resultados muestran valores altos de metilación con un valor β casi cercano a 1 para el gen *ATP2A1* y esto concuerda con su nivel de expresión ya que este gen no se expresa en estos tejidos de acuerdo con los análisis de expresión, mientras que se observaron valores de metilación bajos para *ATP2A2* y *ATP2A3* que son genes que sí se expresan en tejido de colon y gástrico normal y conociendo que *ATP2A3* disminuye drásticamente en cáncer de colon y cáncer gástrico no se encontraron diferencias significativas entre tejido normal y tumoral. Estos resultados indican que los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* presentan bajos niveles

de metilación en su región promotora y posiblemente su expresión no esté regulada por ella.

Esto concuerda con lo reportado por otros autores (Korosec et al., 2006, 2009) que al estudiar la expresión de *ATP2A3* en tumores de colon, pulmón y sistema nervioso y en líneas celulares de cáncer de mama sugirieron que el promotor de este gen podría no estar regulado por mecanismos de metilación.

Además, en la literatura se ha reportado que en muestras de cáncer oral el promotor de *ATP2A2* se encuentra hipermetilado y que al tratar líneas celulares derivadas de estos tumores con 5 - azacitidina, un agente desmetilante del DNA, se induce la expresión del gen (Endo et al., 2004). Sin embargo, en nuestro análisis no se observan diferencias en los niveles de metilación de *ATP2A2* en muestras de tejido normal y tumoral. Adicionalmente, nuestro resultado concuerda con lo reportado en otro estudio con células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 que al tratarlas con 5-aza no se observaron cambios en la expresión de *SERCA2b* y *SERCA3a* (Contreras et al., 2016).

Meneses et al., (2019), mediante secuenciación con bisulfito, analizaron la posición -300 a +407 bp, determinando el estado de metilación de 102 CpGs del promotor del gen *ATP2A3* en la línea de cáncer gástrico KATOIII y en las células de adenocarcinoma colorrectal Caco2. Sus resultados mostraron metilación CpG a través del sitio de inicio de transcripción, el primer exón y 120 pb del primer intrón (CpGs 51 a 102 bp) y reportaron un escenario CpG libre de metilación situados en la posición (-134 a +40 bp) (CpG 22 a 45 bp). Cuando este grupo evaluó las células de cáncer de colon Caco2 inducidas por post-confluencia se observó un aumento de mRNA de *SERCA3*, pero no se encontró diferencia en el estado de metilación entre las células con disminución del mRNA y en condición de re-expresión de *SERCA3* dentro de la región promotora proximal de -320 a +120 bp (Meneses et al., 2019). Por lo tanto, en nuestro análisis se corrobora que la metilación del DNA regula negativamente la expresión de *ATP2A1*, pero no la de *ATP2A2* y *ATP2A3*.

Dentro de los mecanismos que regulan la expresión génica se encuentra las modificaciones postraduccionales de histonas, las cuales regulan la expresión génica mediante el control del grado de compactación de la cromatina (Li & Seto, 2016). En este proyecto se analizaron marcas de eucromatina H3K27ac y H3K4me3 en la región del promotor de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en diversas líneas celulares de cáncer gástrico y de colon mediante datos públicos de CHIP-seq.

Al estudiar las marcas de histonas H3K27ac y H3K4me3 en las diferentes líneas celulares y muestras de tumores y al observar que en los genes SERCA que sí se expresan, presentan mayor abundancia de marca de eucromatina abierta, mientras que los genes que no se expresan o su expresión se encuentra disminuida pierden estas marcas de activación, se proporciona evidencia de que las marcas de histonas están regulando principalmente la expresión de estos genes más que la metilación del DNA.

En un estudio realizado por Meneses et al., (2019), en sus ensayos de ChIP-seq en células de cáncer gástrico, reportaron acetilación de H3K27ac y menor señal de H3K27me3 en el promotor proximal (-162 a +39 bp) de *ATP2A3* y al estudiar estas mismas marcas en las líneas de cáncer de colon los resultados fueron similares. Al analizar las mismas marcas en la región (-262 a -135 bp) y al inducir estas marcas con butirato, un tratamiento con actividad inhibidora de HDACs y utilizado para inducir la diferenciación celular, observaron disminución de la abundancia de H3K27me3, una marca represiva y enriquecimiento de la marca H3K27ac (Meneses et al., 2019). Por otro lado, Izquierdo et al., (2019) al tratar las células de cáncer de mama MDA-MB-231 con TSA, también con actividad inhibidora de HDACs observaron incremento de la acetilación en H3K27ac. Esto también concuerda con el estudio realizado por Flores et al., (2017) que a través de ChIP en la línea celular de cáncer gástrico KATOIII observaron que al tratar las células con TSA aumentaban las marcas permisivas H3K4Me y H3K9Ac y disminuía la marca represiva H3K9me3 y además las células tratadas mostraron un notable aumento en la expresión de mRNA de *ATP2A3* y *ATP2A2* se mantuvo sin cambios, mencionando que dicho incremento de la expresión de la bomba provoca la muerte de las células cancerosas. Estos resultados sugieren que la expresión de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* se correlaciona con las marcas de histonas teniendo un papel fundamental en la regulación de su expresión. En conjunto estos resultados sugieren que la expresión de las bombas SERCA en cáncer gástrico y colon se encuentra alterada y se asocia negativamente con la sobrevida de los pacientes. Estos y los demás genes implicados en la señalización del Ca²⁺ en cáncer junto con las modificaciones epigenéticas como la metilación del DNA y las modificaciones de histonas, son un objetivo clave en las investigaciones futuras, no sólo para entender los diferentes procesos patológicos, sino también para desarrollar estrategias que van desde la prevención y detección hasta el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

X. CONCLUSIONES

La expresión del gen *ATP2A3* es menor en muestras de tumores y líneas celulares de cáncer gástrico y de colon en comparación con tejido normal en ambos casos.

La expresión de *ATP2A3* va disminuyendo conforme avanza la enfermedad, es decir se correlaciona de forma inversa con el estadio del tumor, mientras que no se observan alteraciones en la expresión de los genes *ATP2A1* y *ATP2A2*.

Se sugiere que el uso de inhibidores de HDACs como SAHA, LARGAZOL y FK228 puede aumentar significativamente la expresión de *ATP2A3*.

La alta expresión de *SERCA3* se correlaciona con mejor pronóstico de supervivencia en pacientes con cáncer gástrico.

Los valores de metilación de DNA de los promotores de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* son bajos y no cambian entre tejido normal y tumoral, pero *ATP2A1* sí presenta altos niveles de metilación lo que está regulando que no se exprese en estos tejidos.

La presencia de marcas de histonas transcripcionalmente activas como H3K4me3 y la H3K27ac regula positivamente la expresión de estos genes.

En general estos resultados sugieren que la expresión de las bombas *SERCA* se encuentra alterada en cáncer gástrico y de colon, sin embargo, se necesitan más estudios para comprender el papel de la alteración de estos genes y su participación junto con los demás genes que participan en la señalización del Ca^{2+} en cáncer gástrico y de colon, así como las modificaciones epigenéticas que regulen las alteraciones de estos, ya que el análisis en conjunto de todos estos genes podrían ser un objetivo clave para futuras investigaciones.

XI. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis y para continuar estudiando la expresión de estos genes, *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*, en cáncer gástrico y de colon surge el interés de analizar el estado de metilación en diferentes regiones del promotor que no fueron estudiadas en este trabajo y determinar qué otras modificaciones de histonas como la acetilación de la K9H3 y la trimetilación de la H3K9 y H3K27 están participando en su regulación y adicionalmente, estudiar el efecto de nuevos inhibidores de HDACs o DNMTs que puedan reestablecer la expresión de *ATP2A3* en células cancerosas. Por otra parte, se propone identificar elementos de regulación que modulen al promotor de los genes a nivel epigenético ya que estos pueden tener un papel fundamental en su regulación y explorar *in silico* la participación de estas enzimas SERCA y su relación con los demás genes implicados en la señalización del Ca^{2+} y en las vías oncogénicas lo cual desempeñaría un papel clave en el diagnóstico y tratamiento del cáncer gástrico y de colon.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, W., Lee, M. G., Kim, K. H., & Muallem, S. (2003). Multiple effects of SERCA2b mutations associated with Darier's disease. *J Biol Chem*, *278*(23), 20795-20801. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301638200>
- American Joint Committee on Cancer (<https://www.facs.org/quality-programs/cancer-programs/american-joint-committee-on-cancer/>)
- Bchetnia, M., Charfeddine, C., Kassar, S., Zribi, H., Guettiti, H. T., Ellouze, F., Cheour, M., Boubaker, S., Osman, A. D., Abdelhak, S., & Mokni, M. (2009). Clinical and mutational heterogeneity of Darier disease in Tunisian families. *Arch Dermatol*, *145*(6), 654-656. <https://doi.org/10.1001/archdermatol.2009.52>
- Beaulieu, N., Morin, S., Chute, I. C., Robert, M. F., Nguyen, H., & MacLeod, A. R. (2002). An essential role for DNA methyltransferase DNMT3B in cancer cell survival. *J Biol Chem*, *277*(31), 28176-28181. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204734200>
- Belmonte, A. (ND). Las HDAC en la regulación de la expresión génica y el cáncer.
- Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R., & Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*, *23*(7), 781-783. <https://doi.org/10.1101/gad.1787609>
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *4*(7), 517-529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Brandl, C. J., deLeon, S., Martin, D. R., & MacLennan, D. H. (1987). Adult forms of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem*, *262*(8), 3768-3774. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3029125>
- Brini, M., & Carafoli, E. (2009). Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev*, *89*(4), 1341-1378. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2008>
- Brouland, J. P., Gelebart, P., Kovacs, T., Enouf, J., Grossmann, J., & Papp, B. (2005). The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. *Am J Pathol*, *167*(1), 233-242. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62968-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62968-9)

- Cañedo, R; Rodríguez, R & Vázquez, Y. (2009). Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos: un palacio de la información para la medicina molecular. 19(4). <http://scielo.sld.cu1>
- Chandrasekera, P. C., Kargacin, M. E., Deans, J. P., & Lytton, J. (2009). Determination of apparent calcium affinity for endogenously expressed human sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPase isoform SERCA3. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296(5), C1105-1114. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00650.2008>
- Clough, E. & Barrett. (2016). The Gene Expression Omnibus database. *Methods Mol Biol*.1418: 93-110. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3578-9_5.
- Contreras, E; Oliveras, A; Flores, L & et al. (2016). Histone Deacetylase Inhibitors Promote the Expression of *ATP2A3* Gene in Breast Cancer Cell Lines. *Molecular Carcinogenesis*. 55(10): 1477–1485. <https://doi.org/10.1002/mc.22402>
- Contreras, E; Zarain, A. & Santiago, J. (2010). Enfermedades asociadas con mutaciones y cambios en la expresión de las ATPasas-Ca²⁺ del retículo sarco(endo)plásmico Diseases associated with mutations and changes in expression of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *Rev Med UV*.
- Dally, S., Bredoux, R., Corvazier, E., Andersen, J. P., Clausen, J. D., Dode, L., Fanchaouy, M., Gelebart, P., Monceau, V., Del Monte, F., Gwathmey, J. K., Hajjar, R., Chaabane, C., Bobe, R., Raies, A., & Enouf, J. (2006). Ca²⁺-ATPases in non-failing and failing heart: evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2 isoform (SERCA2c). *The Biochemical Journal*, 395(2), 249–258. <https://doi.org/10.1042/BJ20051427>
- Daoud de Daoud, G. (2016). La epigenética el futuro de la prevención y tratamiento de muchas enfermedades. *Revista de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología*. 70(4). 117-118.
- Derks, S., Bosch, L. J., Niessen, H. E., Moerkerk, P. T., van den Bosch, S. M., Carvalho, B., Mongera, S., Voncken, J. W., Meijer, G. A., de Bruine, A. P., Herman, J. G., & van Engeland, M. (2009). Promoter CpG island hypermethylation- and H3K9me3 and H3K27me3-mediated epigenetic silencing targets the deleted in colon cancer (DCC) gene in colorectal carcinogenesis without affecting neighboring genes on chromosomal region 18q21. *Carcinogenesis*, 30(6), 1041-1048.

<https://doi.org/10.1093/carcin/bgp073>

- Dode, L., Andersen, J. P., Leslie, N., Dhitavat, J., Vilsen, B., & Hovnanian, A. (2003). Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 1 and 2 isoforms and characterization of Darier disease (SERCA2) mutants by steady-state and transient kinetic analyses. *J Biol Chem*, 278(48), 47877-47889. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306784200>
- Dode, L., De Greef, C., Mountian, I., Attard, M., Town, M. M., Casteels, R., & Wuytack, F. (1998). Structure of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene. Promoter analysis and alternative splicing of the SERCA3 pre-mRNA. *J Biol Chem*, 273(22), 13982-13994. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.13982>
- Dode, L., Vilsen, B., Van Baelen, K., Wuytack, F., Clausen, J. D., & Andersen, J. P. (2002). Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 1 and 3 isoforms by steady-state and transient kinetic analyses. *J Biol Chem*, 277(47), 45579-45591. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207778200>
- Corvalán, A. (2013). Epigenetics in the pathogenesis and early detection of gastric cancer. *Revista Médica de Chile*. 141: 1570-1577. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872013001200011>
- Endo, Y., Uzawa, K., Mochida, Y., Shiiba, M., Bukawa, H., Yokoe, H., & Tanzawa, H. (2004). Sarcoendoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase type 2 downregulated in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 110(2), 225-231. <https://doi.org/10.1002/ijc.20118>
- Espejo, H. & Navarrete, J. (2003). Clasificación de los adenocarcinomas de estómago. *Rev. Gastroenterol.* 23:199-212.
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*, 8(4), 286-298. <https://doi.org/10.1038/nrg2005>
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, 358(11), 1148-1159. <https://doi.org/10.1056/NEJMra072067>
- Felice, C; Lewis, A; Armuzzi, A; et al. (2015). Review article: Selective histone deacetylase isoforms as potential therapeutic targets in inflammatory bowel diseases. *Alimentary*

Pharmacology and Therapeutics. 41: 26-38. <https://doi.org/10.1111/apt.13008>

- Flores, P. L. (2017). Regulación transcripcional del gen *ATP2A3* (SERCA3) tras la diferenciación de líneas celulares humanas de cáncer gástrico y de colon. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio académico de la Universidad Nacional Autónoma de México. <http://132.248.9.195/ptd2017/noviembre/0768012/Index.html>
- Flores, L; Rodríguez, G. & Zarain, A. (2017). Induction of cell differentiation activates transcription of the Sarco/Endoplasmic Reticulum calcium-ATPase3 gene (*ATP2A3*) in gastric and colon cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*. 56(2): 735-750. <https://doi.org/10.1002/mc.22529>
- Frank, K. F., Bolck, B., Erdmann, E., & Schwinger, R. H. (2003). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovasc Res*, 57(1), 20-27. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(02\)00694-6](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(02)00694-6)
- Gelebart, P., Kovacs, T., Brouland, J. P., van Gorp, R., Grossmann, J., Rivard, N., Panis, Y., Martin, V., Bredoux, R., Enouf, J., & Papp, B. (2002). Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation. *J Biol Chem*, 277(29), 26310-26320. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201747200>
- Gillespie, S; Hardy, L; & Anderson, C. (2019). Patterns of DNA methylation as an indicator of biological aging: State of the science and future directions in precision health promotion. *Nursing outlook*. 67(4): 337-344. <https://doi.org/10.1016/j.outlook.2019.05.006>
- Gonzalo, V., Castellví-Bel, S., Balaguer, F., Pelisé, M., Ocaña, T., & Castells, A. (2008). Epigenética del cáncer. *Gastroenterología y Hepatología*. 31(1): 37-45. <https://doi.org/10.1157/13114573>
- Hasenfuss, G. (1998). Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res*, 37(2), 279-289. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(97\)00277-0](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(97)00277-0)
- He, J., Jin, Y., Chen, Y., Yao, H. B., Xia, Y. J., Ma, Y. Y., Wang, W., & Shao, Q. S. (2016). Downregulation of ALDOB is associated with poor prognosis of patients with gastric cancer. *Onco Targets Ther*. 9: 6099-6109. <https://doi.org/10.2147/OTT.S110203>

- Izquierdo, E; Oliveras, A; Meneses, I; et al. (2019). Resveratrol up-regulates ATP2A3 gene expression in breast cancer cell lines through epigenetic mechanisms. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 113: 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.05.020>
- Izquierdo, E; Lozano, D; Oliveras, A & Zarain, A. (2020). Las bombas de calcio SERCA: Su papel en la patogénesis tumoral e implicaciones clínicas. *Revista de Educación Bioquímica*. 39(2): 40-51.
- Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293(5532), 1074-1080. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>
- Ji, Q., Zhou, L., Sui, H., Yang, L., Wu, X., Song, Q., Jia, R., Li, R., Sun, J., Wang, Z., Liu, N., Feng, Y., Sun, X., Cai, G., Feng, Y., Cai, J., Cao, Y., Cai, G., Wang, Y., & Li, Q. (2020). Primary tumors release ITGBL1-rich extracellular vesicles to promote distal metastatic tumor growth through fibroblast-niche formation. *Nat Commun*, 11(1), 1211. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14869-x>
- Jiang, X., Tan, J., Li, J., Kivimae, S., Yang, X., Zhuang, L., Lee, P. L., Chan, M. T., Stanton, L. W., Liu, E. T., Cheyette, B. N., & Yu, Q. (2008). DACT3 is an epigenetic regulator of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer and is a therapeutic target of histone modifications. *Cancer Cell*, 13(6), 529-541. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.04.019>
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, 13(7), 484-492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
- Kaas, G. A., Zhong, C., Eason, D. E., Ross, D. L., Vachhani, R. V., Ming, G. L., King, J. R., Song, H., & Sweatt, J. D. (2013). TET1 controls CNS 5-methylcytosine hydroxylation, active DNA demethylation, gene transcription, and memory formation. *Neuron*, 79(6), 1086-1093. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.08.032>
- Kelly, T. K., De Carvalho, D. D., & Jones, P. A. (2010). Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol*, 28(10), 1069-1078. <https://doi.org/10.1038/nbt.1678>
- Kim, Y.H., Lee, H.C., Kim, S.Y., Yeom, Y.I., Ryu, K.J., Min, B.H., Kim, D.H., Son, H.J, Rhee, P.L., Kim, J.J., Rhee, J.C., Kim, H.C., Chun, H.K., Grady, W.M., & Kim, Y.S. (2011). Epigenomic analysis of aberrantly methylated genes in colorectal cancer identifies

- genes commonly affected by epigenetic alterations. *Ann Surg Oncol*. 18(8):2338-47. <https://doi.org/10.1245/s10434-011-1573-y>.
- Kimura, H. (2013). Histone modifications for human epigenome analysis. *J Hum Genet*, 58(7), 439-445. <https://doi.org/10.1038/jhg.2013.66>
- Kirschbaum, M., Frankel, P., Popplewell, L., Zain, J., Delioukina, M., Pullarkat, V., Matsuoka, D., Pulone, B., Rotter, A. J., Espinoza-Delgado, I., Nademanee, A., Forman, S. J., Gandara, D., & Newman, E. (2011). Phase II study of vorinostat for treatment of relapsed or refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 29(9), 1198-1203. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.1398>
- Klose, R. J., & Bird, A. P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*, 31(2), 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.12.008>
- Kohli, R. M., & Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502(7472), 472-479. <https://doi.org/10.1038/nature12750>
- Kondo, Y. (2009). Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Med J*, 50(4), 455-463. <https://doi.org/10.3349/ymj.2009.50.4.455>
- Korczak, B., Zarain-Herzberg, A., Brandl, C. J., Ingles, C. J., Green, N. M., & MacLennan, D. H. (1988). Structure of the rabbit fast-twitch skeletal muscle Ca²⁺-ATPase gene. *J Biol Chem*, 263(10), 4813-4819. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2965149>
- Korosec, B., Glavac, D., Rott, T., & Ravnik-Glavac, M. (2006). Alterations in the ATP2A2 gene in correlation with colon and lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 171(2), 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2006.06.016>
- Korosec, B., Glavac, D., Volavsek, M., & Ravnik-Glavac, M. (2009). ATP2A3 gene is involved in cancer susceptibility. *Cancer Genet Cytogenet*, 188(2), 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2008.10.007>
- Kurdistani, S. K., & Grunstein, M. (2003). Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(4), 276-284. <https://doi.org/10.1038/nrm1075>
- Kwon, O.H., Park, J.L., Kim, M., Kim, J.H., Lee, H.C., Kim, H.J., Noh, S.M., Song, K.S., Yoo, H.S., Paik, S.G., Kim, S.Y., Kim, Y.S. (2011). Aberrant up-regulation of LAMB3 and LAMC2 by promoter demethylation in gastric cancer. *Biochem Biophys Res*

Commun. 406(4):539-45. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.082>

Lacabaratz-Porret, C; Launay, S. et al. (2000). Biogenesis of endoplasmic reticulum proteins involved in Ca²⁺ signalling during megakaryocytic differentiation: an in vitro study. *Biochem.* 350(3): 723-734.

Lansigan, F., & Foss, F. M. (2010). Current and emerging treatment strategies for cutaneous T-cell lymphoma. *Drugs*, 70(3), 273-286. <https://doi.org/10.2165/11532190-000000000-00000>

Laurent, L., Wong, E., Li, G., Huynh, T., Tsiganos, A., Ong, C. T., Low, H. M., Kin Sung, K. W., Rigoutsos, I., Loring, J., & Wei, C. L. (2010). Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res*, 20(3), 320-331. <https://doi.org/10.1101/gr.101907.109>

Legrand, G., Humez, S., Slomianny, C., Dewailly, E., Vanden Abeele, F., Mariot, P., Wuytack, F., & Prevarskaya, N. (2001). Ca²⁺ pools and cell growth. Evidence for sarcoendoplasmic Ca²⁺-ATPases 2B involvement in human prostate cancer cell growth control. *J Biol Chem.* 276(50), 47608-47614. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107011200>

Leinonen, Rasko., Sugawara, H., & Shumway, M. (2011). The Sequence Read Archive. *Nucleic Acids Research.* 39: 19-21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1019>

Li, B., Carey, M., & Workman, J. L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128(4), 707-719. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>

Li, Y., & Seto, E. (2016). HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 6(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026831>

Liu, Y., Salvador, L. A., Byeon, S., Ying, Y., Kwan, J. C., Law, B. K., Hong, J., & Luesch, H. (2010). Anticancer activity of largazole, a marine-derived tunable histone deacetylase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* 335(2), 351-361. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.172387>

Lytton, J., Westlin, M., Burk, S. E., Shull, G. E., & MacLennan, D. H. (1992). Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem.* 267(20), 14483-14489. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1385815>

- MacLennan, D.H., Brandl, C.J., Korczak, B., Green, N.M. (1985) Amino-acid sequence of a $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature*. 316(6030):696-700. <https://doi.org/10.1038/316696a0>.
- Maresca, A; Zaffagnini, M; Caporali, L; et al. (2015). DNA methyltransferase 1 mutations and mitochondrial pathology: Is mtDNA methylated?. *Frontiers in Genetics*. 6:90. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00090>
- Marks, P. A., & Breslow, R. (2007). Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotechnol*, 25(1), 84-90. <https://doi.org/10.1038/nbt1272>
- Martin, V., Bredoux, R., Corvazier, E., Van Gorp, R., Kovacs, T., Gelebart, P., & Enouf, J. (2002). Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family. *J Biol Chem*. 277(27), 24442-24452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202011200>
- Martin-Richard, M., Custodio, A., Garcia-Giron, C., Gravalos, C., Gomez, C., Jimenez-Fonseca, P., Manzano, J. L., Pericay, C., Rivera, F., & Carrato, A. (2015). Seom guidelines for the treatment of gastric cancer 2015. *Clin Transl Oncol*, 17(12), 996-1004. <https://doi.org/10.1007/s12094-015-1456-y>
- Meneses, I; Izquierdo, E; Flores, L. ET AL. (2019). Epigenetic regulation of the human ATP2A3 gene promoter in gastric and colon cancer cell lines. *Molecular Carcinogenesis*. 58(6):887-897 <https://doi.org/10.1002/mc.22978>
- Mendioroz, M; Pulido, L; & Méndez, I. (2015). Neuroepigenética: metilación del ADN en la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Medicina Clínica*. 144(10): 457-464. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2014.03.023>
- Miyauchi, Y., Daiho, T., Yamasaki, K., Takahashi, H., Ishida-Yamamoto, A., Danko, S., Suzuki, H., & Iizuka, H. (2006). Comprehensive analysis of expression and function of 51 sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase mutants associated with Darier disease. *J Biol Chem*, 281(32), 22882-22895. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601966200>
- Monteith, G. R., McAndrew, D., Faddy, H. M., & Roberts-Thomson, S. J. (2007). Calcium and cancer: targeting Ca^{2+} transport. *Nat Rev Cancer*, 7(7), 519-530.

<https://doi.org/10.1038/nrc2171>

Nakamura, Y., Hattori, N., Lida, N., Yamashita, S., Mori, A., Kimura, K., Yoshino, T., Ushijima, T. (2017). Targeting of super-enhancers and mutant BRAF can suppress growth of BRAF-mutant colon cancer cells via repression of MAPK signaling pathway. (2017). *Cancer Lett.* 402:100-109. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.017>.

National Human Genome Research Institute. Grupo de Trabajo sobre el Epigenoma Humano de la Asociación Estadounidense para la Investigación del Cáncer y la Unión Europea, Red de Excelencia, Consejo Asesor Científico (2008). (<https://www.genome.gov/search?terms=epigenetics>)

Odermatt, A., Taschner, P. E., Scherer, S. W., Beatty, B., Khanna, V. K., Cornblath, D. R., Chaudhry, V., Yee, W. C., Schrank, B., Karpati, G., Breuning, M. H., Knoers, N., & MacLennan, D. H. (1997). Characterization of the gene encoding human sarcolipin (SLN), a proteolipid associated with SERCA1: absence of structural mutations in five patients with Brody disease. *Genomics*, 45(3), 541-553. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4967>

Ooi, W. F., Xing, M., Xu, C., Yao, X., Ramlee, M. K., Lim, M. C., Cao, F., Lim, K., Babu, D., Poon, L. F., Lin Suling, J., Qamra, A., Irwanto, A., Qu Zhengzhong, J., Nandi, T., Lee-Lim, A. P., Chan, Y. S., Tay, S. T., Lee, M. H., . . . Tan, P. (2016). Epigenomic profiling of primary gastric adenocarcinoma reveals super-enhancer heterogeneity. *Nat Commun*, 7, 12983. <https://doi.org/10.1038/ncomms12983>

Orouji, E., Raman, A. T., Singh, A. K., Sorokin, A., Arslan, E., Ghosh, A. K., Schulz, J., Terranova, C., Jiang, S., Tang, M., Maitituoheti, M., Callahan, S. C., Barrodia, P., Tomczak, K., Jiang, Y., Jiang, Z., Davis, J. S., Ghosh, S., Lee, H. M., . . . Rai, K. (2022). Chromatin state dynamics confers specific therapeutic strategies in enhancer subtypes of colorectal cancer. *Gut*, 71(5), 938-949. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322835>

Pacifico, F., Ulianich, L., De Micheli, S., Treglia, S., Leonardi, A., Vito, P., Formisano, S., Consiglio, E., & Di Jeso, B. (2003). The expression of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases in thyroid and its down-regulation following neoplastic transformation. *J Mol Endocrinol.* 30(3), 399-409. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0300399>

- Papp, B., & Brouland, J. P. (2011). Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Pump Expression during Breast Tumorigenesis. *Breast Cancer (Auckl)*, 5, 163-174. <https://doi.org/10.4137/BCBCR.S7481>
- Papp, B., Brouland, J. P., Gelebart, P., Kovacs, T., & Chomienne, C. (2004). Endoplasmic reticulum calcium transport ATPase expression during differentiation of colon cancer and leukaemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 322(4), 1223-1236. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.030>
- Pogribny, I. P., Tryndyak, V. P., Muskhelishvili, L., Rusyn, I., & Ross, S. A. (2007). Methyl deficiency, alterations in global histone modifications, and carcinogenesis. *J Nutr.* 137(1 Suppl), 216S-222S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.1.216S>
- Berman, H., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T., Weissig, H., Shindyalov, I., Bourne, P. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research.* 28 (1): 235:242 <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Reyes, M. J., Trelles, G. M., Florido, G. M., Aun Ivo, E., Ortega, M.S. (2020). Resultados del programa de diagnóstico precoz de cáncer de colon y recto de Les Illes Balears en el Hospital Comarcal de Inca en las dos primeras rondas de su desarrollo en relación a la actividad endoscópica. *Medicina Balear.* 35(1): 26-36. <https://doi.org/10.3306/MEDICINABALEAR.35.01.26>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., & Smyth GK. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 43(7):e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>.
- Robert, M. F., Morin, S., Beaulieu, N., Gauthier, F., Chute, I. C., Barsalou, A., & MacLeod, A. R. (2003). DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet*, 33(1), 61-65. <https://doi.org/10.1038/ng1068>
- Roderick, H. L., & Cook, S. J. (2008). Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer*, 8(5), 361-375. <https://doi.org/10.1038/nrc2374>
- Sánchez, J. & Acevedo, P. (2015). Principales herramientas epigenéticas para el diagnóstico y seguimiento de neoplasias hematológicas. *Medicina & Laboratorio.* 21(1-2). 43-62

- Sepúlveda, J. R. (2006). Análisis de la localización y función de bombas de calcio y de sus isoformas en cerebelo adulto y en desarrollo. [Tesis de doctorado, Universidad de Extremadura]. Repositorio académico de la Universidad de Extremadura. <https://biblioteca.unex.es/tesis/8477237093.pdf>
- Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, *31*(1), 27-36. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>
- Siegel, R.; Miller, K; Fuchs, H. et al. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. *72*(1): 7-33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- Smyth, E. C., Verheij, M., Allum, W., Cunningham, D., Cervantes, A., Arnold, D., & Committee, E. G. (2016). Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, *27*(suppl 5), v38-v49. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw350>
- Stathis, A., Hotte, S. J., Chen, E. X., Hirte, H. W., Oza, A. M., Moretto, P., Webster, S., Laughlin, A., Stayner, L. A., McGill, S., Wang, L., Zhang, W. J., Espinoza-Delgado, I., Holleran, J. L., Egorin, M. J., & Siu, L. L. (2011). Phase I study of decitabine in combination with vorinostat in patients with advanced solid tumors and non-Hodgkin's lymphomas. *Clin Cancer Res*, *17*(6), 1582-1590. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1893>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, *71*(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Teng, S., Li, Y. E., Yang, M., Qi, R., Huang, Y., Wang, Q., Zhang, Y., Chen, S., Li, S., Lin, K., Cao, Y., Ji, Q., Gu, Q., Cheng, Y., Chang, Z., Guo, W., Wang, P., Garcia-Bassets, I., Lu, Z. J., & Wang, D. (2020). Tissue-specific transcription reprogramming promotes liver metastasis of colorectal cancer. *Cell Res*, *30*(1), 34-49. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0259-z>
- Tough, D. F., Tak, P. P., Tarakhovsky, A., & Prinjha, R. K. (2016). Epigenetic drug discovery: breaking through the immune barrier. *Nat Rev Drug Discov*, *15*(12), 835-853. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.185>
- Toyoshima, C; Nakasako, M; Nomura, H; et al. (2000). Crystal structure of the calcium pump

- of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*. 405: 647-655. <https://doi.org/10.1038/35015017>.
- Toyoshima, C., & Nomura, H. (2002). Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature*, 418(6898), 605-611. <https://doi.org/10.1038/nature00944>
- The UniProt Consortium. UniProt: the Universal protein knowledgebase in 2021 (2021). *Nucleic Acids Res.* 49:D1. <https://www.uniprot.org/>
- Valeri, N., Vannini, I., Fanini, F., Calore, F., Adair, B., & Fabbri, M. (2009). Epigenetics, miRNAs, and human cancer: a new chapter in human gene regulation. *Mamm Genome*, 20(9-10), 573-580. <https://doi.org/10.1007/s00335-009-9206-5>
- WorldHealth Organization International Agency For Research On Cancer (IARC) (2021). GLOBOCAN (<https://gco.iarc.fr/>)
- Wu, X., & Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet*, 18(9), 517-534. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>
- Wuytack, F., Raeymaekers, L., & Missiaen, L. (2002). Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium*. 32(5-6), 279-305. <https://doi.org/10.1016/s0143416002001847>
- Zaidi, S. K., Young, D. W., Montecino, M., Lian, J. B., Stein, J. L., van Wijnen, A. J., & Stein, G. S. (2010). Architectural epigenetics: mitotic retention of mammalian transcriptional regulatory information. *Mol Cell Biol*. 30(20), 4758-4766. <https://doi.org/10.1128/MCB.00646-10>
- Zarain, A; Fragoso, J; & Estrada, R. (2011). Calcium-regulated transcriptional pathways in the normal and pathologic heart. *IUBMB Life*. 63(10): 4758-4766. <https://doi.org/10.1002/iub.545>
- Zauber, A. G., Winawer, S. J., O'Brien, M. J., Lansdorp-Vogelaar, I., van Ballegooijen, M., Hankey, B. F., Shi, W., Bond, J. H., Schapiro, M., Panish, J. F., Stewart, E. T., & Wayne, J. D. (2012). Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *N Engl J Med*. 366(8), 687-696. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1100370>