



Universidad Nacional Autónoma de México

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“ANÁLISIS *IN SILICO* DE LA EXPRESIÓN Y REGULACIÓN
EPIGENÉTICA DE LAS BOMBAS DE CALCIO SERCA EN CÉLULAS DE
CÁNCER DE MAMA”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biól. Carolina Gómez Aguilar

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg
Facultad de Medicina

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Martha Robles Flores
Facultad de Medicina

Dr. Ernesto Soto Reyes Solís
Universidad Autónoma Metropolitana

Ciudad Universitaria, CD. MX, enero 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, me gustaría agradecer al Posgrado en Ciencias Bioquímicas y a la Universidad Nacional Autónoma de México, por aceptarme en su programa e institución, fue un gran orgullo formar parte de ellos.

Al CONACYT, por brindarme apoyo económico en estos dos años de maestría (No. De CVU: 900638 y No. de apoyo 736498). Al PAPIIT, por el financiamiento del proyecto la beca de obtención de grado por parte del proyecto IN219219, la cual fue una gran ayuda durante los meses finales de mi posgrado.

Al Dr. Ángel Zarain, por haberme aceptado como parte de su equipo, su apoyo y guía en el desarrollo de esta tesis, que, a pesar de las problemáticas enfrentadas, logramos sacar adelante.

A Gabriela Rodríguez, por toda su ayuda en laboratorio, no sé qué hiciéramos sin ti.

Al Dr. Andrés, le agradezco infinitamente toda su ayuda en la parte bioinformática. Su paciencia y compromiso que hicieron posible esta tesis.

A Ingrid Lara, por ser mi compañera y pilar en este camino. Tu optimismo lo fue todo.

A Eduardo Izquierdo, por siempre tener la disposición de dar su consejo y ayuda.

A mi comité tutor: Dra. Martha Robles y Dr. Ernesto Soto, por sus palabras y retroalimentación a lo largo de este proceso.

Al Laboratorio de la Dra. Martha: gracias a la Dra. Cristina, por su gran corazón y dedicación, a Carlos, Angie, Mike y Alejandro, por su compañía y apoyo.

A mi mamá, por tanto amor y cariño, su apoyo a todas mis decisiones durante estos años, te amo a distancia. A mi papá, hermanos Humberto y Valeria, los amo con el alma.

A mis abuelas Elvia y Crucita, por su amor, cariño e infinito apoyo a lo largo de todo este tiempo. A mi tía Paty, por todo el apoyo desde toda la vida y a Beatriz por siempre escuchar.

A Cindy, Carito, Diana, Andrea, Jorge y Aldo, por toda su amistad.

A Carolina, que, a pesar de la distancia, seguimos estando juntas.

A Arlyn y Trébol, como mis hermanas, como mi todo.

A Sharon, por subir este otro cerro juntas. Mi Rachel. Nunca olvidaré esta época juntas.

A Luis, que me acompañó desde el inicio hasta final, siempre tomando de mi mano, siempre ahí, y siempre conmigo.

DEDICATORIA

A Leticia González Orozco y Alva Murrieta Esquer
Por su fuerza infinita, que inspiró y motivó este trabajo

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	2
DEDICATORIA.....	3
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABLAS	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. ANTECEDENTES	15
II.1. Homeostasis de calcio en el entorno celular.....	15
II.1.1 ATPasas de Ca ²⁺ del retículo sarco/endoplásmico (SERCA).....	17
II.2. Homeostasis de calcio en cáncer	23
II.2.1. Expresión de las bombas SERCA en diferentes tipos de cáncer.....	24
II.2.2 Expresión de las bombas SERCA en cáncer de mama.....	28
II.5. Regulación Epigenética en cáncer de mama	31
II.5.1. Regulación epigenética de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en diferentes tipos de cáncer	37
II.5.2. Regulación epigenética de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en cáncer de mama.....	39
III. JUSTIFICACIÓN	41
IV. HIPÓTESIS CIENTÍFICA.....	42
V. OBJETIVOS	42
V.1. Objetivo General.....	42
V.2. Objetivos Específicos.....	42
VI. METODOLOGÍA	43
VI.1. Análisis de la expresión de los genes de las bombas SERCA en cáncer de mama.....	43
VI.1.1. Análisis de la expresión de los RNAm de las bombas SERCA en tumores de cáncer de mama	43
VI.1.2. Análisis de la expresión de los RNAm de las bombas SERCA en líneas celulares de cáncer de mama.....	44
VI.2. Análisis de la metilación de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i>	45
VI.2.1. Análisis de la metilación de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en tumores de cáncer de mama	45

VI.2.2. Análisis de la metilación de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en líneas celulares de cáncer de mama	46
VI.3. Análisis de la abundancia de marcas de histonas en la región promotora de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en líneas celulares de cáncer de mama	46
VI.4. Análisis de la correlación entre la expresión de SERCA1, SERCA2 y SERCA3 con el pronóstico y supervivencia de pacientes con cáncer de mama	47
VI.9. Análisis estadístico	47
VII. RESULTADOS.....	48
VII.1. Análisis de la expresión de los genes de las bombas SERCA en cáncer de mama	48
VII.1.1. Análisis de la expresión de los RNAm de las bombas SERCA en tumores de cáncer de mama	48
VII.1.2. Análisis de la expresión de los RNAm de las bombas SERCA en líneas celulares de cáncer de mama.....	50
VII.2. Análisis de la metilación de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i>	55
VII.2.1. Análisis de la metilación de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en tumores de cáncer de mama	55
VII.2.2. Análisis de la metilación de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en líneas celulares de cáncer de mama	56
VII.3. Análisis de la abundancia de marcas de histonas en la región promotora de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en líneas celulares de cáncer de mama	57
VII.4. Análisis de la correlación entre la expresión de SERCA1, SERCA2 y SERCA3 con el pronóstico y supervivencia de pacientes con cáncer de mama	62
VIII. DISCUSIÓN.....	67
VIII.1. Análisis de la expresión de los genes de las bombas SERCA en cáncer de mama ...	67
VIII.2. Análisis de la metilación de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i>	70
VIII.3. Análisis de la abundancia de marcas de histonas en la región promotora de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en líneas celulares de cáncer de mama	72
VIII.4. Análisis de la correlación entre la expresión de SERCA1, SERCA2 y SERCA3 con el pronóstico y supervivencia de pacientes con cáncer de mama	74
IX. CONCLUSIONES	76
X. PERSPECTIVAS	78
XI. LITERATURA CITADA	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Dinámica y homeostasis por señalización de calcio	16
Figura 2	Estructura de la bomba ATPasa de Ca ²⁺ del retículo endo/sarcoplásmico (SERCA)	18
Figura 3	Mecanismo de transporte y liberación de calcio en bombas SERCA	19
Figura 4	Isoformas de los genes humanos <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> por <i>splicing</i> alternativo	20
Figura 5	Comparación de los subtipos moleculares de cáncer de mama en tumores y líneas celulares	29
Figura 6	Organización de la cromatina y modificaciones de marcas de histonas	32
Figura 7	Metilación del DNA	35
Figura 8	Expresión del RNAm de las bombas SERCA en tejidos	48
Figura 9	Expresión del RNAm de las bombas SERCA en muestras de tejido normal y tumoral primario de cáncer de mama	49
Figura 10	Expresión del RNAm las bombas SERCA en muestras de tejido normal y tumoral de distintos subtipos de cáncer de mama	50
Figura 11	Expresión del RNAm de las bombas SERCA en muestras de tumores por subtipos de cáncer de mama.	50
Figura 12	Expresión del RNAm de las bombas SERCA en líneas celulares de cáncer de mama.	51
Figura 13	Expresión del RNAm de las bombas SERCA en líneas celulares por subtipos de cáncer de mama	52
Figura 14	Expresión diferencial de los genes de las bombas SERCA en líneas celulares por subtipos de cáncer de mama	54
Figura 15	Metilación del promotor de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en muestras de tejido normal y tumoral de cáncer de mama	55
Figura 16	Metilación de la región reguladora proximal de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en muestras de tumores por subtipos de cáncer de mama	56
Figura 17	Metilación de la región reguladora proximal de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en líneas celulares por subtipos de cáncer de mama	57
Figura 18	Controles de localización y abundancia de marcas de histonas en líneas celulares por subtipos de cáncer de mama	58
Figura 19	Distribución de la marca de eucromatina H3K4me3 en la región promotora proximal de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en líneas celulares por subtipos de cáncer de mama	59

Figura 20	Distribución de la marca de eucromatina H3K9ac en la región promotora proximal de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en líneas celulares por subtipos de cáncer de mama	60
Figura 21	Distribución de la marca de eucromatina H3K27ac en la región promotora proximal de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en líneas celulares por subtipos de cáncer de mama.	61
Figura 22	Distribución de la marca de heterocromatina H3K27me3 en la región promotora proximal de los genes <i>ATP2A1</i> , <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> en líneas celulares por subtipos de cáncer de mama	62
Figura 23	Correlación de la expresión de SERCA1 con la supervivencia y pronóstico de pacientes de cáncer de mama por subtipo molecular	64
Figura 24	Correlación de la expresión de SERCA2 con la supervivencia y pronóstico de pacientes de cáncer de mama por subtipo molecular	65
Figura 25	Correlación de la expresión de SERCA3 con la supervivencia y pronóstico de pacientes de cáncer de mama por subtipo molecular	66

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Resumen de las alteraciones en la expresión de las bombas SERCA2 y SERCA3 en diferentes tipos de cáncer	25
---------	---	----

RESUMEN

Las ATPasas de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA's) son enzimas encargadas del bombeo activo de Ca^{2+} del citosol al lumen del retículo endoplásmico, regulando la captura del ión calcio y desencadenando procesos celulares importantes. Son codificadas por tres genes (*ATP2A1-3*), dando lugar a tres isoformas expresadas de manera tejido-desarrollo específica. Se han reportado cambios en la expresión de las bombas SERCA en cáncer de mama; particularmente la disminución de la expresión de SERCA3. Además, se han observado variaciones en su expresión de acuerdo con el subtipo molecular de cáncer de mama: luminal A, B, Her2 y triple negativo. Sin embargo, a pesar de estas diferencias en la expresión de SERCA por subtipo molecular, el estudio de su expresión y regulación a nivel epigenético es escaso. Este trabajo busca ampliar este panorama de manera *in silico*, mediante la consulta de bases de datos y el uso de herramientas bioinformáticas. Los resultados demuestran variación en la expresión de *ATP2A3* de acuerdo con el subtipo molecular de cáncer de mama en tumores y líneas celulares; con los mayores niveles de expresión en el subtipo luminal B y los más bajos en el triple negativo. Por otra parte, la expresión de *ATP2A2* se mantiene alta y la de *ATP2A1* baja o ausente; esto sustentado por su abundancia de marcas de histonas y niveles de metilación; la expresión de *ATP2A3* parece no estar regulada por la metilación de su promotor y presenta variaciones en su abundancia de marcas de histonas. Finalmente, se comprobó una asociación significativa entre la expresión de SERCA2 y SERCA3 y la supervivencia de pacientes de cáncer de mama, sobre todo en el subtipo triple negativo. Este estudio nos brinda un acercamiento de las variaciones en la expresión de las bombas SERCA en cáncer de mama, así como los posibles mecanismos responsables de dichos cambios.

ABSTRACT

The sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases (SERCAs) are responsible for the active pumping of Ca^{2+} from the cytosol into the lumen of the endoplasmic reticulum, regulating the capture of this ion and triggering important cellular processes. They are encoded by three genes (*ATP2A1-3*), generating three isoforms that are expressed in a tissue-specific and development manner. Previous reports have shown changes in the expression of the SERCA pumps in breast cancer; mainly the downregulation of SERCA3. In addition, variations in its expression have been observed according to the molecular breast cancer subtype: luminal A, B, Her2, and triple-negative. However, despite these differences in SERCA expression by molecular subtype, the study of its expression and epigenetic regulation is scarce. The present work expands this panorama *in silico*, by consulting databases and the use of bioinformatics tools. The results show variations in the expression of *ATP2A3* according to the breast cancer molecular subtype in tumors samples and cell lines, with the highest expression levels in the luminal B subtype and the lowest in the triple-negative. On the other hand, the expression of *ATP2A2* remains high, while the expression of *ATP2A1* is low or absent; this is supported by their histone marks abundance patterns and methylation levels; the expression of *ATP2A3* doesn't seem to be regulated by its promoter methylation and shows variations in its histone marks abundance. Finally, a significant association was found between SERCA2 and SERCA3 expression and overall survival in breast cancer patients, especially in the triple-negative subtype. This study provides a different and extended approach to the variations of SERCA pumps expression in breast cancer, as well as the possible mechanisms responsible for these changes.

I. INTRODUCCIÓN

El ion calcio (Ca^{2+}) es una molécula de señalización con un papel fundamental en el metabolismo, el crecimiento y la fisiología celular. El Ca^{2+} intracelular es almacenado y regulado principalmente en el retículo endoplásmico, a través de diferentes mecanismos como canales, proteínas de unión y bombas dependientes de ATP, como son las ATPasas de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA) (Schwarz y Blower, 2015). Las bombas SERCA son enzimas encargadas de bombear el Ca^{2+} de manera activa del citosol al lumen del RE, esto mediante la hidrólisis de una molécula de ATP por cada dos moléculas de Ca^{2+} (Arruda y Hotamisligil, 2015).

La liberación de Ca^{2+} al espacio citoplasmático y su recaptura por medio de las bombas SERCA resulta en el desencadenamiento de diversas redes de señalización dependientes de la concentración y duración de calcio en el citosol, que dan lugar a procesos celulares importantes como son la contracción muscular, procesos neuronales y de secreción, expresión génica, así como procesos celulares de proliferación, apoptosis, crecimiento y diferenciación (Alberts et al., 2002; Berridge et al., 2003, Periasamy y Kalyanasundaram, 2007; Brini y Carafoli, 2009).

Las bombas SERCA son ATPasas de tipo P, proteínas transmembranales de 110 kDa presentes en procariotas y eucariotas, así como en todos los tipos celulares, especialmente en células musculares. En vertebrados, las bombas SERCA están codificadas por tres genes, *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*, que codifican tres isoformas principales, SERCA1, SERCA2 y SERCA3 respectivamente; estas isoformas pueden formar 11 variantes por *splicing* alternativo, expresadas de manera tejido y desarrollo específico, además de variar en su afinidad y capacidad de transporte de Ca^{2+} (Hovnanian, 2007; Periasamy y Kalyanasundaram, 2007, Mekahli et al., 2011).

SERCA1 es codificada por el gen *ATP2A1* y es expresada principalmente en músculo esquelético de contracción rápida de manera desarrollo-específica. Contiene 23 exones y alternativamente codifica dos isoformas: SERCA1a (994; adulto) y 1b (1011 aa; fetal). SERCA2 es codificada por el gen *ATP2A2* y es ampliamente distribuida y codifica tres isoformas a partir de cuatro RNAm diferentes. Contiene 22 exones y codifica las formas SERCA2a (997 aa), coexpresada en adultos y neonatos en músculo cardíaco y estriado de contracción lenta, mientras que SERCA2b (1042 aa) es expresada durante todas las etapas del desarrollo y en todos los tejidos a bajas concentraciones, considerada una isoforma “*house-keeping*”; la isoforma

SERCA2c (999 aa) fue recientemente descubierta en músculo cardiaco. SERCA3 es codificada por el gen *ATP2A3* y se expresa en varios tejidos no musculares (tejido hematopoyético, epitelial, endotelial, nervioso, plaquetas y fibroblastos, entre otros). El gen *ATP2A3* contiene 23 exones que codifican para seis variantes a nivel de RNAm, 3a-3f (999-1052 aa); de las cuales, solo 3a, b y c han sido reportadas a nivel de proteína. Es la bomba SERCA cuyas isoformas presentan la menor afinidad a calcio (Periasamy y Kalyanasundaram, 2007).

Alteraciones, cambios en la expresión y mutaciones de las bombas SERCA culminan en un descontrol del balance en la regulación de calcio, y como consecuencia, el desarrollo de distintas patologías como son algunas formas de cáncer (Clapham, 2007; Mekahli et al., 2011, Schwarz y Blower, 2015). Esto ya que la desregulación en la liberación y captura de calcio en el espacio citosólico está relacionada al control de procesos importantes para la tumorigénesis, como son cambios en la expresión génica, procesos de reparación, proliferación, supervivencia celular, migración e invasión, así como la regulación del ciclo celular (Varga et al., 2018).

Existe una relación entre la alteración de las bombas SERCA y la carcinogénesis. Esto ha sido confirmado en distintos tipos de cáncer, los cuales presentan mutaciones y cambio de la expresión de las bombas SERCA, particularmente en los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*, que codifican para SERCA2 y SERCA3 respectivamente, lo cual culmina en la pérdida total o parcial de su expresión, e incluso en su aumento en algunos casos (Brini y Carafoli, 2009). En el caso del gen *ATP2A1*, que codifica para la bomba de calcio especializada en músculo esquelético, no se han reportado cambios en su expresión en cáncer.

Se ha observado una disminución de la expresión de SERCA2 en distintos tipos de cáncer: oral, tiroides, colon, próstata y pulmón, entre otros; por el contrario, es abundante en células epiteliales normales. Particularmente en el caso de SERCA3, se ha detectado una considerable reducción de su expresión en células de cáncer de colon, estómago, mama y pulmón; su expresión es abundante en mucosas y epitelios normales; sin embargo, SERCA3 responde de manera drástica a una malignidad, volviéndose casi indetectable (Flores et al., 2013).

La expresión de SERCA3 es abundante en tejido mamario normal; sin embargo, esta disminuye de manera abrupta ante la presencia de una lesión benigna o maligna en adenocarcinomas, incluso desde etapas muy tempranas. De igual forma es casi indetectable en carcinomas poco diferenciados, por lo que se sugiere que la expresión de SERCA3 puede

comportarse como un marcador de carcinogénesis y de diferenciación celular en cáncer de mama (Gélébart et al., 2002; Papp y Brouland, 2011; Contreras et al., 2015; Ait et al., 2017).

El cáncer de mama se clasifica según sus características moleculares en cuatro subtipos principales: luminal A, B, Her2 positivo y triple negativo. Esta categorización se basa en el estatus de expresión de los receptores hormonales de estrógenos (ER), progesterona (PGR) y el factor de crecimiento epidérmico 2 (ERBB2), lo cual nos indica su nivel de agresividad, pronóstico y respuesta ante tratamientos (Perou et al., 2000; Jiang et al., 2016).

La expresión de SERCA3 se ha correlacionado de manera inversamente proporcional a estos subtipos moleculares, en la que subtipos más diferenciados como Luminal A, B y Her2 presentan mayores niveles de SERCA3, mientras que los más agresivos, con menor sobrevivencia y poco diferenciados como los triples negativos, presentan menor expresión (Flores et al., 2013; Izquierdo et al., 2020). La bomba SERCA2 al tener una naturaleza constitutiva, tiene expresión abundante en todos los subtipos moleculares de cáncer de mama. Por otro lado, la expresión de SERCA1 es tejido-específica a músculo esquelético, por lo que se encuentra ausente en tejido mamario normal y no ha sido reportada en cáncer de mama (Dang y Rao, 2016; Varga et al., 2018; Makena y Rao, 2019).

La regulación de la expresión de SERCA en el cáncer tiene un carácter epigenético. Se han observado distintos mecanismos epigenéticos responsables de su expresión, como son las modificaciones post-traduccionales de histonas (HPM) y la metilación del DNA. Estas modificaciones son esenciales para la regulación epigenética de la expresión génica; su cooperación tiene un efecto en el estado de la cromatina, afectando su organización, densidad y accesibilidad a procesos transcripcionales, culminando en represión o activación de distintos genes (Hong et al., 2012; Audia y Campbell, 2016; Jin et al., 2019)

La regulación de *ATP2A2* y *ATP2A3* mediante mecanismos epigenéticos se ha estudiado experimentalmente en cáncer de mama, principalmente través de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7, representativas de los subtipos triple negativo y luminal A, respectivamente. Se ha reportado un aumento en la expresión de SERCA3 a nivel de RNAm al tratar a estas líneas celulares de cáncer de mama con un inhibidor de HDAC, la TSA (Tricostatina A), sin haber cambios en SERCA2. Al evaluar la abundancia de marcas de histonas para la activación transcripcional, como H3K27ac y H3K9ac en el promotor del gen *ATP2A3*, se encontró abundancia de ambas en MCF-7 (Contreras et al., 2015; Izquierdo et al., 2019). Al analizarse el

promotor proximal de *ATP2A3*, se observó que este no se encuentra metilado en ninguna de las líneas celulares mencionadas. De igual forma no se observaron cambios en la expresión de *SERCA2* y *SERCA3* al tratarlas con 5-aza-2-dC (inhibidor de DNMT). Se sugiere que el estado de metilación de DNA no tiene papel en la regulación de *ATP2A2* y *ATP2A3* para MCF-7 y MDA-MB-231 (Contreras et al., 2015).

El estudio de la expresión y regulación epigenética de las bombas *SERCA* en el cáncer de mama se ha enfocado experimentalmente en los subtipos triple negativo y luminal A, a través de las líneas celulares representativas mencionadas. A pesar de las diferencias en la expresión de las bombas *SERCA* en los distintos subtipos moleculares, particularmente *SERCA3*, el estudio de su expresión y regulación a nivel epigenético en otros subtipos y líneas celulares es escaso.

En este trabajo se propone ampliar este panorama de forma *in silico*, mediante su análisis en líneas celulares y muestras de tumores de los subtipos moleculares de cáncer de mama luminal A, B, Her2 y Triple negativo.

Esto se realizará mediante la consulta de bases de datos y diferentes herramientas bioinformáticas, enfocándonos en el análisis de expresión de los genes de las bombas de calcio *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*, determinación de su correlación con el pronóstico y sobrevivencia de pacientes, así como su análisis epigenético a través de su nivel de metilación y abundancia de marcas de histonas en su región promotora proximal. Con el fin de entender de manera más integral la función de las bombas *SERCA*, sobre todo *SERCA3*, en el cáncer de mama.

II. ANTECEDENTES

II.1. Homeostasis de calcio en el entorno celular

El Ca^{2+} citosólico es uno de los agentes de señalización más versátiles en el entorno celular, a cargo de distintos procesos, funciones e interacción de proteínas, organelos y ácidos nucleicos (Schwarz y Blower, 2015). Regula distintas funciones esenciales, desde el inicio de la vida en la fertilización, hasta su final en la muerte celular programada. Entre estos dos extremos, el calcio es mediador de distintas funciones importantes como son la transcripción génica, síntesis proteica, secreción, metabolismo, contracción muscular, proliferación, diferenciación celular, entre otras. Dada su relevancia en el metabolismo, fisiología y crecimiento celular, esta molécula requiere de un control preciso en espacio y tiempo, regulación brindada principalmente en el retículo endo- y sarcoplásmico (Brini y Carafoli, 2009; Mekahli et al., 2011).

Tanto el retículo endoplásmico (RE) de todos los tipos celulares, como el sarcoplásmico (RS) en las células musculares, son los principales compartimentos de almacenamiento y regulación del calcio intracelular. La concentración libre de Ca^{2+} en el citoplasma es de 100 nM, en el lumen del RE/RS de 100-800 μM , mientras que en el espacio extracelular es casi mil veces mayor (2 mM) (Schwarz y Blower, 2015). Para funcionar como un compartimento regulador intracelular de Ca^{2+} , el ER/SR expresa tres diferentes tipos de proteínas: 1) bombas de calcio para transportarlo del citosol al lumen de este, 2) proteínas lumbales de unión al calcio para su almacenamiento y 3) canales para la liberación controlada de calcio del lumen al citosol por un gradiente electroquímico (Mekahli et al., 2011).

La función del RE/RS es tanto de almacenamiento como de captura, transporte y control del Ca^{2+} intracelular a través de diferentes dinámicas de señalización y homeostasis: Durante reacciones de encendido (Reacciones 'On') ante un estímulo, se incorpora Ca^{2+} extracelular a través de canales de la membrana plasmática y se libera calcio al espacio citosólico desde los compartimentos celulares (principalmente del RE, además de mitocondrias y aparato de Golgi); por mensajeros como inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), ADP-ribosa y el Ca^{2+} , a través de receptores como el del IP3 (IP3R), receptores de rianodina (RyR) o por fuga del mismo. Es durante este periodo cuando el calcio se encuentra libre en el citosol, hasta su subsecuente recaptura en reacciones de apagado (Reacciones 'Off'), que se inducen reacciones dependientes del tiempo

que permanezca el Ca^{2+} en el citosol, que estimulan la activación celular y con ello diferentes procesos celulares, como la contracción muscular, la expresión de proteínas, el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular (Figura 1).

El nivel y tiempo de señalización del calcio intracelular es determinado por este balance entre reacciones de encendido que introducen Ca^{2+} al citosol y reacciones de apagado que lo remueven. Es este balance y mantenimiento de la homeostasis del calcio lo que facilita respuestas rápidas a distintas señales extracelulares, así como un correcto funcionamiento de los procesos celulares (Alberts et al., 2002; Berridge et al., 2003, Periasamy y Kalyanasundaram, 2007; Brini y Carafoli, 2009; Lipskaia et al., 2014).

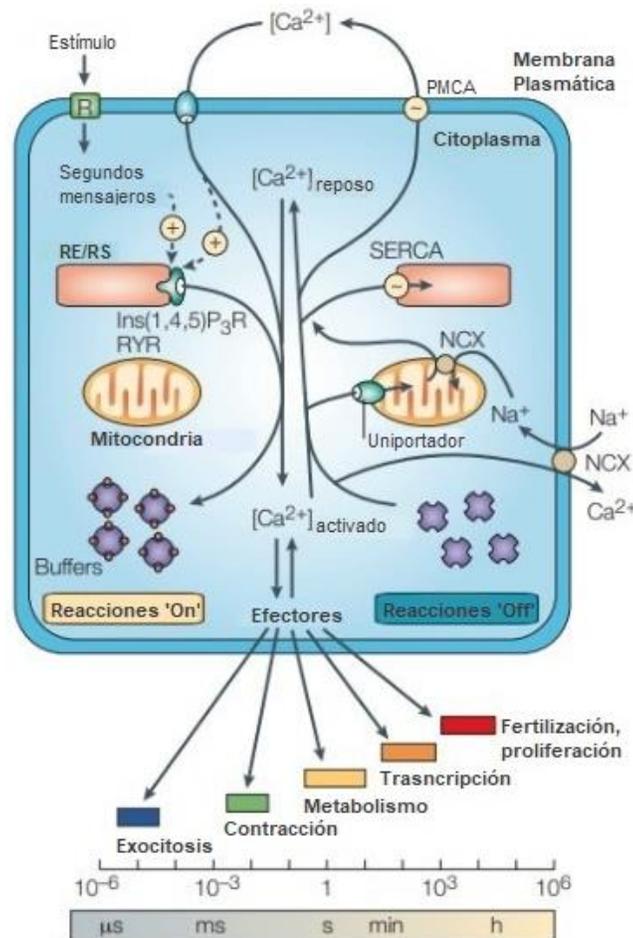


Figura 1. Dinámica y homeostasis por señalización de calcio. Se representan los diferentes procesos de liberación de Ca^{2+} desde el espacio extracelular y desde los compartimentos celulares; las reacciones inducidas en el espacio citosólico dependientes de tiempo y su recaptura a través de diferentes intercambiadores, proteínas buffer, canales y bombas. (Modificado de Berridge et al., 2013).

La célula no puede permanecer en estado activo por periodos prolongados, ya que un incremento en la concentración de Ca^{2+} puede ser citotóxico y afectar la procesividad del ciclo celular e inducir arrestos en fases iniciales del mismo o promover senescencia, así como la desregulación de procesos como la proliferación y la diferenciación celular. Por lo que, finalizada la función y señalización por Ca^{2+} , se estimulan las reacciones de apagado, para las cuales existen diferentes mecanismos como canales, proteínas buffer, intercambiadores (NCX) y bombas de calcio dependientes de ATP (PMCA y SERCA), para la recaptura de calcio del citosol. Esto ayuda a mantener los niveles basales de Ca^{2+} citosólico en aproximadamente 100 nM, los almacenes internos de calcio llenos y con ello el mantenimiento de su homeostasis. Una señalización anormal y desregulación de estos mecanismos de recaptura, tiene como consecuencia el desarrollo de múltiples patologías relacionadas a un manejo inadecuado del calcio (Berridge et al., 2003; Roderick y Cook, 2008).

Entre los mecanismos moleculares de control y regulación del calcio más importantes encontramos a los que involucran a las bombas/ATPasas de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico y a las enzimas encargadas del bombeo activo de calcio del citosol al lumen del RE y el RS durante las reacciones de “apagado” de la célula (Berridge et al., 2003).

II.1.1 ATPasas de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA)

Las ATPasas de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA) son enzimas encargadas de la regulación intracelular de Ca^{2+} (Alberts et al., 2002; Berridge et al., 2003). Durante un periodo de liberación y subsecuente recaptura de calcio, estas enzimas lo bombean desde el citosol al lumen del RE de manera activa, por lo que requieren de la hidrólisis de una molécula de ATP por cada dos moléculas de Ca^{2+} , creando así un gradiente electroquímico desde el RE (alta concentración) hacia el citosol (baja concentración) (Arruda y Hotamisligil, 2015; Aït et al., 2017). De esta manera las bombas SERCA moldean la amplitud y duración de las señales que inducen la activación celular y los diversos procesos mediados por calcio, dependientes de su concentración y duración en el espacio citoplasmático (Aït et al., 2017).

En el caso de las bombas SERCA, estas pertenecen a la familia tipo P de ATPasas, el término “tipo P” hace referencia a la formación de un intermediario fosforilado energético, a partir de la unión de ATP a un residuo de aspartato en una secuencia altamente conservada (Hovnanian, 2007). Estas bombas son proteínas transmembranales de 110-kDa, encontradas

tanto en procariontes como en eucariontes y están presentes en todos los tipos celulares, especialmente en las células musculares. Su estructura se ha observado como una única cadena polipeptídica plegada en cuatro dominios principales: un dominio transmembranal (M) compuesto de 10 hélices alfa (M1-M10) y tres dominios citosólicos (Figura 2). Dos de estos dominios, el actuador (A) y el de fosforilación (P) están unidos al dominio M, mientras que el de unión nucleotídica (N) está conectado al dominio P (Hovnanian, 2007).

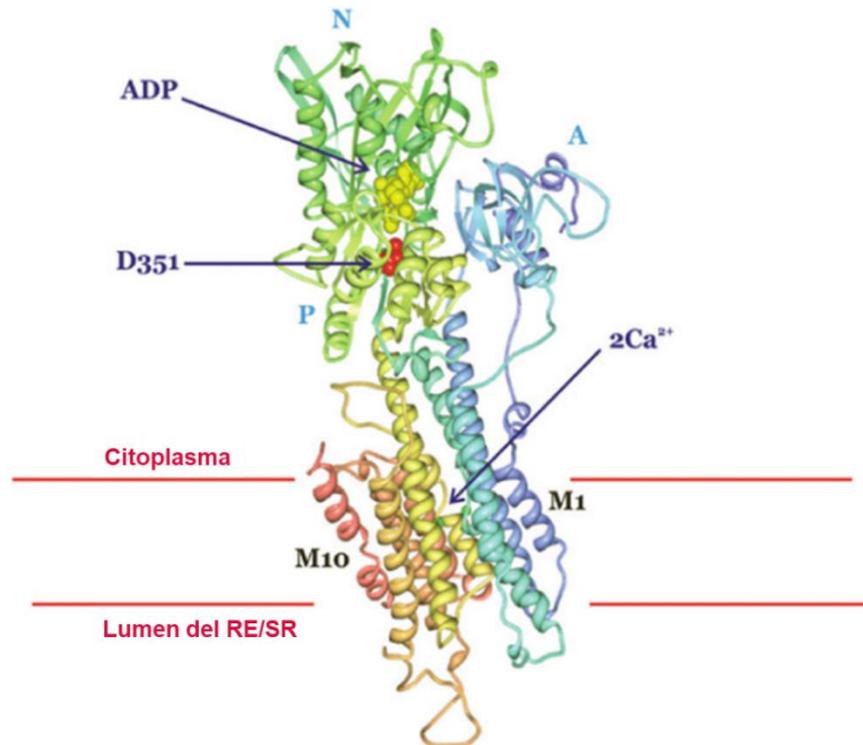


Figura 2. Estructura de la bomba ATPasa de Ca^{2+} del retículo endo/sarcoplásmico (SERCA). Esquema tridimensional de la bomba SERCA en su estado de unión a ADP y Ca^{2+} . Se observan los tres dominios citoplásmicos: de fosforilación (P), de unión nucleotídica (N) y actuador (A); así como los dominios transmembranales (M, M1-M10). En rojo se observa el residuo aspartato (D351), el cual es fosforilado durante la translocación de Ca^{2+} al retículo endo/sarcoplásmico. El ADP se muestra en amarillo, así como las dos moléculas de Ca^{2+} (Modificado de Watson, 2015).

Las bombas SERCA logran unir y translocar el Ca^{2+} del citosol al lumen del RE mediante un complejo ciclo de cambios conformacionales, lo cual logra una transición de una estructura citosólica compacta a una más abierta. Tras la unión de ATP y dos iones Ca^{2+} , ocurre una transfosforilación a partir de ATP a un residuo de ácido aspártico conservado, que lleva a un

cambio conformacional de una proteína con alta afinidad a calcio a un intermediario con baja afinidad. Estos pasos resultan de la interacción entre los dominios citoplasmáticos (N, A y P), culminando en la liberación de 2 iones de calcio al lumen del RE (Hovnanian, 2007; Brini y Carafoli, 2009). El mecanismo de esta reacción es interpretado de acuerdo con el esquema E1/E2: este postula que en el estado E1, los sitios de unión a calcio tienen alta afinidad y son accesibles desde el citoplasma, mientras que el estado E2 se tienen sitios de unión a calcio con baja afinidad y abiertos al lumen del lado extracelular (Figura 3) (Toyoshima y Inesi, 2004).

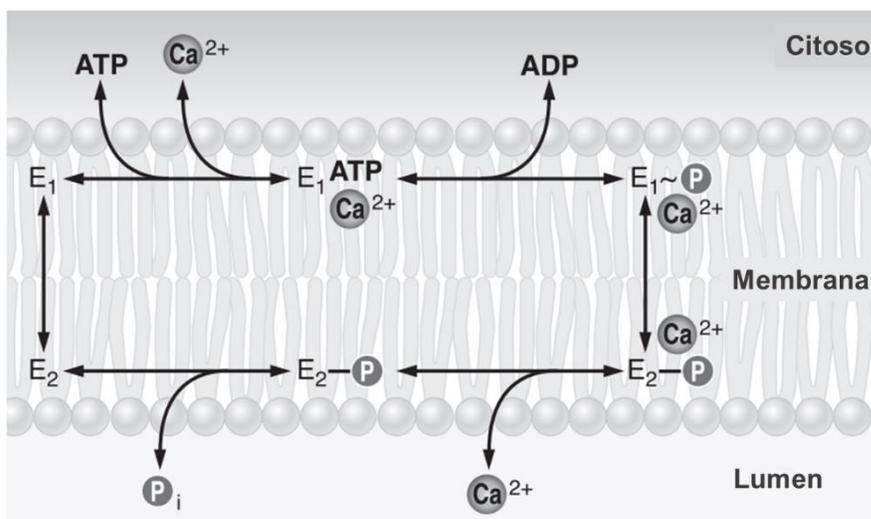


Figura 3. Mecanismo de transporte y liberación de calcio en bombas SERCA. El mecanismo de unión y traslocación de calcio de las ATPasas de calcio se puede explicar mediante el esquema E1/E2, que postula dos estados conformacionales principales: E1, que se une con alta afinidad a Ca^{2+} en el sitio citosólico, donde al ocurrir una fosforilación con ATP cambia al estado E2, de baja afinidad a Ca^{2+} liberándolo en el lumen del RE/SE. (Modificado de Brini y Carafoli, 2009).

En vertebrados las bombas SERCA son codificadas por tres distintos genes (*ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*) localizados en diferentes cromosomas; estos genes codifican tres isoformas principales en mamíferos, SERCA1, SERCA2 y SERCA3. En adición, existen 11 variantes de estas isoformas producidas mediante *splicing* alternativo de sus RNAm (Figura 4; Periasamy y Kalyanasundaram, 2007; Wray y Burdyga, 2010; Lipskaia et al., 2014).

Todos los miembros de la familia SERCA comparten la misma eficiencia (dos iones calcio por molécula de ATP), donde su funcionalidad difiere únicamente por su afinidad al calcio ($2b > 2a = 1 > 2c > 3$) y sus tasas de transporte. SERCA2b posee la mayor afinidad ($K_{ca} =$

0.26), pero la tasa de transporte más baja, seguida de SERCA2a (que posee baja afinidad $K_{ca}=0.28$, pero alta tasa de transporte comparada con SERCA2b), SERCA1a ($K_{ca}=0.28$) y finalmente SERCA3a ($K_{ca}=1.06$). Las isoformas de SERCA3 se caracterizan por una baja afinidad a calcio, pero una tasa de transporte alta (Lipskaia et al., 2014). Estas propiedades bioquímicas particulares de cada isoforma en cuanto a afinidad y transporte, además de su especificidad tejido-específica, sugiere su activación en momentos y tiempos determinados, descartando cualquier redundancia funcional entre ellas (Izquierdo et al., 2020).

Estas isoformas están altamente conservadas en su estructura primaria; sin embargo, además de diferir en su afinidad por el transporte de calcio, poseen diferentes patrones de expresión tejido y desarrollo específico. Se ha comprobado que las diferencias estructurales del residuo C-terminal son las responsables de la diferencia funcional de estas isoformas (Periasamy y Kalyanasundaram, 2007).

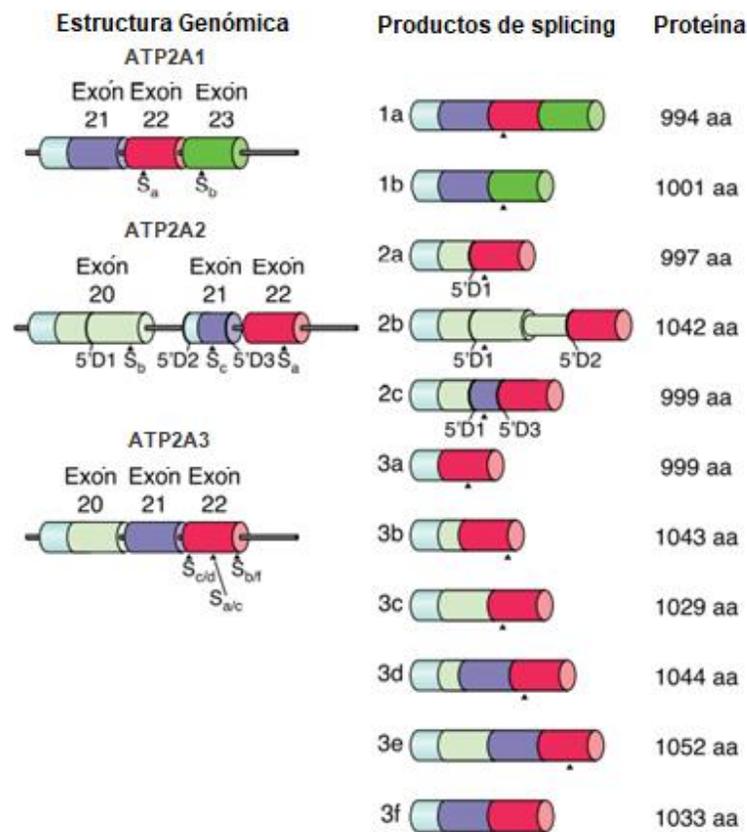


Figura 4. Isoformas de los genes humanos ATP2A1, ATP2A2 y ATP2A3 por *splicing* alternativo. Se representan los exones por cilindros de colores e intrones como líneas negras. Se indica el tamaño de la proteína SERCA resultante de cada isoforma. (Modificado de Brini y Carafoli, 2009).

SERCA1 es codificada por el gen *ATP2A1*, siendo un gen de 26.10 kb en el cromosoma 16p11.2. Se encuentra en la cadena sentido chr16:28,878,488-28,904,466 (GRCh38/hg38). Es expresada principalmente en músculo esquelético de contracción rápida de manera desarrollo-específica. Contiene 23 exones y alternativamente codifica dos isoformas: SERCA1a (994; adulto) y 1b (1011 aa; fetal) (Periasamy y Kalyanasundaram, 2007).

SERCA2 es codificada por el gen *ATP2A2*, de un tamaño de 70.33 kb en el cromosoma 12q24.11. Corre en la cadena sentido desde chr12:110,281,247-110,351,093 (GRCh38/hg38). Es ampliamente distribuida y codifica tres isoformas a partir de cuatro RNAm diferentes. Contiene 22 exones y codifica las formas SERCA2a (997 aa), coexpresada en adultos y neonatos en músculo cardíaco y esquelético de contracción lenta, mientras que SERCA2b (1042 aa) es expresada durante todas las etapas del desarrollo y en todos los tejidos (musculares y no musculares) a bajas concentraciones, considerada una isoforma “*house-keeping*”; la isoforma SERCA2c (999 aa) fue recientemente descubierta en músculo cardíaco (Periasamy y Kalyanasundaram, 2007).

SERCA3 es codificada por el gen *ATP2A3*, de un tamaño de 4.59 kb en el cromosoma 17q13.3. Corre en la cadena anti-sentido del chr17:3,923,869-3,964,464 (GRCh38/hg38). La región de su promotor se encuentra en una isla CpG de 890 pb desde la posición -320 a +409, además de la región del promotor proximal de -135 a -31 pb (Flores, et al., 2016; Meneses et al., 2019). Se expresa en varios tejidos no musculares (tejido hematopoyético, epitelial intestinal y tracto respiratorio, endotelial, nervioso (en neuronas Purkinje), linfocitos, plaquetas, mastocitos, fibroblastos, entre otros). El gen *ATP2A3* contiene 23 exones que codifican para seis variantes a nivel RNAm, 3a-3f (999-1052 aa); de las cuales, solo 3a, b y c han sido reportadas a nivel proteína. Es la bomba SERCA cuyas isoformas presentan la menor afinidad a calcio (Periasamy y Kalyanasundaram, 2007; Vandecaetsbeek et al., 2011).

Esta bomba se encuentra siempre coexpresada con SERCA2b; sin embargo, por sus diferencias en afinidad a calcio, SERCA2b con 0.2 μ M y SERCA3 con 0.8-1.2 μ M, SERCA2b se encuentra activa a niveles basales de calcio, mientras que SERCA3 actúa ante grandes concentraciones de calcio. Estas diferencias tienen consecuencias importantes en las dinámicas de captura de calcio en el RE, involucradas en moldear la duración, frecuencia, amplitud y forma de las señales de calcio (Arbajian et al., 2011).

Estas proteínas ayudan a mantener constante la homeostasis del calcio, tanto en procesos de recaptura basales durante la liberación de calcio, así como durante eventos de fuga del Ca^{2+} del RE hacia el citoplasma; por lo que las bombas SERCA están continuamente bombeando este Ca^{2+} citosólico hacia el RE, evitando el agotamiento de las reservas de calcio del RE (Berridge et al., 2003; Schwarz y Blower, 2015). Alteraciones, cambios en la expresión, bloqueos y mutaciones de las bombas SERCA culminan en una desregulación de este balance, y como consecuencia, el desarrollo de distintas patologías como enfermedades cardíacas, musculares, cutáneas, respiratorias, diabetes y el desarrollo de algunas formas de cáncer (Periasamy y Kalyanasundaram, 2007; Clapham, 2007; Mekahli et al., 2011, Schwarz y Blower, 2015).

Estudios de “knockout” de los genes que codifican para las bombas SERCA han revelado fenotipos importantes, definiendo dos desordenes génicos importantes por el silenciamiento de las bombas SERCA: la enfermedad de Brody y Darier, respectivamente. La primera, por pérdida de función por mutaciones recesivas en *ATP2A1*, es una condición genética autosomal caracterizada por calambres musculares, rigidez y dificultad en la relajación durante el ejercicio, debida al decremento en la toma de Ca^{2+} en el RS. Además, ratones con mutaciones nulas de *ATP2A1*, a pesar de nacer normales, desarrollan insuficiencias respiratorias debido a defectos en la contracción muscular del diafragma que llevan a cianosis y la muerte (Dang y Rao 2015; Pagliaro et al., 2021)

Por su parte, mutaciones de *ATP2A2*, llevan al desarrollo de la enfermedad de Darier, un desorden raro y severo de la piel caracterizado por heridas y falta de adhesión entre las células epidermales (Pagliaro et al., 2021). Este desorden genético, es autosomal y dominante, con más de 100 mutaciones reportadas a lo largo del gen, siendo prioritarias las mutaciones comunes entre las isoformas SERCA2a y SERCA2b; estos pacientes presentan menores concentraciones de Ca^{2+} en el RE, en algunos casos compensadas por SPCA1 (Dang y Rao 2015)

De manera similar, el “knockout” de *ATP2A3* en modelos de ratones sugiere defectos en la contracción muscular vascular y traqueal, así como alteraciones en la señalización de calcio en células pancreáticas. Incluso, se ha observado que variantes en su secuencia pueden estar asociadas a susceptibilidad de diabetes tipo II (Dang y Rao 2015).

Sin embargo, la pérdida de la función y cambios en la expresión de las bombas SERCA cobra una importancia particular en la desregulación de la homeostasis de calcio y en los

cambios en su señalización que llevan al desarrollo de cáncer, directamente relacionados a los procesos celulares característicos de la carcinogénesis.

II.2. Homeostasis de calcio en cáncer

La alteración de la señalización en el transporte de Ca^{2+} en los compartimentos celulares está implicada en la transformación maligna y en la carcinogénesis. Los mecanismos de señalización y homeostasis dependientes de Ca^{2+} se encuentran frecuentemente remodelados o desregulados en células cancerígenas (Roderick y Cook, 2008; Mekahli et al., 2011).

Las células cancerosas usan los mismos canales, bombas e intercambiadores que las células no malignas; sin embargo, existen alteraciones clave que afectan el flujo de calcio a través de la membrana plasmática y de los compartimentos intracelulares, como son: expresión de canales o bombas normalmente no presentes, cambios en los niveles de expresión, alteración de su localización, cambios post-traduccionales y mutaciones. Todas estas alteraciones, sobre todo cambios en actividad o expresión, asociadas a procesos relevantes para el desarrollo del cáncer (Monteith et al., 2012). Esto ya que el descontrol en la entrada y liberación de calcio al espacio citosólico está relacionada directa o indirectamente a los procesos principales de la tumorigénesis: cambios en la expresión génica, procesos de reparación, proliferación, supervivencia celular, migración e invasión, así como la regulación del ciclo celular (Varga et al., 2018).

Si bien la alteración de la regulación del calcio no es un requisito para la iniciación del cáncer, las consecuencias del desbalance de su transporte resultan significativas y contribuye a la progresión de la tumorigénesis (Casemore & Xing, 2015). Este cambio en la señalización del Ca^{2+} se ha reportado como responsable de varios aspectos del comportamiento metastásico de las células cancerosas, como son la EMT (transición epitelio- mesénquima), la migración, la inducción de angiogénesis y la intravasación (Iamshanova et al., 2017).

La EMT es un proceso dinámico y reversible en un carcinoma, permitiendo la diseminación metastásica de células tumorales. Durante este proceso, las células epiteliales pasan de un estado con características epiteliales, como adhesión y polaridad, a un estado casi-mesénquimal, constituyendo un fenotipo invasivo y migratorio. Por lo tanto, este proceso ha sido asociado a un incremento en agresividad y potencial metastásico/invasivo de las células cancerosas. La regulación anormal de señales de Ca^{2+} , tanto su activación como represión, han

sido reportadas durante procesos de EMT en varios tipos de cáncer. De igual forma, la alteración de la expresión de canales y bombas que controlan el transporte de Ca^{2+} , sobre todo del RE (SERCA, receptores RYR y IP3R), actúan como reguladores críticos durante la EMT en la oncogénesis (Adiga et al., 2020).

Las células tumorales han logrado remodelar la homeostasis del calcio para promover su sobrevivencia. Por ejemplo, el aumento de Ca^{2+} citosólico promueve la proliferación celular; sin embargo, esto también desencadena vías de apoptosis, por lo que existe una modificación en la maquinaria de señalización de calcio para promover su proliferación y evadir la muerte celular. En consecuencia, las alteraciones en la expresión y función de reguladores de la homeostasis del calcio que median estas señales, como son las bombas SERCA, tienen un papel importante en la tumorigénesis (Brini y Carafoli, 2009).

II.2.1. Expresión de las bombas SERCA en diferentes tipos de cáncer

Existe una relación entre la alteración de las bombas SERCA y la carcinogénesis (Brini y Carafoli, 2009). La incidencia de cáncer relacionada a esta remodelación de la homeostasis del calcio por SERCA ha sido confirmada en distintos tipos de cáncer, los cuales presentan mutaciones y cambios en la expresión de las bombas SERCA, particularmente en los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*, que codifican para SERCA2 y SERCA3, respectivamente; estas alteraciones llevan principalmente a la reducción total o parcial de la expresión de estas bombas de calcio (Tabla I; Flores et al., 2013). Por lo que la expresión anormal de estas proteínas podría constituirse como una señal temprana de carcinogénesis (Contreras et al., 2015).

En el caso del gen *ATP2A1*, que codifica para la bomba de calcio especializada en músculo esquelético, no se han reportado cambios en su expresión en cáncer. Ha sido considerado un marcador de estrés del RE ante tratamientos de cáncer de próstata, sin embargo, no se ha reportado aumento o disminución de su expresión en esta enfermedad (Yang et al., 2015).

Tabla I. Resumen de las alteraciones en la expresión de las bombas SERCA2 y SERCA3 en diferentes tipos de cáncer (Modificado de Flores et al., 2013).

Tipo de cáncer	Isoforma alterada	Cambio asociado a su expresión	Referencia
Oral	SERCA2 ↓	Mutación y metilación de promotor	Endo et al., 2004
Carcinoma de células escamosas	SERCA2 ↓	Ratón transgénico <i>ATP2A2^{+/-}</i>	Liu et al., 2001; Korošec et al., 2008
Tiroides	SERCA2 ↓	Expresión abundante en tejido normal	Pacifico et al., 2003
Mama	SERCA3 ↓	Disminución en lesiones precancerosas	Papp y Brouland, 2011
Leucemia	SERCA3 ↓	Diferenciación in vitro con AR aumenta su expresión	Papp et al., 2004
Pulmón	SERCA3 ↓	Diferenciación in vitro con SCFAs aumentan su expresión	Arbabian et al., 2012
Colon, Pulmón y SNC	SERCA2 ↓ o ausente SERCA3 ↓ o normal	Diferentes mutaciones puntuales en ambos genes	Korošec et al, 2006; Brouland et al., 2005; Vanhoutvin et al., 2009; Korošec et al., 2009
Colon y estómago	SERCA3 ↓ o ausente	Diferenciación in vitro con SCFAs aumentan su expresión	Gelebart et al., 2002; Brouland et al., 2005
Próstata	SERCA 2b ↑	Tratamiento con prolactina disminuye su expresión	Crepin et al., 2007

Se ha reportado la disminución de la expresión de SERCA2 en distintos tipos de cáncer: de la cavidad oral, tiroides, colon, próstata, pulmón entre otros; por el contrario, siendo abundante en células epiteliales normales (Flores et al., 2013).

En el cáncer de colon, la expresión del RNAm de SERCA2 se encuentra disminuida o ausente con respecto a tejidos no cancerosos. Estos tejidos de cáncer colorrectal presentan un comportamiento altamente invasivo a ganglios linfáticos, así como mayor tendencia a metástasis, lo cual conlleva un peor pronóstico; esto ha propuesto a SERCA2 como un marcador

molecular para la progresión de cáncer de colon. En próstata, se observó que su disminución promueve la resistencia a la apoptosis y una alta proliferación, debido a un llenado ineficiente de los depósitos de calcio del RE. En líneas tumorales de tiroides, la expresión de SERCA2 es considerada un marcador de diferenciación, donde su disminución está asociada con la pérdida de la diferenciación y un peor pronóstico. En estudios de cáncer de pulmón se correlacionó con una expresión reducida de SERCA2 con el contenido de calcio del RE, el cual se encontraba bajo en comparación con células del epitelio bronquial normal, promoviendo la progresión tumoral (Izquierdo et al., 2020). En el cáncer oral, *ATP2A2* se ha postulado como un gen supresor de tumores, donde su disminución se constituye como un evento temprano en el desarrollo de esta neoplasia (Flores et al., 2012).

Además, se ha observado la disminución de SERCA2 en estudios con ratones haplodeficientes para esta proteína, los cuales se caracterizan por un incremento en incidencia de tumores celulares escamosos (Monteith et al., 2012). Estos ratones presentaban una sola copia funcional del gen *ATP2A2*, con tendencia a desarrollar cáncer a una edad avanzada, ya sea en células escamosas de estómago, mucosa, lengua, oral o piel (Izquierdo et al., 2020).

Particularmente en SERCA3, se ha detectado una considerable reducción de su expresión en células de cáncer de colon, estómago, mama y pulmón. Su expresión es abundante en mucosas y epitelios normales, sin embargo; esta responde de manera drástica a una malignidad, volviéndose casi indetectable en estos carcinomas (Flores et al., 2013). La expresión de SERCA3 se correlaciona de manera inversa al grado histológico del tumor, lo que podría proponer a *ATP2A3* como un marcador de pronóstico y supervivencia en cáncer; donde pacientes con mayor expresión de SERCA3 tienen un mejor pronóstico de vida que pacientes con una baja expresión (Izquierdo et al., 2020). Esto último reafirma la utilidad de determinar el nivel de expresión de *ATP2A3* a nivel de proteína, donde su abundancia estará correlacionada a la supervivencia de pacientes en distintos tipos de cáncer (Flores et al., 2013).

La alteración en la expresión de SERCA3 fue observada principalmente en líneas celulares de cáncer gástrico y colon en comparación con células no cancerosas. Su disminución se considera un evento temprano en el desarrollo de la carcinogénesis de colon, proponiendo a SERCA3 como marcador histoquímico del grado de malignidad e indicador de la pérdida de la homeostasis de calcio (Izquierdo et al., 2020). En cáncer de mama, se ha correlacionado la expresión de SERCA3 con el subtipo molecular, esto de manera inversamente proporcional, en

donde subtipos más diferenciados presentan mayores niveles de SERCA3; es considerado un marcador temprano en la carcinogénesis y del grado de malignidad tumoral. En cáncer de pulmón, observamos evidencia de la disminución de SERCA3 en líneas celulares y en muestras de pacientes, mientras que esta es abundante en células diferenciadas del epitelio bronquial normal; igualmente es considerado un marcador histoquímico del grado de malignidad y de la alteración en la homeostasis de calcio que promueve la progresión tumoral (Flores et al., 2013; Izquierdo et al., 2020).

Las isoformas de las bombas SERCA tienen un comportamiento paradójico en cáncer, ya que, en algunos casos, un aumento en su expresión tiende a conducir a mayor proliferación y migración, mientras que su inhibición puede promover la diferenciación y apoptosis. Esto posiblemente es atribuido a las diferencias en su afinidad a Ca^{2+} y de transporte, así como a los estadios en la progresión tumoral y el tipo de célula o tejido afectado (Chemaly et al., 2018).

Tanto la disminución de la expresión de SERCA2 como de SERCA3 se han asociado con el nivel de diferenciación de las células cancerosas, más que con la transformación maligna misma. La primera observable en cáncer de tiroides y la segunda en líneas de cáncer gástrico, colon y mama (Flores et al., 2013). Se ha observado que el grado de pérdida de diferenciación celular está relacionado de manera proporcional con la pérdida de expresión de SERCA en tumores malignos y benignos (Contreras et al., 2015).

Por ejemplo, en cáncer de mama, la expresión de SERCA3 disminuye en lesiones benignas de etapas tempranas y permanece baja hasta las más avanzadas, en donde está casi ausente. Esto comparado con la expresión abundante de SERCA3 en células epiteliales normales de la glándula mamaria, en donde el tejido mamario totalmente diferenciado tiene un sistema especializado y funcional de control de calcio en el RE, reflejado en los efectos tempranos de la posible remodelación de calcio que ocurren al perder la expresión de SERCA3. Incluso se han observado niveles de expresión de SERCA3 similares en tejido normal y en lesiones malignas altamente diferenciadas (Papp y Brouland, 2011; Contreras et al., 2015). SERCA3 parece ser integral en el proceso de diferenciación de células cancerosas, por lo que podría considerarse como un marcador fenotípico de diferenciación celular útil en la detección de carcinomas (Gélébart et al., 2002; Chemaly et al., 2018).

II.2.2 Expresión de las bombas SERCA en cáncer de mama

El cáncer de mama es el cáncer más común en mujeres y una de las causas de muerte más frecuentes en este grupo. Este adenocarcinoma se caracteriza por el crecimiento anormal y desordenado de células del epitelio de los conductos o lobulillos mamarios; tiene una alta capacidad de metástasis a hueso, pulmón y ganglios axilares (González y Alkon, 2013).

Esta es una enfermedad compleja con naturaleza heterogénea, lo que la ha llevado a ser clasificada por sus características moleculares, con base en el estatus de expresión de las proteínas ER (receptor de estrógenos, ESR1), PR (receptor de progesterona, PGR) y Her2 (factor de crecimiento epidérmico 2, ERBB2) (Jiang et al., 2016).

Perou et al. (2000), con base en esta caracterización molecular, propuso clasificar el cáncer de mama en cuatro subtipos principales, los cuales basan su respuesta y tratamiento disponible ya sea hormonal o quimioterapéutico en la expresión de los receptores mencionados, facilitando el diagnóstico y tratamiento de pacientes: Luminal, Her2 positivo, Triple Negativo y normal.

En 2001, Sørlie et al., ahondo más en la clasificación dividiendo al subtipo luminal en luminal A y B, esto con base en el pronóstico del subtipo y demostrando que los distintos subtipos moleculares tienen estadísticamente mejores pronósticos unos que otros; es decir, existe una tendencia de supervivencia de acuerdo al subtipo: el subtipo luminal A este asociado a un mejor pronóstico, seguido del luminal B, mientras que Her2 y Triple negativo están asociados a los peores pronósticos (Figura 5; Jia et al., 2020).

Estos subtipos moleculares de cáncer de mama se definen de la siguiente forma: Luminal A, positivos para ER, PR pero negativos para Her2; Luminal B, ER positivo, PR negativo y Her2 positivo; Her2 positivo, ER y PR negativo pero Her2 positivo y finalmente; Triple Negativo basal/bajo en claudinas con expresión negativa de ER, PR y Her2, siendo este último el cáncer más agresivo debido a su ausencia de receptores y con ello, nula respuesta al tratamiento hormonal (Perou et al., 2000; Ronde et al., 2010; Cancer Genome Atlas Network, 2012; Eliyatkin et al., 2015).

Los tumores del tipo luminal se dividen en A o B y son de los subtipos más comunes en cáncer de mama, siendo el A de los más mayoritarios (54.3% de los cánceres). Los tumores Luminales B tienden a ser de mayor grado que los A. Estos subtipos tienen buen pronóstico,

siendo el B significativamente más grave. Son tumores más diferenciados, que responden bien a tratamientos hormonales, a diferencia de su respuesta a quimioterapia (Dai et al., 2015).

Los tumores del tipo que sobreexpresa Her2 y los triples negativos son los más agresivos y menos diferenciados. Los tumores Her2 positivos tienden a ser de grado 3 y tienen un pronóstico pobre, aunque son sensibles a quimioterapia y tratamientos con anticuerpos. Por otro lado, los triples negativos se clasifican como los tumores más agresivos, con peor pronóstico y más baja supervivencia; estos igualmente tienden a ser de grado 3. Debido a su estatus negativo en receptores, no son aptos para terapias convencionales, dejando únicamente la quimioterapia como opción de tratamiento (Dai et al., 2015; Jia et al., 2020).

Dada la heterogeneidad de esta enfermedad y los distintos subtipos presentes, existen distintas líneas celulares de cáncer de mama representativas de cada uno de estos subtipos, que logran reflejar sus características moleculares primordiales, permitiéndonos su estudio in vitro. (Dai et al., 2017).

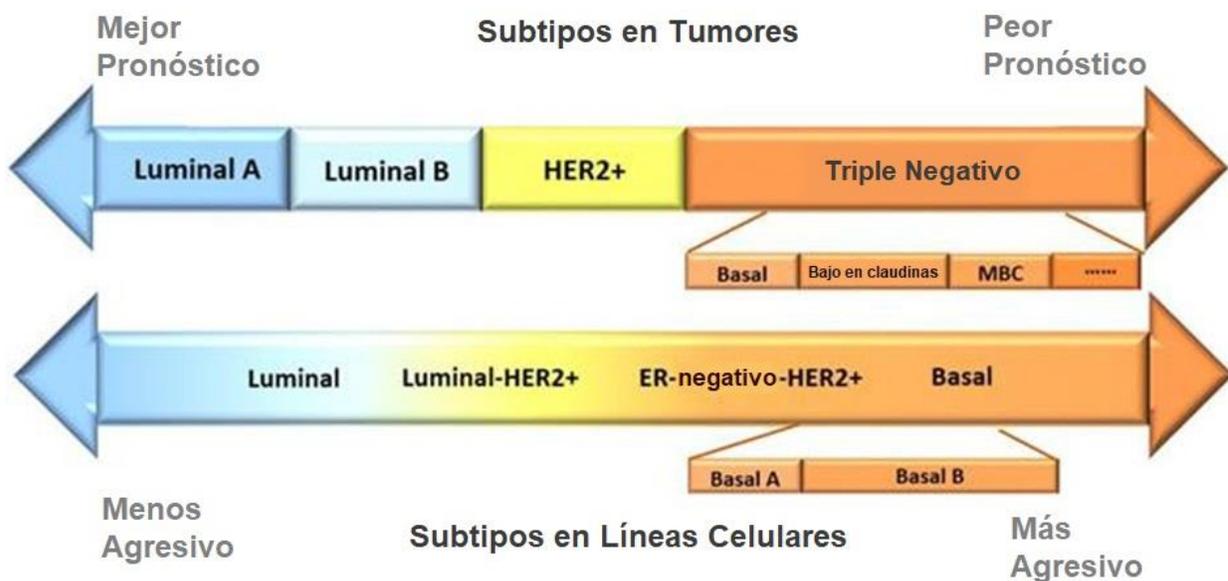


Figura 5. Comparación de los subtipos moleculares de cáncer de mama en tumores y líneas celulares. Se establece el nivel de agresividad y pronóstico con base en los subtipos Luminales A, B, Her2 y Triple Negativo de cáncer de mama. (Modificado de Dai et al., 2017).

La bomba SERCA2, por su naturaleza constitutiva o “*house-keeping*”, tiene una expresión abundante en todos los subtipos celulares de cáncer de mama (Varga et al., 2018). Mientras que SERCA1, por sus características tejido-específicas a músculo esquelético, se

encuentra ausente en tejido mamario, por lo que no se han reportado cambios en su expresión en cáncer de mama (Dang y Rao, 2016).

Como se mencionó anteriormente, la expresión de SERCA3 es abundante en tejido mamario normal; sin embargo, su expresión responde de manera drástica ante la presencia de una lesión benigna o maligna en adenocarcinomas. SERCA3 disminuye de manera abrupta en lesiones no malignas desde etapas muy tempranas, por lo que la homeostasis de calcio en el RE, sea posiblemente remodelada durante los inicios de la tumorigénesis del epitelio mamario. La pérdida de SERCA3 podría estar involucrada en la formación de los pasos tempranos o premalignos de la tumorigénesis. Esto permitiría considerar a SERCA3 como un marcador de carcinogénesis temprana en cáncer de mama (Papp y Brouland, 2011).

La expresión de SERCA3 varía en los distintos subtipos moleculares, según su grado de diferenciación y agresividad, siendo abundante en subtipos más diferenciados y menos agresivos como el Luminal A, B y Her2, mientras que disminuye parcial o totalmente en los menos diferenciados y más agresivos, como son los triples negativos (Varga et al., 2018; Makena y Rao, 2019). Este patrón de expresión se aprecia en las distintas líneas celulares de cáncer de mama representativas de dichos subtipos. Se ha encontrado expresión considerable de SERCA3 en líneas celulares luminales A (MCF-7, T47D y ZR-75-1), líneas luminales B (BT474) y Her2 (SKBR3 y AU-565). Sin embargo, esta ha sido indetectable en subtipos triple negativos (MDA-MB-231, MDA-MB-468, Hs578T y BT549) (Dang et al., 2016; Varga et al., 2018).

La expresión de SERCA3 en carcinomas de mama están inversamente correlacionada al grado nuclear, proliferación y expresión de receptores hormonales. Carcinomas de subtipo triple negativo tiene un decremento importante en la expresión de SERCA3, siendo esta pérdida, el marcador más fuerte de estos tumores con estatus ER-, de alto grado nuclear y altamente proliferativos (Papp y Brouland, 2011).

Papp y Brouland (2011) proponen que la pérdida de SERCA3 en células epiteliales mamarias puede causar una disminución en las reservas de calcio movilizable por IP₃, provocando una regulación autónoma en la célula, además de inhabilitarla a responder a estímulos extracelulares. La correlación entre el grado de expresión de SERCA3 con estos marcadores moleculares en cáncer de mama conecta por primera vez a estos procesos de tumorigénesis con una expresión anormal de las bombas de calcio del RE.

II.5. Regulación Epigenética en cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad compleja causada por diferentes factores, y actualmente se ha reconocido la importancia de los cambios epigenéticos en su ocurrencia y desarrollo, como son las modificaciones post-traduccionales de histonas (HPM) y la metilación del DNA (Jin et al, 2019). Estos mecanismos contribuyen a la tumorigénesis en tres formas importantes: 1) la regulación de la expresión anormal de genes, 2) los mecanismos de reparación del DNA disfuncionales y 3) la inestabilidad cromosómica (Chen et al., 2019)

El DNA se encuentra fuertemente empaquetado en el núcleo, en una estructura dinámica reconocida como cromatina, la cual se compone de nucleosomas. Cada nucleosoma se constituye de proteínas histonas, formando un octámero que contiene dímeros de cuatro histonas principales (H3, H4, H2A y H2B), alrededor de las cuales se enrolla un segmento de DNA de 147 pb. Estos nucleosomas se encuentran separados por segmentos cortos de DNA de unión, localizados en los sitios de entrada/salida de cada nucleosoma; este DNA de unión varía de 20-90 pb dependiendo de la especie, tejido y tipo celular (Szerlong y Hansen, 2011; Audia y Campbell, 2016).

Las cuatro proteínas histonas poseen un núcleo y dominios desestructurados N-terminales y C-terminales (particularmente en la histona H2A), los cuales sobresalen del núcleo central y están expuestos en la superficie del nucleosoma. Los residuos de lisina (K), arginina (R), serina (S), treonina (T) y glutamato (E) en el núcleo y los extremos N-terminales son objeto de una gran cantidad de modificaciones postraduccionales (HPM) que afectan el estado de la cromatina (Chew et al., 2006; Smith y Denu, 2009; Biswas et al., 2011). Estas HPM influyen en la densidad, estructura y organización de la cromatina, impactando procesos transcripcionales o sirviendo de módulos de reconocimiento para unión de distintas proteínas que a su vez envían señales que alteran la estructura y función de esta (Audia y Campbell, 2016).

La estructura condensada de la cromatina forma una barrera ante distintos procesos celulares que requieren acceder al DNA, como es la replicación, la reparación de daños y la transcripción (Workman et al., 1998). Por lo que estas modificaciones, al afectar su condensación, organizan al genoma en dos formas: la activa, llamada eucromatina y la inactiva llamada heterocromatina (Figura 6) (Miller y Grant, 2013).

Las histonas pueden ser modificadas post-traduccionamente de distintas maneras, como es la acetilación, metilación y ubiquitinación de su lisina, metilación o citrulinación en su arginina y fosforilación en serina, treonina y tirosina. De estas, la acetilación y la metilación, son dos modificaciones importantes y conocidas que ocurren en las proteínas histonas: la acetilación de histonas tiende a estar asociadas con activación génica (eucromatina); mientras que la metilación, dependiendo del estado y posición, puede ser asociada con represión (heterocromatina) o activación (Wang et al., 2008).

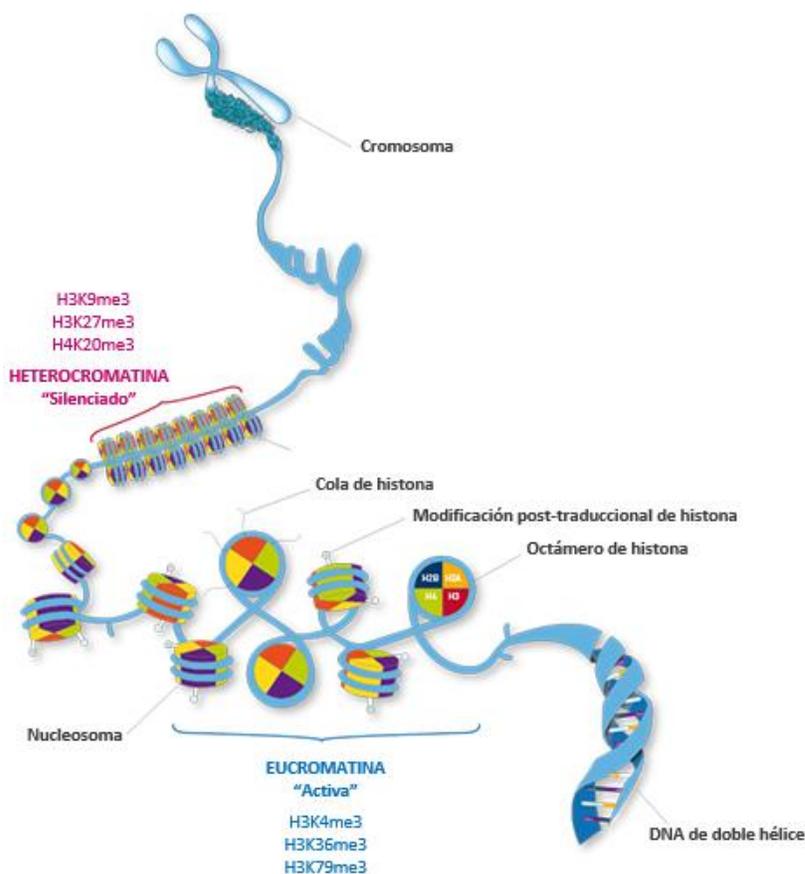


Figura 6. Organización de la cromatina y modificaciones de marcas de histonas. El DNA se organiza en nucleosomas conformados en un octámero de histonas, que sufren modificaciones importantes como acetilación o metilación para la activación (eucromatina) o represión transcripcional (heterocromatina) respectivamente. (Modificado de Diagenode, 2021).

Las enzimas que catalizan la adición de grupos acetilo en los residuos de lisina de las proteínas histonas son las acetiltransferasas de histonas (HATs), clasificadas como acetiltransferasas de lisina (KATs) (Wapenaar y Dekker, 2016). Por otro lado, las enzimas encargadas de desacetilar histonas son las HDACs, de las cuales se han identificado 18 en

mamíferos. Tanto la actividad de las HATs como de las HDACs, son requeridas en conjunto para la regulación de la expresión génica (Audia y Campbell, 2016; Yoon y Hyeon, 2016).

La acetilación de histonas ocurre en todos los núcleos de histonas, entre ellos algunos sitios conservados de la histona H3 (K9, K14, K18, K23 y K27) y en la histona H4 (K5, K8, K12 y K16), así como en sitios menos conservados de las histonas H2A y H2B (Gao et al., 2020). Su acetilación está fuertemente correlacionada a la activación transcripcional, algunas ubicadas en sitios de inicio de la transcripción (TSS) o en potenciadores o *enhancers* de genes potencialmente activos. Esto ya que el grupo acetilo neutraliza la carga de los residuos de lisina, disminuyendo la interacción electrostática entre DNA e histonas, promoviendo un estado de cromatina “abierto” (Audia y Campbell, 2016). La eucromatina se caracteriza por niveles altos de acetilación, mientras que la heterocromatina por bajos niveles de acetilación (Miller y Grant, 2013).

Las modificaciones de histonas en H2AK9ac, H2BK5ac, H3K9ac, H3K18ac, H3K27ac, H3K36ac y H4K91ac tienden a localizarse alrededor del TSS (Miller y Grant, 2019). De las anteriormente mencionadas, la H3K9ac y la H3K27ac son dos marcas comúnmente usadas para estudiar la acetilación de histonas y estados de cromatina abierta. La acetilación de la histona H3 en la lisina 27 (H3K27ac) y en la lisina 9 (H3K9ac) son marcas de cromatina abierta, donde H3K27ac es considerada una marca importante en *enhancers* activos y promotores proximales (Gao et al., 2020).

La metilación de histonas se lleva a cabo en los residuos de lisina y arginina por medio de enzimas metiltransferasas de histonas (HMTs). Hay más de 20 sitios de metilación, donde los residuos de lisina pueden ser mono-, di- o trimetilados, mientras que la arginina solamente puede ser mono o dimetilada (Kimura et al., 2013; Miller y Grant, 2013).

La metilación de H3K4 está presente usualmente en *enhancers* y promotores de genes activos con estructura de cromatina abierta y es positivamente correlacionado al nivel de activación transcripcional. H3Kme1 está enriquecido en *enhancers*, H3K4me2 esta comúnmente en cuerpos de genes activos y H3K4me3 se observa en la región ORF 5' de genes y es catalizada por el complejo Triterax (Hong et al., 2012; Miller y Grant, 2019).

Por otro lado, la metilación de H3K27 es una marca represiva, relacionada con la heterocromatina y los sitios de inicio de la transcripción (TSS) de genes inactivos. H3K27me3 es una marca característica de genes homeóticos y catalizada por el complejo represor

Polycomb, mientras que H3K27me1 se encuentra enriquecido en sitios de heterocromatina (Hong et al., 2012; Miller y Grant, 2019).

Las HPM forman parte importante en la tumorigénesis y desarrollo de cáncer. En el cáncer, los factores que remodelan la cromatina se encuentran frecuentemente mutados o expresados de manera aberrante, con tendencia a silenciar genes supresores de tumores o activar oncogenes durante la tumorigénesis, llevando a alteraciones en estados transcripcionales, cambios en la identidad celular, comportamiento y respuesta a terapias (Elsheikh et al., 2009; Xi et al., 2018; Jin et al., 2019). Incluso se ha visto que la pérdida en la acetilación de K16 y la trimetilación de K20 de la histona H4, son marcas o “hallmarks” importantes del desarrollo de cáncer (Dimitrescu, 2012).

Las HDACs pueden inhibirse mediante inhibidores (HDACi), reconocidos como agentes anticancerígenos, los cuales al interactuar con estas enzimas logran alterar su función y con ello la transcripción génica y remodelado de la cromatina (Xu et al., 2007). Algunos ejemplos de estos agentes de uso terapéutico son la tricostatina A (TSA), butirato de sodio (NaB), ácido suberoilánidido hidroxámico (SAHA), entre otros de importante uso farmacéutico (Kim y Bae, 2011).

La metilación y acetilación de histonas son dos modificaciones importantes en la regulación de la expresión génica, asociadas fuertemente al cáncer de mama. La acetilación aberrante promueve la expresión descontrolada de genes involucrados en el ciclo celular, la apoptosis, el crecimiento celular; así mismo, el nivel de abundancia de ciertas HPMs han sido asociadas al tamaño tumoral y la invasión vascular (Dumitrescu, 2012). Además, las HDACi tienen un efecto atenuante en el cáncer de mama, por lo cual se le atribuye potencial terapéutico (Jin et al., 2019). Asimismo, la baja o nula acetilación de la histona H4K16ac ha sido asociada a la mayoría de los casos de cáncer de mama, así como a estadios tempranos, por lo que esta modificación se ha considerado un marcador temprano en el desarrollo de este cáncer (Jin et al., 2019; Vásquez et al., 2020).

Con base en la heterogeneidad molecular del cáncer de mama, se han observado patrones específicos de abundancia de histonas relacionadas a su subtipo molecular, donde existe una correlación entre el estado global de las modificaciones de histonas, el subtipo y el resultado clínico: niveles altos de acetilación y metilación en tumores de subtipo luminal asociados a un mejor pronóstico, mientras que una menor acetilación y metilación de histonas se asocia a

carcinomas de tipo triple negativo y con mala respuesta a tratamientos (Vásquez et al., 2020). Esto corroborado con niveles reducidos en la abundancia de ciertas marcas de histonas (H3K9ac, H3K18ac, H4K12ac, H3K4me2 y H3K20me3), que se asocian de igual forma a un peor pronóstico, relacionados con subtipos agresivos, como son tumores de subtipos triple negativos o Her2 (Dumitrescu, 2012).

Otra de las modificaciones epigenéticas importantes en el DNA es su metilación, la cual, debido a su relevancia en la salud humana, así como en la ocurrencia de cáncer, es la más caracterizada debido a su cualidad supresora de genes. La adición de grupos metilos al DNA es mediante la DNA metil-transferasa (DNMT) en el carbono 5' de las citocinas, en particular las que preceden una guanina o sitios CpG (Figura 7) (Miller y Grant, 2019). La mayoría de los sitios CpG se encuentran fuertemente metilados, con excepción de las islas CpG (Moore et al., 2013).

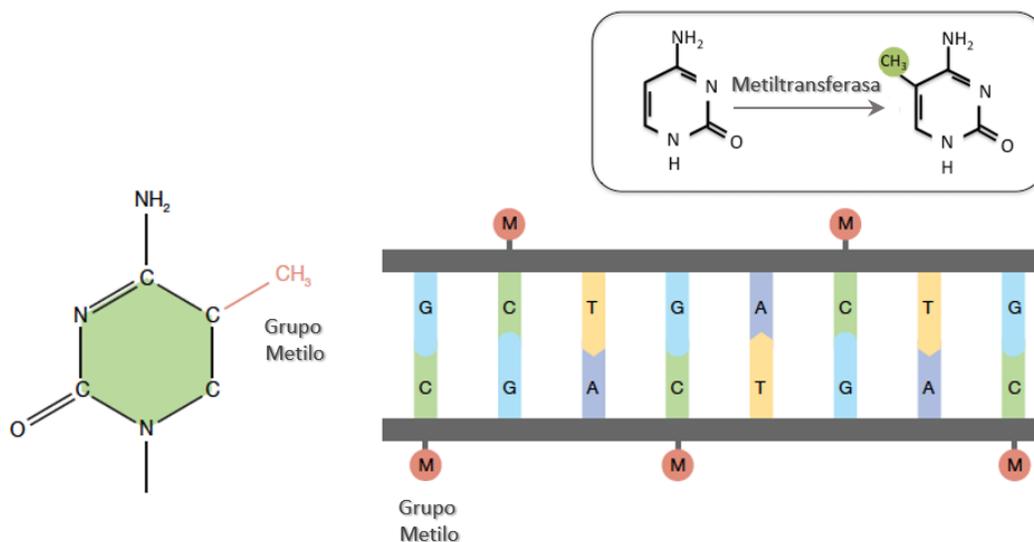


Figura 7. Metilación del DNA. El DNA se metila a través de enzimas metiltransferasas que añaden un grupo metilo al carbono 5' de las citocinas de sitios CpG, controlando así la expresión génica. DNA que se encuentra metilado es silenciado, regulando así la expresión génica. (Modificado de ThermoFisher, 2021).

Las islas CpG (CpGI) son regiones de DNA de aprox. 1000 pares de bases con una densidad de CpG mayor a la que encontrarías en el resto del genoma, aunque estas no se encuentran metiladas; la mayoría de los promotores (70%) se encuentran dentro de una isla CpG, sobre todo en los genes constitutivos. Sin embargo, las islas CpG son esenciales durante

el desarrollo de mamíferos, debido a su papel en la inactivación del cromosoma X (Deaton y Bird, 2011). Adicionalmente, estas pueden metilarse en algunos tejidos durante el envejecimiento y reprimir genes supresores de tumores (Moore et al., 2013).

La metilación del DNA se asocia al silenciamiento de genes debido a dos factores: impedir el acceso a proteínas de unión al DNA que activan o reclutan activadores transcripcionales y por el reclutamiento *per se* de proteínas de unión a DNA metilado (MBP). Esto ya que una vez que el DNA es metilado, las proteínas MBP pueden traer complejos HDAC, proteínas Polycomb, así como complejos remodeladores de la cromatina que repriman la expresión génica (Miller y Grant, 2019). La metilación del DNA es esencial para silenciar elementos retrovirales, para regular la expresión génica tejido-específica y para inactivar al cromosoma X a través de las CpGI, entre otras (Moore et al., 2013).

En el cáncer, la hipermetilación en regiones promotoras lleva a la inactivación de genes supresores de tumores; se han observado una gran cantidad de genes silenciados por metilación del DNA en diferentes tipos de tumores. Por otra parte, la hipometilación lleva a la inestabilidad genómica, contribuyendo igualmente a la transformación maligna (Kulis y Esteller, 2010). Tanto la hipometilación como la hipermetilación han sido reconocidas como causantes de diferentes tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de mama (Han et al., 2010).

Se reconoce que tumores de cáncer de mama se encuentran hipometilados a escala genómica, la cual se ha asociado a características tumorales específicas como tamaño, estadio y grado histológico (Dumitrescu, 2012); sin embargo, se han reportado más de 100 genes hipermetilados en tumores de cáncer de mama o líneas celulares, los cuales tienen roles importantes en procesos de regulación del ciclo celular, apoptosis, metástasis, angiogénesis y señalización hormonal (Jonanovic et al., 2010).

Como se ha observado en modificaciones de marcas de histonas, cada subtipo molecular también presenta un patrón de metilación distintivo. El subtipo con los niveles de metilación más altos en CpGs es el luminal, en específico, luminal B; mientras que los tumores de tipo triple negativo son los menos metilados. Incluso, objetivos del complejo represor polycomb se encontraron con mayores niveles de metilación en luminales B que en otros subtipos. El patrón de metilación del DNA característico del subtipo luminal B es en islas CpG de los promotores (Stefansson et al., 2015; Dumitrescu, 2018).

El subtipo Her2 no tiene una asociación fuerte con un fenotipo metilado, sin embargo, se ha reconocido la hipermetilación de genes particulares ligados a su comportamiento clínico y a procesos importantes en la progresión del cáncer; este presenta patrones más cercanos a los subtipos luminales que a los triples negativos. En cambio, los tumores del subtipo triple negativo tienen una marca genómica muy específica, más parecida a otros tipos de cáncer como carcinomas de pulmones o de ovarios que al de otros subtipos de cáncer de mama. Este subtipo se caracteriza por una hipometilación a nivel genómico, en particular en el cuerpo del gen; sin embargo, se han reconocido ciertos eventos epigenéticos particulares relacionados a su desarrollo carcinogénico, como la hipermetilación del gen de la E-caderina y el gen BRCA, como predictores de su agresividad tumoral y pronóstico clínico (Stefansson et al., 2015; Dumitrescu, 2018).

A diferencia de las alteraciones genéticas y mutaciones, la metilación del DNA es reversible, y al igual que otras enzimas remodeladoras de la cromatina, las DNA metiltransferasas pueden inhibirse mediante inhibidores (DNMTi). Estas son herramientas usadas para entender el rol de la metilación del DNA en diferentes procesos, como la hipometilación del genoma, pero principalmente son utilizadas por su alcance terapéutico como fármacos epigenéticos (Giri y Aittokallio, 2019). El éxito de estos fármacos en tratar tumores producto de estas alteraciones, como son la 5-azacitidina, decitabina e incluso inhibidores de desacetilasas de histonas, vuelven a este fenómeno epigenético un blanco terapéutico importante en cáncer (Das y Singal, 2004).

II.5.1. Regulación epigenética de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en diferentes tipos de cáncer

Se ha estudiado la regulación epigenética de los genes que codifican las bombas SERCA en distintos tipos de cáncer, sobre todo de *ATP2A2* y *ATP2A3*. En el caso de *ATP2A1*, no se han observado efectos mayores de su alteración epigenética en cáncer, con excepción de su hipermetilación en leucemia linfoblástica y en cáncer orofaríngeo por HPV (Navarrete y Pérez, 2017; Misawa et al., 2020)

En el caso de *ATP2A2*, se ha observado su alteración epigenética principalmente en cáncer oral, tanto en tumores primarios como en células derivadas de lesiones precancerosas y en el carcinoma oral de células escamosas; donde su baja o nula expresión parece ser un evento

temprano en la carcinogénesis oral y regulada por medio de mecanismos epigenéticos (Prasad et al., 2005).

Sin embargo, la mayor parte del estudio de *ATP2A2* se ha hecho en conjunto con *ATP2A3*. La regulación epigenética de la expresión de *SERCA2* y *SERCA3* ha sido ampliamente estudiada en líneas de carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer de colon y estómago, como son Caco-2 y KATO-III.

En el trabajo de Flores et al., 2016, se trataron células de adenocarcinoma de colon Caco-2 y carcinoma gástrico KATO-III con HDACi (TSA y butirato), donde al inducir la diferenciación de las células malignas se observó un aumento de *SERCA3*, a la par que un reclutamiento de marcas de histonas de cromatina abierta como son H3K4me1 y H3K9ac, además de un decremento en la marca represiva H3K9me3. En el caso de *SERCA2b*, se observó un decremento en su expresión al tratar células KATO-III con butirato; además de observar que las isoformas *SERCA2a* y *c* estaban presentes a concentraciones bajas y que no cambiaron ante estímulos de diferenciación.

Meneses et al., 2019 determino a la posición de -280 a -135 como una región CpG de regulación epigenética para *ATP2A3* en KATO-III, responsable de la represión de este gen a través de metilación y marcas de histonas de heterocromatina. Al tratar células con butirato, la estructura represiva transcripcionalmente cambia a permisiva por mecanismos epigenéticos, a través de la pérdida de H3K27me3 y aumento de H3K27ac. También se observan niveles de metilación importantes en sitios CpG de ambas líneas celulares con baja expresión de *SERCA3*, sobre todo en el TSS, primer exón y parte del primer intrón. Al tratar las células KATO-III con 5-azacitidina (inhibidor de DNMTi) se observó un importante decremento del nivel de metilación en la zona del promotor -280 a -135, así como un aumento en la expresión de *SERCA3*. Para CACO-II, el tratamiento con 5-azacitidina no tuvo cambios, por lo que se corrobora que el aumento en la expresión de *SERCA3* es debido a cambios en abundancia de marcas de histonas y factores de transcripción.

En un estudio con muestras de HCC humanas y células HCC AS-30D de rata, se observó una baja expresión de *ATP2A3* y *ATP2A2* comparadas con muestras de hígado sano, así como una correlación entre la expresión de *SERCA3* y la supervivencia de pacientes, habiendo mayor sobrevivencia en los que expresaran más *SERCA3*. Al tratar estas células con NaB y TSA se observó un incremento de *SERCA3*, además de un aumento de actividad HAT y marcas de

histonas permisivas H3K27ac y H3K9ac en dos partes del promotor de *ATP2A3*. A pesar del estímulo con HDACi, la expresión de *SERCA2b* no presentó cambios (Hernández et al., 2019).

De manera general, se ha observado el incremento de la expresión de *SERCA3* por regulación de H3K9ac y H3K27ac al tratar líneas celulares de cáncer de mama, gástrico e hígado con HDACi como NaB (butirato de sodio) y TSA (Hernández et al., 2020).

II.5.2. Regulación epigenética de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en cáncer de mama

La regulación de *ATP2A2* y *ATP2A3* mediante mecanismos epigenéticos se ha estudiado experimentalmente en cáncer de mama, principalmente través de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7, representativas de los subtipos Triple Negativo y Luminal A.

Se ha reportado un aumento en la expresión de *SERCA3* a nivel RNAm al tratar líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 con TSA o NaB en una manera dosis dependiente, sin haber cambios en *SERCA2*. Al evaluar la abundancia de marcas de histonas para activación transcripcional H3K27ac y H3K9ac en el promotor de *ATP2A3*, se encontró abundancia de ambas en MCF-7. Sin embargo, no se observaron cambios en el enriquecimiento de estas marcas al ser tratadas con TSA o NaB, mientras que para MDA-MB-231 se observó enriquecimiento de H3K27ac y H3K9ac. Esto nos sugiere que la inducción de la activación transcripcional de *ATP2A3* tiene un carácter epigenético, a través de mecanismos de remodelado de la cromatina, pasando de un estado de heterocromatina a eucromatina (Contreras et al., 2015; Izquierdo et al., 2019).

Al analizarse el promotor proximal de *ATP2A3*, se revelo que este no se encuentra metilado en ninguna de las líneas celulares mencionadas. De igual forma no se observaron cambios en la expresión de *SERCA2* y *3* al tratarlas con 5-aza-2-dC (inhibidor de DNMT). Se sugiere que el estado de metilación de DNA no tiene papel en la regulación de *SERCA2* y *SERCA3* para MCF-7 y MDA-MB-231. Esto ya se ha observado en otros tipos de carcinomas, como son de cuello, cabeza, pulmones y sistema nervioso central, en comparación de tejido no canceroso; por lo que no se ha encontrado una correlación entre la baja expresión de *ATP2A3* y el estado de metilación de su promotor (Contreras et al., 2015).

No obstante, la regulación epigenética de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* en cáncer de mama se ha estudiado experimental y principalmente en células de subtipo triple negativo y

luminal A. Considerando que la expresión de la bomba SERCA3 varía notablemente a través de los diferentes subtipos moleculares, se propone realizar un análisis que abarque estas diferencias en su expresión y la regulación epigenética que podría ser responsable de las mismas.

Por lo tanto, se propone que es importante realizar un análisis *in silico* de la expresión, la correlación expresión-supervivencia en pacientes, y la regulación epigenética por metilación y modificaciones post-traduccionales de histonas en líneas celulares y tumores de los subtipos moleculares luminal A, B, Her2 y triple negativo; esto a través de diferentes herramientas bioinformáticas y bases de datos. Con el fin de entender de manera más integral la expresión y regulación de las bombas SERCA, sobre todo SERCA3, en cáncer de mama.

III. JUSTIFICACIÓN

En México, el cáncer de mama es uno de los padecimientos más comunes en mujeres, así como uno de los problemas de salud pública más importantes de Latinoamérica. Con la detección de más de 29 mil casos anuales y con más de 7 mil decesos al año, se localiza como la primera causa de muerte entre las mexicanas y de las principales a nivel mundial (Globocan, 2020)

Hoy en día la investigación oncológica gira entorno a estudiar nuevos tratamientos más específicos y dirigidos, así como combinaciones de tratamientos ya existentes. A su vez, es importante encontrar marcadores moleculares que nos faciliten un pronóstico más temprano, que funcionen como blancos terapéuticos y con ello mejorar tanto fármacos como tratamientos.

Sin embargo, nos encontramos frente a una enfermedad con características moleculares muy variables entre sí, resultando en varios subtipos de cáncer de mama, cada uno con distintas posibilidades ante diferentes tratamientos de carácter hormonal y quimioterapéutico. Estos subtipos son luminal A, B, Her2 positivo y triple negativo, y es por ello por lo que hoy en día se trabajan distintas líneas celulares de cáncer de mama, representativas de cada uno de estos subtipos moleculares, permitiéndonos entender este carcinoma de manera más integral.

En este trabajo buscamos realizar un análisis *in silico* que nos ofrezca un panorama más amplio acerca de los cambios en la expresión de las bombas SERCA y su regulación epigenética a lo largo de los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama. Esto ya que la expresión de las bombas SERCA, particularmente SERCA3, varía en los subtipos de este cáncer, siendo abundante en algunos y ausente en otros. Sobre todo, en subtipos más agresivos y poco diferenciados, donde la expresión de SERCA3 es casi ausente, se busca una posible correlación entre su expresión y la supervivencia/pronóstico de pacientes.

Siendo las bombas SERCA, proteínas importantes en la regulación de calcio y los procesos celulares relacionados al mismo, es relevante conocer los cambios en su expresión en muestras de tumores y líneas celulares de cáncer de mama, así como las alteraciones a nivel epigenético responsables de estos cambios. Esto nos permitirá entender mejor esta enfermedad tan compleja y heterogénea, sus diferencias con base en sus subtipos moleculares y las proteínas involucradas en los procesos que guían su desarrollo, como posibles candidatas de marcadores carcinogénicos.

IV. HIPÓTESIS CIENTÍFICA

La expresión de los genes de las bombas SERCA varía en los distintos subtipos moleculares de cáncer de mama, asociándose a la supervivencia de pacientes y donde su expresión estará relacionada con la metilación y abundancia de marcas de histonas en su promotor.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo General

Analizar *in silico* la expresión y la regulación epigenética de los genes de las bombas de calcio *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares y muestras de tumores de cáncer de mama.

V.2. Objetivos Específicos

1. Analizar la expresión de los RNAm de los genes de las bombas de calcio *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares y muestras de tumores de pacientes de cáncer de mama.
2. Analizar el nivel de metilación del promotor de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares y muestras de tumores de pacientes de cáncer de mama.
3. Analizar la abundancia de marcas de histonas en la región promotora proximal de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer de mama.
4. Analizar la correlación entre la expresión de los RNAm de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* y el tipo de pronóstico y supervivencia de pacientes de cáncer de mama mediante.

VI. METODOLOGÍA

VI.1. Análisis de la expresión de los genes de las bombas SERCA en cáncer de mama

El análisis *in silico* de la expresión de los genes de las bombas de calcio *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en muestras de tejidos, tumores y líneas celulares de cáncer de mama, se realizó a través de diferentes plataformas como son: Expression Atlas (Papatheodorou et al., 2020) y University of California Santa Cruz (UCSC) Xena Browser (Goldman et al., 2020); así mismo se realizó la búsqueda de distintos conjuntos de datos (datasets) en la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO; Edgar et al., 2012); y se realizó su análisis con las plataformas Phantasus (Zenkova et al., 2018), Galaxy (Afgan et al., 2018) y el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, 2007).

VI.1.1. Análisis de la expresión de los RNAm de las bombas SERCA en tumores de cáncer de mama

Para analizar la expresión *in silico* de los genes de las bombas SERCA en 24 diferentes tejidos, se utilizó la plataforma de Expression Atlas, con base en datos de RNA-Seq extraídos de Genotype-Tissue Expression (25954001; GTEx Consortium, 2015). Para el análisis de expresión en muestras de tumores, se utilizaron datos extraídos de UCSC Xena Browser, a partir de las bases de datos de The Cancer Genome Atlas para cáncer de mama (TCGA BRCA) para comparar 114 muestras de tejido normal y 1097 muestras de tejido tumoral primario, además del análisis de 534 muestras tumorales divididas por subtipo molecular (231 de luminal A, 147 de luminal B, 58 de Her2 y 98 de triple negativo); los datos fueron graficados y analizados estadísticamente mediante GraphPad Prism 5.

Finalmente, se utilizó el dataset GSE65194 (Maubant et al., 2015) extraído de GEO, el cual incluye datos de expresión génica obtenidos por microarreglos de RNA de 11 muestras de tejido normal y 130 muestras de tumores distribuidas por subtipo molecular (29 de luminal A, 30 de luminal B, 30 Her2 y 41 triple negativo). Este fue analizado en Phantasus realizando los siguientes ajustes: los datos se transformaron a log₂ y normalizaron por cuantiles, las sondas se colapsaron por sonda mediana máxima por ID del Gen y se realizó un análisis de expresión diferencial por Limma. Se incluyeron los genes de las bombas SERCA3, SERCA2 y SERCA1,

además de ESR1 (receptor de estrógenos alfa), PGR (receptor de progesterona) y ERBB2 (Her2) como marcadores de los distintos subtipos moleculares.

VI.1.2. Análisis de la expresión de los RNAm de las bombas SERCA en líneas celulares de cáncer de mama

Para el análisis de expresión *in silico* de las bombas SERCA en 22 distintas líneas celulares de cáncer de mama, se utilizó primeramente la plataforma de Expression Atlas, con base en datos de RNA-Seq extraídos de Cancel Cell Line Encyclopedia (22460905; Barretina et al., 2012).

Además, se utilizaron los datasets GSE41313 (Riaz et al., 2013) y GSE59732 (Horton et al., 2015) extraídos de GEO, los cuales incluyen datos de expresión génica obtenidos por microarreglos de RNA de 49 y 16 líneas celulares de cáncer de mama, respectivamente, por triplicado y distribuidos por subtipo molecular. El dataset GSE41313 incluye 13 muestras luminal A, 6 luminal B, 10 Her2, 20 triple negativo; mientras que el dataset GSE59732 incluye 4 muestras luminal A, 1 luminal B, 3 Her2, 6 triple negativo, además de 2 líneas celulares no tumorigénicas. Estos datos fueron analizados en Phantasus realizando los ajustes mencionados anteriormente. Se incluyeron los genes de las bombas SERCA1, SERCA2 y SERCA3, además de ESR1 (receptor de estrógenos alfa), PGR (receptor de progesterona) y ERBB2 (Her2) como marcadores de los distintos subtipos moleculares.

Finalmente se utilizó la plataforma Galaxy para procesar datos de RNA-Seq del dataset GSE96860 (Franco et al., 2018), para realizar un análisis de expresión diferencial entre 12 líneas celulares de los distintos subtipos moleculares. Esto se realizó por cuatriplicado en las líneas celulares luminales A: MCF-7 y ZR-75-1, luminales B: MDA-MB-361 y UACC812, Her2: SKBR-3 y HCC1954, triple negativo: MDA-MB-468, HCC1937, MDA-MB-231 y MDA-MB-436 (estas últimas se dividieron en líneas celulares triples negativas bajas en claudinas y basales). Además, se incluyen las líneas celulares no tumorigénicas MCF-10A y 76NF2V.

El procesamiento de los datos se hizo a través de distintas paqueterías del programa Galaxy: 1) obtención de los datos (FastQ; Leinonen y Sugawara, 2010), 2) Análisis de calidad (FastQC; Andrews, 2010), 3) Visualización de análisis de calidad (MultiQC; Ewels et al., 2016), 4) Trimming (Trim Galore!; Krueger, 2021), 5) Alineamiento de los reads (HISAT2; Kim et al., 2015), 6) Conteo de los reads (featureCounts; Liao et al., 2013), 7) Análisis de expresión diferencial (DESeq2; Love et al., 2014), 8) Filtrado de los datos (Filter; Barnett et al., 2011), 9)

Anotación de los datos (Annotate DESeq2/DEXSeq output tables) y creación de heatmaps (heatmap2). Se analizaron los genes *ATP2A1*, *ATP2A2*, *ATP2A3*, *PGR*, *ERBB2* y *ESR1*, estos tres últimos como marcadores de expresión de los receptores moleculares. Sin embargo, solo los genes estadísticamente significativos fueron los que se incluyeron en los heatmaps resultantes ($p < 0.05$). El análisis de expresión diferencial se realizó con base en la expresión de las líneas celulares normales (MCF-10A y 76NF2V) contra las líneas celulares de los demás subtipos moleculares (Luminal A, luminal B, Her2 y triple negativo). Los datos se expresan transformados a Log10 (valor +1); valores >0 se encuentran sobreexpresados, <0 disminuidos y $=0$ sin cambios.

VI.2. Análisis de la metilación de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*

Se analizaron los niveles de metilación *in silico* de los genes de las bombas de calcio *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en muestras de tumores y líneas celulares de cáncer de mama a través de la plataforma UCSC Xena Browser; así mismo se realizó la búsqueda de distintos datasets en bases de datos como GEO y su análisis se hizo mediante la herramienta GEO2R de GEO NCBI (Edgar et al., 2012) y el software GraphPad Prism 5.

VI.2.1. Análisis de la metilación de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en tumores de cáncer de mama

Para el análisis *in silico* del nivel de metilación del promotor de los genes de las bombas SERCA en muestras de tumores, se utilizaron datos extraídos de UCSC Xena Browser, a partir de las bases de datos de TCGA BRCA para comparar 98 muestras de tejido normal y 785 de tumoral primario; estos fueron graficados y analizados estadísticamente mediante GraphPad Prism 5.

Además, se utilizaron los datasets GSE20712 y GSE22249 (Dedeurwaerder et al., 2011) extraídos de GEO, los cuales incluye datos de metilación de 12 muestras de tejido sano y 236 muestras de tumores de pacientes de cáncer de mama distribuidas por subtipo molecular (52 de luminal A, 62 de luminal B, 56 de Her2 y 66 de triple negativo). Este fue analizado mediante GEO2R de GEO NCBI, utilizando sondas de la región del promotor TS1500 (ubicada de -1500 a -200 pb del TSS) para cada gen: cg01914242 para *ATP2A3*, cg04235146 para *ATP2A2* y cg11094938 para *ATP2A1*; estos fueron graficados y analizados estadísticamente mediante GraphPad Prism 5.

VI.2.2. Análisis de la metilación de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer de mama

Se utilizó el dataset GSE26990 (Sproul et al., 2011) extraído de GEO, el cual incluye datos de metilación de 20 líneas celulares de cáncer de mama distribuidas por subtipo molecular (2 líneas celulares no tumorigénicas/normales, 3 luminales A, 2 luminales B, 4 Her2 y 9 triple negativo). Este fue analizado mediante GEO2R de GEO NCBI, utilizando sondas de la región del promotor TS1500 (ubicada de -1500 a -200 pb del TSS) para cada gen: cg194242 para *ATP2A3*, cg04235146 para *ATP2A2* y cg11094938 para *ATP2A1*; estos fueron graficados y analizados estadísticamente mediante GraphPad Prism 5.

VI.3. Análisis de la abundancia de marcas de histonas en la región promotora de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer de mama

Se utilizó la plataforma Galaxy para procesar datos de ChIPseq (Chromatin Immunoprecipitation Sequencing) del dataset GSE85158 (Franco et al., 2018), para realizar un análisis *in silico* de abundancia de las diferentes marcas de eucromatina H3K4me3, H3K9ac y H3K27ac, así como la marca de heterocromatina H3K27me3. Esto se realizó en 12 líneas celulares de los distintos subtipos moleculares, luminales A: MCF-7 y ZR-75-1, luminales B: MDA-MB-361 y UACC812, Her2: SKBR-3 y HCC1954 y triple negativo: MDA-MB-468, HCC1937, MDA-MB-231 y MDA-MB-436. Además, se incluyen las líneas celulares no tumorigénicas MCF-10A y 76NF2V.

El procesamiento de los datos se hizo a través de distintas paqueterías del programa Galaxy: 1) obtención de los datos (FastQ), 2) Análisis de calidad (FastQC), 3) Visualización de análisis de calidad (MultiQC), 4) Trimming (Trim Galore!), 5) Alineamiento de los reads (Bowtie2; Langmead y Salzberg, 2012), 6) Filtro de datos (Filter Sam or Bam, output SAM or BAM; Li et al., 2009), 7) Generación de archivos bigWig (bamCoverage; Ramírez et al., 2016). Los datos bigWig se ingresaron en WashU Epigenome Browser (Li et al., 2019), utilizando la versión HRCh/hg38 de *Homo sapiens* como genoma de referencia, para visualizar la presencia y abundancia de marcas de histonas en la región promotora proximal de los genes *ATP2A3*, *ATP2A2* y *ATP2A1* en las distintas líneas celulares de cáncer de mama mencionadas. Se incluyen los genes GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y MYOD1 (Proteína 1

de diferenciación miogénica) como controles positivo y negativo de cada marca de histona. La zona de visualización abarca -2kb a +2kb del sitio de inicio de la transcripción (+1), además del promotor, isla CpG, primer exón/intrón y orientación del gen. El eje de las Y fue ajustado a la señal máxima de cada región del gen para cada conjunto de datasets.

VI.4. Análisis de la correlación entre la expresión de SERCA1, SERCA2 y SERCA3 con el pronóstico y supervivencia de pacientes con cáncer de mama

Se analizó *in silico* la supervivencia y pronóstico de pacientes de cáncer de mama correlacionado a la expresión de los RNAm de SERCA3, SERCA2 y SERCA1 mediante el estimador Kaplan-Meier Plotter (Györfy, 2021). Se dividieron 4504 muestras de pacientes mediante selección automática (auto select best cut-off) y se excluyeron outliers como control de calidad; se agruparon los análisis con base en subtipo molecular (2057 de luminal A, 1374 de luminal B, 293 de Her2 y 780 triple negativo). Se tomó como significativa una $P < 0.05$ y un factor de riesgo HR (Hazard Ratio) de $HR < 1$ como factor de protección.

VI.9. Análisis estadístico

Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) de una vía en conjunto con ensayos Dunnett de comparación múltiple para determinar diferencias significativas entre grupos; para ello se tomó una p con valor menor a 0.05 ($p < 0.05$) para establecer la significancia entre las condiciones experimentales contra su respectivo control. De igual forma se realizaron pruebas t no pareadas con corrección de Welch, con valor de p de dos colas; para ello se tomó una p con valor menor a 0.05 ($p < 0.05$) para establecer la significancia de la diferencia entre dos medias y varianzas con diferente desviación estándar. Estos análisis estadísticos se realizaron en GraphPad Prism 5.

VII. RESULTADOS

VII.1. Análisis de la expresión de los genes de las bombas SERCA en cáncer de mama

VII.1.1. Análisis de la expresión de los RNAm de las bombas SERCA en tumores de cáncer de mama

Se analizó la expresión de las bombas SERCA con base en datos de RNA-Seq extraídos de GTEx Consortium en 24 diferentes tejidos humanos (Figura 8). Como se observa, la expresión de SERCA2 es constitutiva a todos los tejidos, mientras que SERCA1 es específica a tejido de músculo esquelético, así como de la glándula salival, próstata y testículos. SERCA3 tiene amplia expresión en la mayoría de los tejidos, con excepción de la corteza cerebral, amígdalas, ventrículo izquierdo del corazón, hígado y músculo esquelético. Esta proteína se expresa abundantemente en varios tejidos de tipo endotelial (aorta), conectivo (sangre) y epitelial (glándulas salivales, colon, vejiga, útero, etc.), en donde encontramos al tejido mamario.

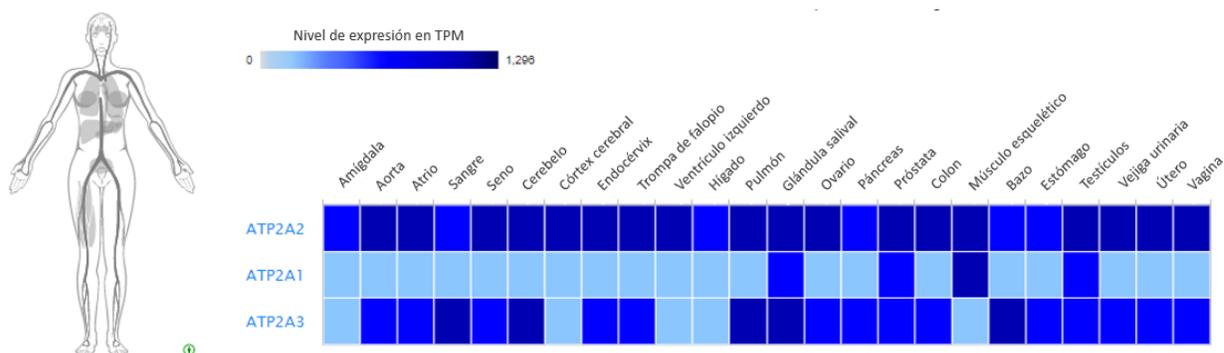


Figura 8. Expresión del RNAm de las bombas SERCA en tejidos. Expresión de *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* por datos de RNA-Seq en 24 diferentes tejidos humanos. Grafica generada en plataforma Expression Atlas.

Para la expresión génica de las bombas SERCA en muestras de tumores de cáncer de mama, se realizaron diferentes análisis. Primeramente, en la figura 9 se observan las diferencias de expresión por datos de RNA-seq, obtenidos de TCGA BRCA de las bombas SERCA en 114 muestras de tejido normal y 1097 de tejido tumoral de cáncer de mama para las tres isoformas. Para SERCA3 se observa una diferencia significativa de expresión génica en tumores a diferencia de tejido normal. En SERCA2 no se observan diferencias significativas, mientras que para SERCA1 se observa aumento significativo en tumores. SERCA1 presenta los niveles más

bajos de expresión a comparación de las demás bombas de calcio, seguida de SERCA3 y SERCA2.

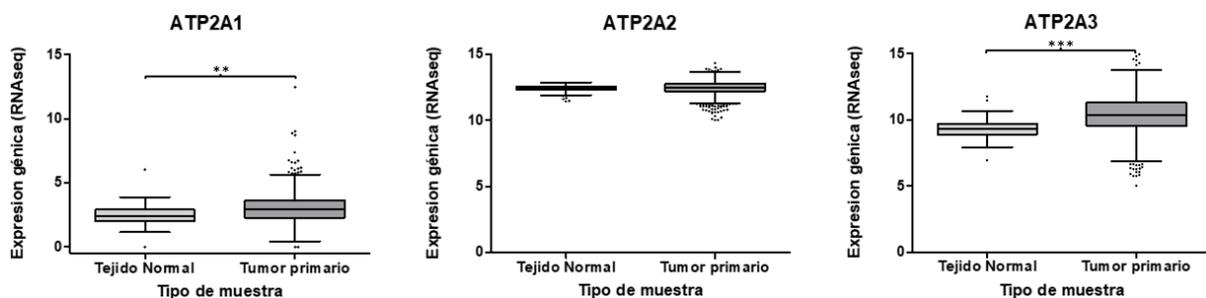


Figura 9. Expresión del RNAm de las bombas SERCA en muestras de tejido normal y tumoral primario de cáncer de mama. Análisis de expresión génica de *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* por datos de RNA-seq en muestras de tejido normal (114) y tumoral (1097). * $P < 0.05$ por análisis de prueba t no pareada con corrección de Welch.

Posteriormente se analizó la expresión de SERCA por datos de RNA-seq de TCGA BRCA en 114 muestras de tejido normal y 1097 muestras de tumores, además de 534 muestras tumorales divididas en los subtipos moleculares luminal A (231), luminal B (147), Her2 (58) y triple negativo (98). En la figura 10 observamos para SERCA1 un aumento significativo en muestras lumbales B y triple negativo, mientras que en SERCA2 hay un aumento en lumbales B, Her2 y triple negativo. Por su parte, en SERCA3 se observa un aumento significativo en lumbales A, B y Her2. De manera general observamos que SERCA1 tiene el menor nivel de expresión en muestras tanto de tejido normal como de tejido tumoral para los distritos subtipos, seguida de SERCA3 y SERCA2 con la mayor expresión.

Se analizó la expresión de las bombas SERCA por datos de microarreglos de RNA (obtenidos del dataset GSE65194) en 11 muestras de tejido normal y 130 muestras de tumores distribuidas por subtipo molecular (29 de luminal A, 30 de luminal B, 30 Her2 y 41 triple negativo). En la figura 11 observamos mayor expresión de SERCA3 en el subtipo luminal B, seguido de Her2 y luminal A, mientras que disminuye para el subtipo triple negativo; en tejido sano se observan variaciones en su expresión. La expresión de SERCA2 se mantiene alta en todos los subtipos, con leve aumento en tejido sano, mientras que la expresión de SERCA1 se encuentra ausente a lo largo de las muestras de los diferentes subtipos, al igual que en tejido sano.

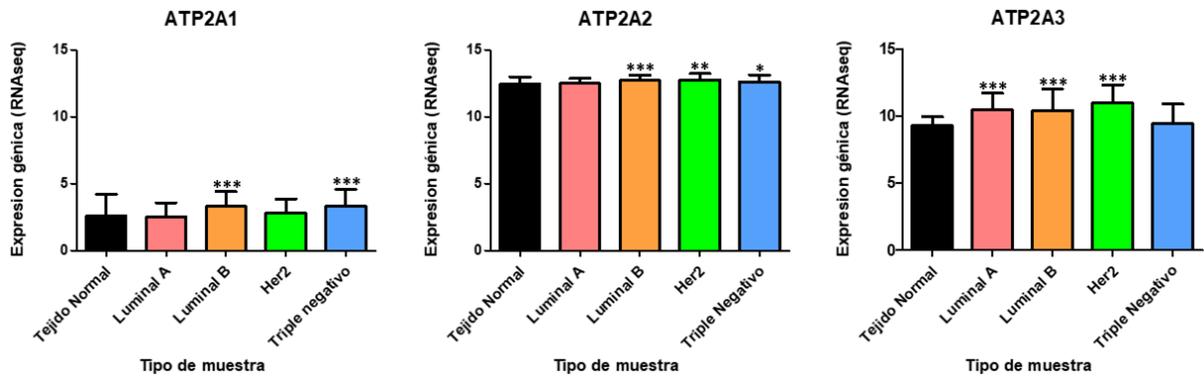


Figura 10. Expresión del RNAm de las bombas SERCA en muestras de tejido normal y tumoral de distintos subtipos de cáncer de mama. Análisis de expresión génica de *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* por datos de RNA-seq en 11 muestras de tejido normal y 534 muestras de tejido tumoral de los subtipos luminal A (231), luminal B (147), Her2 (58) y Triple Negativo (98). * $P < 0.05$ por análisis ANOVA de una vía y comparación múltiple de Dunnett's.

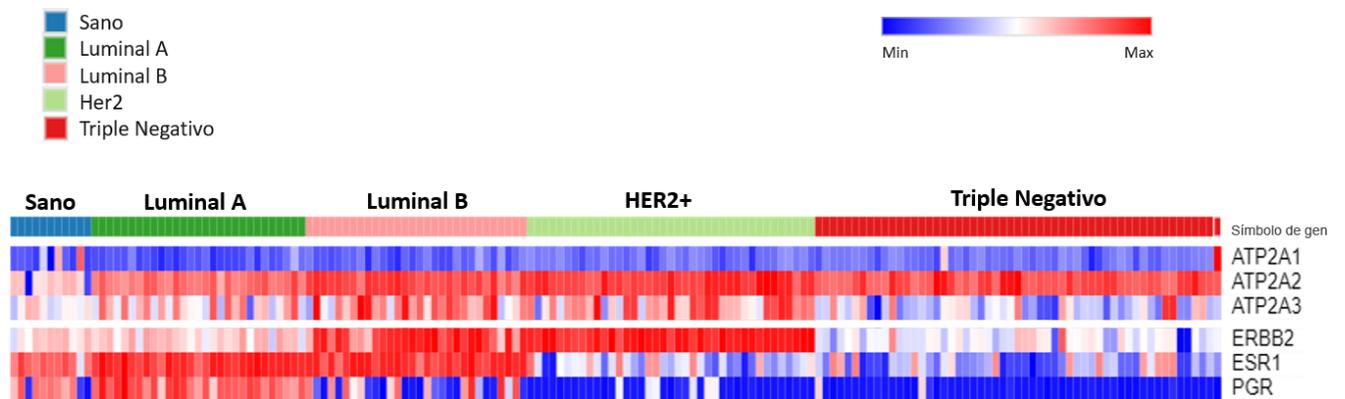


Figura 11. Expresión del RNAm de las bombas SERCA en muestras de tumores por subtipos de cáncer de mama. Análisis de expresión génica de *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* por microarreglos de RNA de 11 muestras de tejido sano y 130 muestras de tumores divididas en los subtipos moleculares luminal A (29), luminal B (30), Her2 (30) y triple negativo (41) de cáncer de mama. Se incluyen los genes ERBB2, ESR1 y PGR como marcadores de expresión de receptores para los subtipos moleculares. Gráfica generada en la plataforma Phantasus.

VII.1.2. Análisis de la expresión de los RNAm de las bombas SERCA en líneas celulares de cáncer de mama

Se realizaron diferentes análisis para evaluar la expresión de las bombas SERCA en líneas celulares de los distintos subtipos moleculares de cáncer de mama. En primer lugar, se

analizaron de manera general las tres isoformas con base en datos de RNA-Seq extraídos de Cancer Cell Line Encyclopedia en 22 líneas celulares (Figura 12). Como se ha visto anteriormente, la expresión de SERCA1 se mantiene baja o ausente a lo largo de la mayoría de las líneas celulares, así como SERCA2 se mantiene constante y abundantemente expresada. Por otro lado, la expresión de SERCA3 varía notablemente según la línea celular: ausente en líneas como MDA-MB-231, HCC1954 y BT-549, baja en MDA-MB-468, HCC1569, ZR-75-30 y HCC1806 y abundante en líneas como AU565, MDA-MB-361, SKBR-3, BT-474, MCF-7 y UACC812, entre otras.

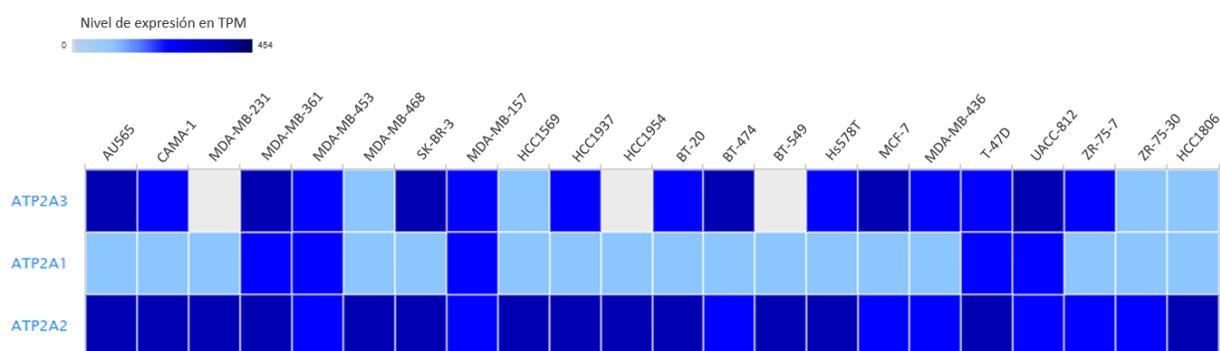


Figura 12. Expresión del RNAm de las bombas SERCA en líneas celulares de cáncer de mama. Expresión de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* por datos de RNA-Seq en 22 líneas celulares de cáncer de mama. Gráfica generada en plataforma Expression Atlas.

Se analizó la expresión de las bombas SERCA por microarreglos de RNAm en líneas celulares de cáncer de mama mediante dos acercamientos (Figura 13). En el panel A se utilizaron datos (obtenidos del dataset GSE41313) de 49 líneas celulares de los distintos subtipos moleculares luminal A (13), luminal B (6), Her2 (10) y triple negativo (20). Como observamos, la expresión de SERCA3 es abundante en luminales A y B, seguida de Her2 y nula para triple negativo. La expresión de SERCA2 presenta variaciones, aunque se mantiene abundante en la mayoría de las líneas celulares, con excepción de las líneas triple negativo; mientras que la expresión de SERCA1 es baja o nula a lo largo de las diferentes líneas celulares.

En el panel B se engloban datos (obtenidos del dataset GSE59732) de 16 líneas celulares particulares de los distintos subtipos moleculares luminal A (4), luminal B (1), Her2 (3) y triple negativo (6), así como líneas celulares no tumorigénicas (2). El RNAm de SERCA3 se encuentra ausente en las líneas triple negativo, así como en las líneas celulares no tumorigénicas MCF-

10A y MCF-12A. Es abundante en luminales A, B y Her2, con excepción de algunas líneas como HCC1954, CAMA1 y T47D. La expresión del RNAm de SERCA1 es muy baja y el de SERCA2 es variable a lo largo de las líneas celulares; sin embargo, se mantiene abundante en la mayoría de ellas.

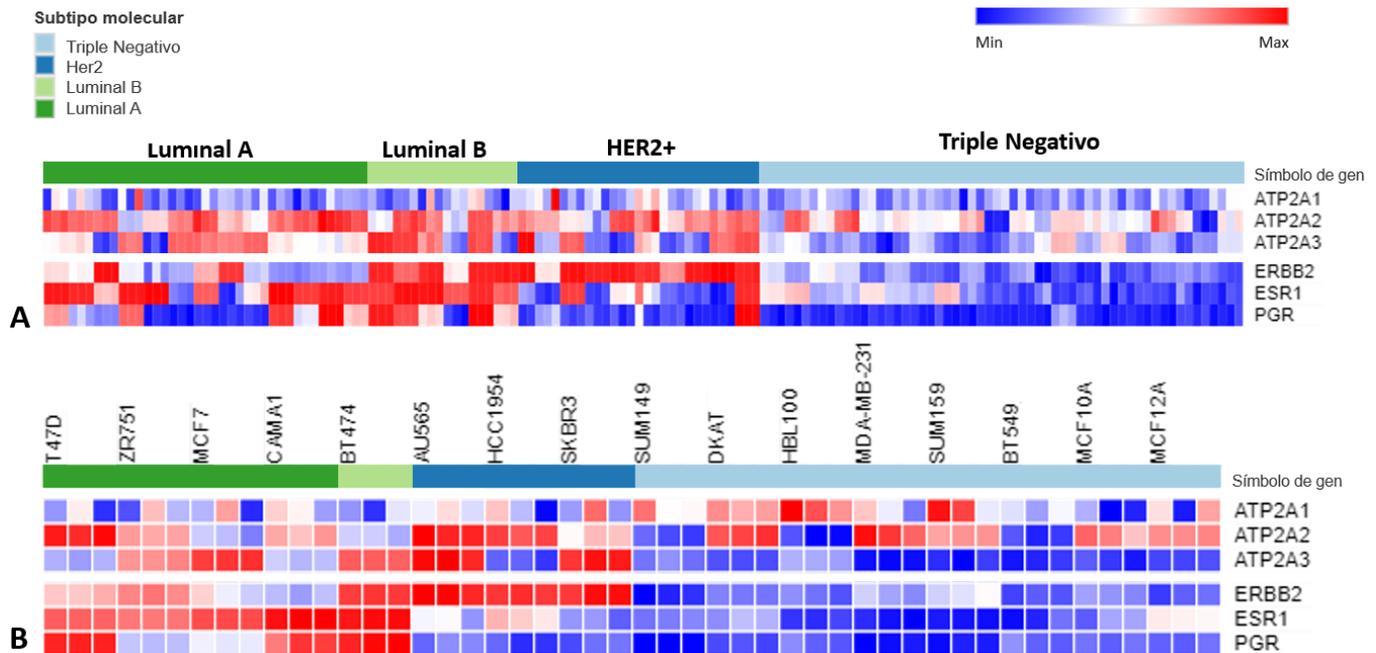


Figura 13. Expresión del RNAm de las bombas SERCA en líneas celulares por subtipos de cáncer de mama. Análisis de expresión de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* por microarreglos de RNA en líneas celulares de los subtipos luminal A, luminal B, Her2 y triple negativo de cáncer de mama. **A**, incluye 49 líneas celulares por triplicado. **B**, incluye 16 líneas celulares por triplicado, representativas de los subtipos moleculares, además de las líneas celulares no tumorigénicas MCF-10A y MCF-12A. Se incluyen los genes *ERBB2*, *ESR1* y *PGR* como marcadores de expresión de receptores para los subtipos moleculares. Gráfica generada en plataforma Phantasus.

Finalmente se realizó un análisis de expresión diferencial de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* mediante datos de RNA-Seq (obtenidos del dataset GSE96860) de 12 líneas celulares de los diferentes subtipos moleculares. En la figura 14 se presentan las distintas comparaciones entre líneas celulares normales (76NF2V y MCF-10A) contra líneas celulares del subtipo luminal A (MCF-7 y ZR-75-1), luminal B (MDA-MB-361 y UACC812), Her2 (SKBR-3 y HCC1954) y triple negativo (MDA-MB-468, HCC1937, MDA-MB-231 y MDA-MB-436). Estas últimas se dividieron en sus subcategorías basales y bajas en claudinas para una mejor

visualización. Al aplicarse un filtro de significancia en los resultados, se muestran únicamente los genes con diferencias significativas entre los grupos analizados ($p < 0.05$).

Al comparar líneas normales contra líneas de subtipo luminal A, vemos una mayor expresión de *SERCA3* en la línea ZR-75-1 a comparación de las líneas normales, mientras que MCF-7 se mantiene sin cambios. En cuando a nuestros marcadores, observamos aumento de *ESR1* en luminales A y de *ERBB2* para la línea ZR-75-1. En el subtipo luminal B, observamos aumento en la expresión de todos los receptores (*ESR1*, *ERBB2*, *PGR*) y de *SERCA3* en ambas líneas celulares MDA-MB-361 y UACC812, a comparación de las células normales donde vemos una baja expresión de los genes mencionados.

Al comparar contra líneas que sobreexpresan Her2, observamos aumento del marcador *ERBB2* para ambas líneas celulares SKBR3 y HCC1954; sin embargo, solo vemos aumento de *ATP2A3* en la línea SKBR3, mientras que en HCC1954 y en las líneas normales se mantienen niveles de expresión bajos.

Para finalizar, las líneas triples negativo presentan un aumento en la expresión de *ATP2A3* en MDA-MB-436 a comparación de las líneas normales, con menor valor en MDA-MB-468 y HCC1937. Para MDA-MB-231 no hubo datos de expresión del gen *ATP2A3*. En cuanto a nuestros marcadores, las líneas normales presentaron altos valores de *ERBB2* y las líneas triples negativo de *ESR1*. MDA-MB-231 tuvo igualmente valores variables para *ERBB2*. Cabe destacar que, entre los genes analizados, *ATP2A3* tuvo cambios significativos en su expresión para los cuatro subtipos moleculares.

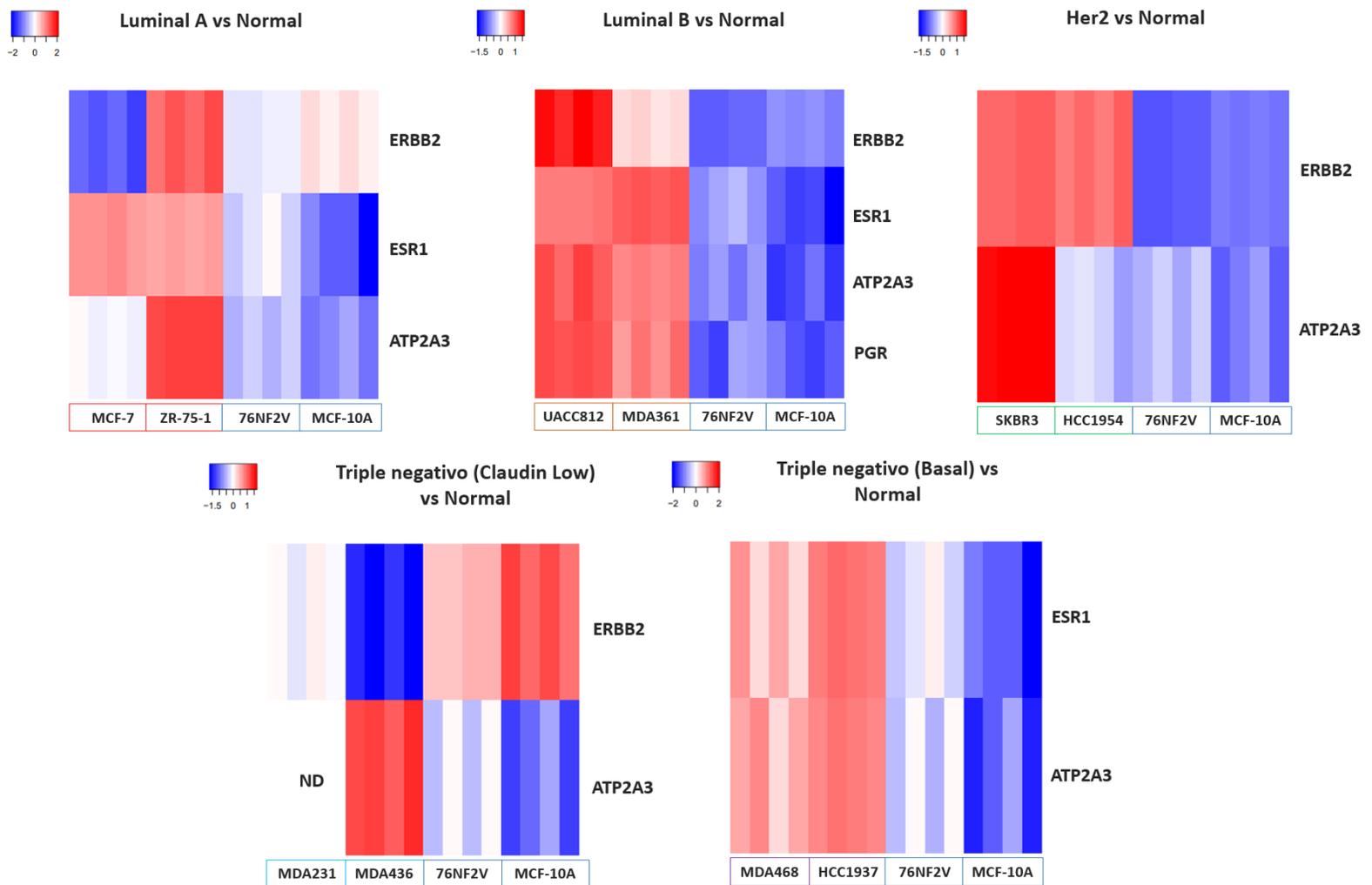


Figura 14. Expresión diferencial de los genes de las bombas SERCA en líneas celulares por subtipos de cáncer de mama. Análisis de Expresión de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* por datos de RNA-Seq de 12 líneas celulares de cáncer de mama. Se presentan los genes con diferencias significativas al comparar líneas celulares de subtipo normal vs luminal A, B, Her2 y triple negativo. Se incluyen los genes *ERBB2*, *ESR1* y *PGR* como marcadores de expresión de receptores para los subtipos moleculares. Los datos se presentan por cuadruplicado y transformados a Log10 (valor +1). Gráfica generada en la plataforma Galaxy.

VII.2. Análisis de la metilación de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*

VII.2.1. Análisis de la metilación de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en tumores de cáncer de mama

Se procedió a analizar la metilación del promotor de los genes de las bombas SERCA mediante datos de TCGA BRCA en 785 muestras de tumores de cáncer de mama y 98 muestras de tejido sano. Como se observa en la figura 15, no hay cambios significativos en la metilación del promotor de los genes *ATP2A3* y *ATP2A2*, mientras que para *ATP2A1* se observa un nivel mayor y significativo de metilación en tumores que en tejido normal. Es notorio que los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* presentan niveles bajos de metilación mientras que *ATP2A1* tiene los más altos niveles de metilación acercándose a valores de 1.

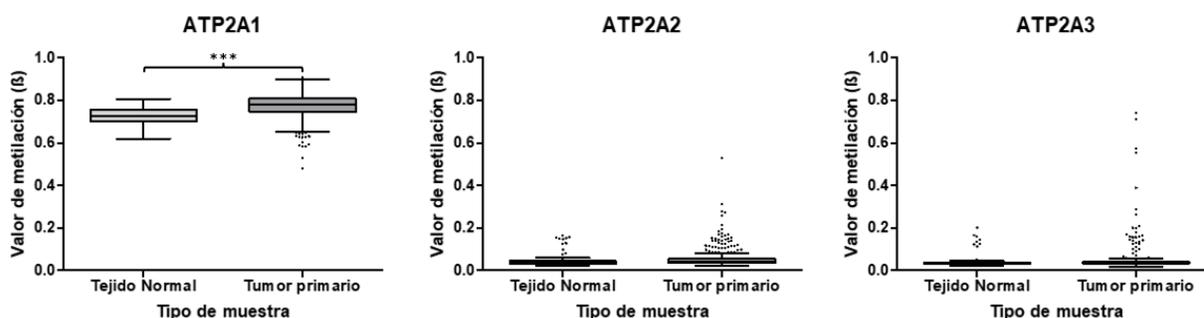


Figura 15. Metilación del promotor de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en muestras de tejido normal y tumoral de cáncer de mama. Valores beta de metilación de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en muestras de tejido normal (98) y tumoral primario (785). * $P < 0.05$ por análisis de prueba t no pareada con corrección de Welch.

Se analizó el nivel de metilación en la región reguladora proximal de -1500 a -200 pb (TS1500) de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2*, y *ATP2A3* en datos (obtenidos de datasets GSE20712 y GSE22249) de 12 muestras de tejido normal y 236 muestras tumorales de los diferentes subtipos moleculares (52 de luminal A, 62 de luminal B, 56 de Her2 y 66 de triple negativo). De acuerdo con la figura 16, solo se observan cambios significativos para *ATP2A1* con respecto a tejido normal para todos los subtipos excepto triple negativo. Los niveles de metilación en *ATP2A2* y *ATP2A3* no cambiaron en muestras tumorales por subtipos a comparación de tejido normal. Los niveles de metilación de *ATP2A1* son notablemente mayores en comparación de *ATP2A2* y *ATP2A3*.

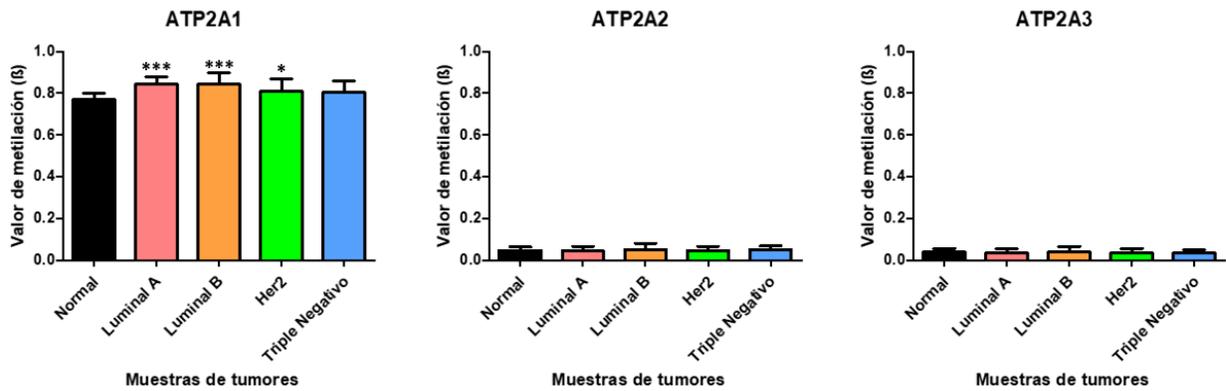


Figura 16. Metilación de la región reguladora proximal de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en muestras de tumores por subtipos de cáncer de mama. Valor beta de metilación de la región promotora de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en 12 muestras de tejido normal y 236 de tejido tumoral de los subtipos luminal A (52), luminal B (62), Her2 (56) y triple negativo (66). * $P < 0.05$ por análisis ANOVA de una vía y comparación múltiple de Dunnett's.

VII.2.2. Análisis de la metilación de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer de mama

Se analizó el nivel de metilación en la región reguladora proximal de -1500 a -200 pb de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2*, y *ATP2A3* en datos (obtenidos de dataset GSE26990) de 20 líneas celulares de cáncer de mama distribuidas por subtipo molecular (2 líneas celulares no tumorigénicas/normales, 3 luminales A, 2 luminales B, 4 Her2 y 9 triple negativo). En la figura 17 se observa que para *ATP2A3* hay una tendencia a mayor metilación en las líneas triple negativo, mientras que es menor para las líneas celulares normales (MCF-10A y HMEC), luminal A, B y Her2, a excepción de HCC1569. De igual forma, los niveles de metilación se mantienen bajos para *ATP2A2* en todos los subtipos moleculares y líneas celulares normales. Los valores de metilación beta para *ATP2A1* son notablemente mayores en comparación a *ATP2A2* y *ATP2A3* para todos los subtipos, con valores acercándose a 1.

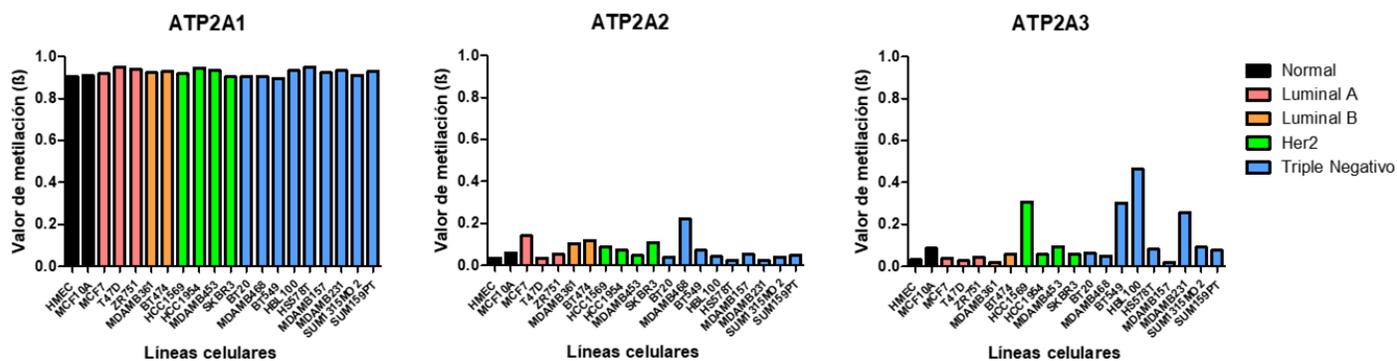


Figura 17. Metilación de la región reguladora proximal de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares por subtipos de cáncer de mama. Valor beta de metilación de la región promotora de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en 20 líneas celulares de los subtipos luminal A, luminal B, Her2 y triple negativo. Se incluyen las líneas celulares no tumorigénicas HMEC y MCF-10A.

VII.3. Análisis de la abundancia de marcas de histonas en la región promotora de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer de mama

Se procedió a analizar la presencia y abundancia de marcas de histonas permisivas (H3K4me3, H3K9ac y H3K27ac) y no permisivas (H3K27me3) en la región promotora proximal de los genes *ATP2A3*, *ATP2A2* y *ATP2A1*. Esto por medio de datos de 12 líneas celulares divididos por subtipos moleculares de cáncer de mama, incluyendo líneas celulares no tumorigénicas (obtenidos del dataset GSE85158).

Primeramente, se analizaron los genes *GAPDH* y *MYOD1* en estas líneas celulares, como regiones control positivo/negativo de marcas permisivas, y control negativo/positivo de marcas no permisivas. Como se observa en la figura 18, el gen constitutivo *GAPDH* tiene un enriquecimiento considerable de histonas de eucromatina H3K4me3, H3K9ac y H3K27ac en su promotor, así como ausencia de la marca de heterocromatina H3K27me3. Por el contrario, *MYOD1*, como un gen específico de tejido muscular, tiene ausencia de marcas permisivas y un aumento considerable de la marca H3K27me3. El enriquecimiento de estas marcas en las regiones control de estos genes nos comprueba que los experimentos ChIP-Seq utilizados para este análisis son adecuados.

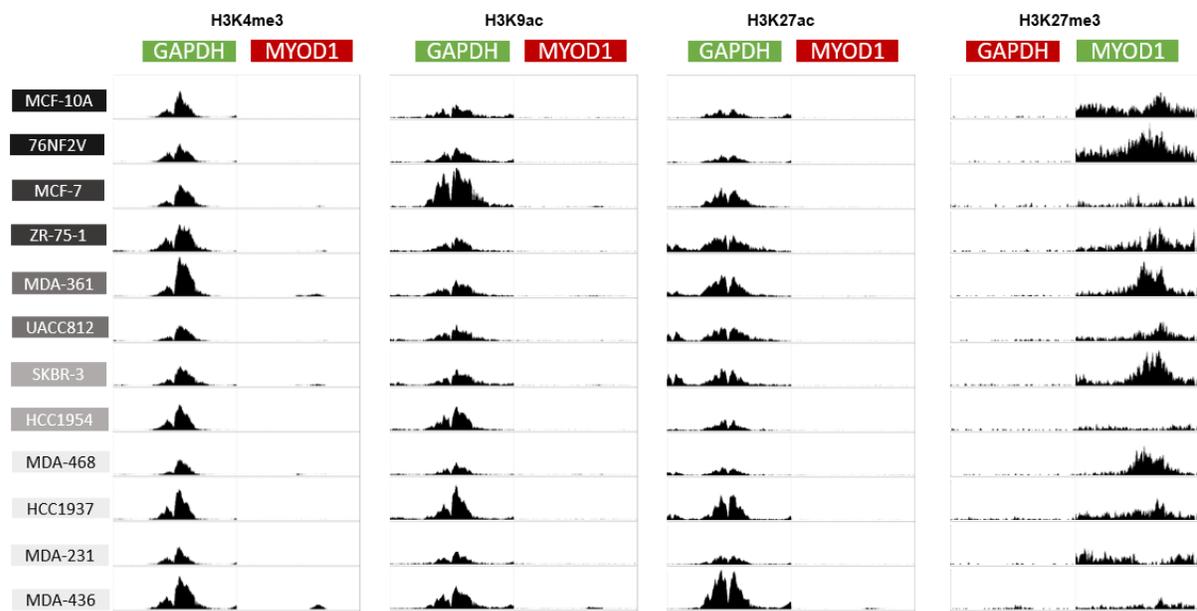


Figura 18. Controles de localización y abundancia de marcas de histonas en líneas celulares por subtipos de cáncer de mama. Controles de cada marca de histona de eucromatina (H3K4me3, H3K9ac y H3K27ac) en promotor de GAPDH (control positivo) y MYOD1 (control negativo), y marca de heterocromatina (H3K27me3) en promotor GAPDH (control negativo) y MYOD1 (control positivo) para 12 líneas celulares de los subtipos luminal A, luminal B, Her2 y triple negativo. Se incluyen líneas celulares no tumorigénicas MCF-10A y 76NF2V. El eje de las Y fue ajustado a la señal máxima de cada región del gen para cada conjunto de datasets. Gráfica generada en WashU.

Los genes *ATP2A2* y *ATP2A1* presentan patrones similares de localización y abundancia entre las diferentes marcas de histonas. Para todas las marcas observamos el promotor de *ATP2A2* con enriquecimiento abundante de las marcas H3K4me3, H3K9ac y H3K27ac. Mientras que para *ATP2A1* observamos ausencia de marcas permisivas en su promotor. Ambos patrones de enriquecimiento se repiten en todas las marcas, con excepción de H3K27me3.

En el caso de la marca de eucromatina H3K4me3 (figura 19), para el promotor de *ATP2A3*, observamos enriquecimiento en luminales B (MDA-MB-361 y UACC812), en las líneas triples negativo (MDA-MB-468, HCC1937, MDA-MB-231 y MDA-MB-436) y en la no tumorigénica 76NF2V. Las demás líneas presentan bajo enriquecimiento o ausencia de la marca, como la línea Her2, HCC1954.

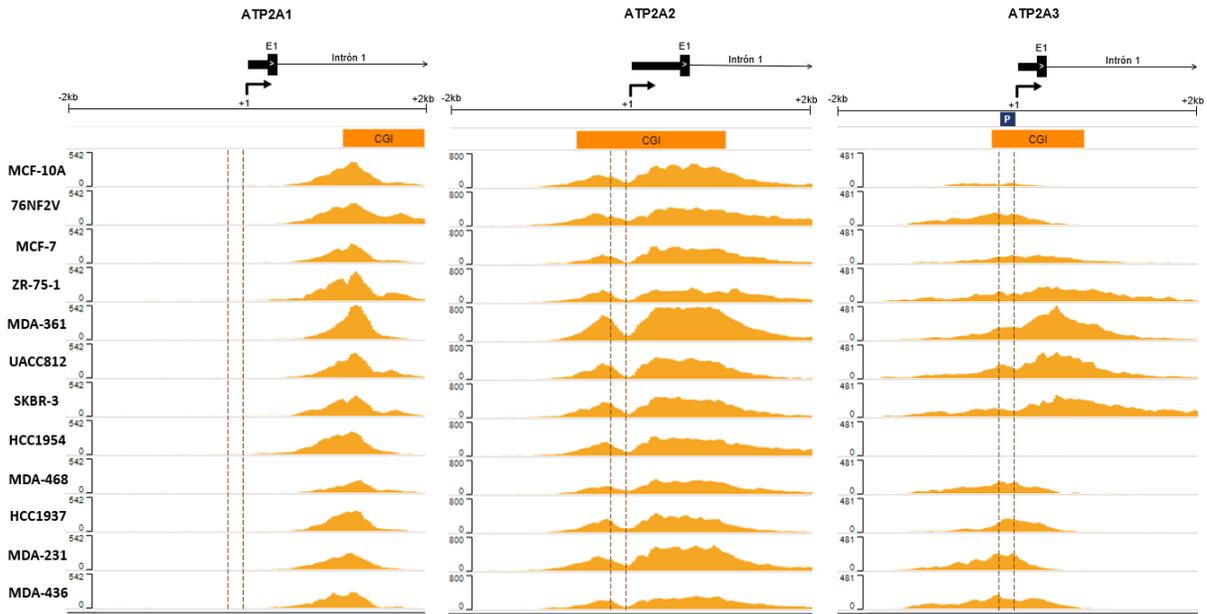


Figura 19. Distribución de la marca de eucromatina H3K4me3 en la región promotora proximal de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares por subtipos de cáncer de mama. Abundancia de la marca H3K4me3 en promotor de *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* para 12 líneas celulares de los subtipos luminal A, luminal B, Her2 y triple negativo. Se incluyen las líneas celulares no tumorigénicas MCF-10A y 76NF2V. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción (+1, TSS) y la orientación del gen. La zona de visualización abarca 4 kb (+2kb y -2kb del TSS), se indica zona del promotor proximal, isla CpG y primer exón/intrón. El eje de las Y fue ajustado a la señal máxima de cada región del gen para cada conjunto de datasets. Gráfica generada en WashU Epigenome Browser.

Para la marca permisiva H3K9ac (figura 20), observamos alto enriquecimiento en la línea celular UACC812 (luminales B), con menor abundancia en MDA-MB-436 y MDA-MB-231 (triples negativas) y 76NF2V (no tumorigénica). Las demás líneas presentan bajo enriquecimiento o ausencia de la marca, como la línea HCC1954 (Her2).

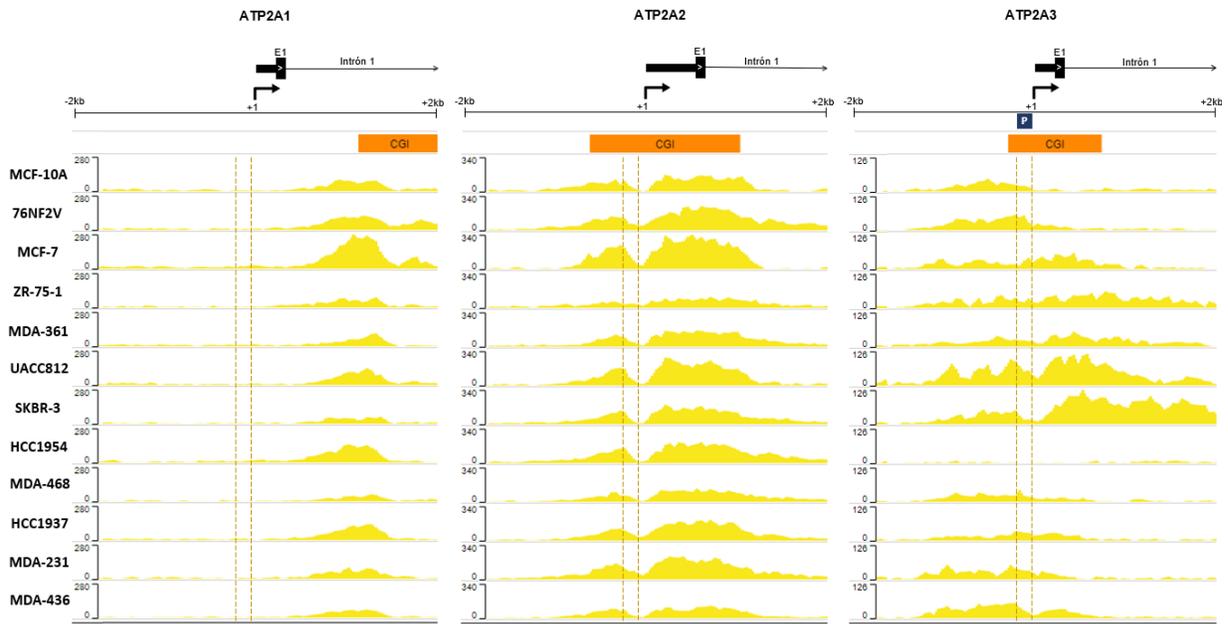


Figura 20. Distribución de la marca de eucromatina H3K9ac en la región promotora proximal de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares por subtipos de cáncer de mama. Abundancia de la marca H3K9ac en promotor de *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* para 12 líneas celulares de los subtipos luminal A, luminal B, Her2 y triple negativo. Se incluyen las líneas celulares no tumorigénicas MCF-10A y 76NF2V. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción (+1, TSS) y la orientación del gen. La zona de visualización abarca 4 kb (+2kb y -2kb del TSS), se indica zona del promotor proximal, isla CpG y primer exón/intrón. El eje de las Y fue ajustado a la señal máxima de cada región del gen para cada conjunto de datasets. Gráfica generada en WashU Epigenome Browser.

La marca de eucromatina H3K27ac fue abundante en las líneas luminales B (UACC812 y MDA-MB-361) y SKBR-3 (Her2), con menor abundancia en ZR-75-1 (luminal A) y MDA-MB-436 (triple negativo). Las líneas celulares restantes tuvieron niveles bajos o casi ausentes. Nuevamente, la línea HCC1954 (Her2); tuvo una ausencia total de esta marca (Figura 21).

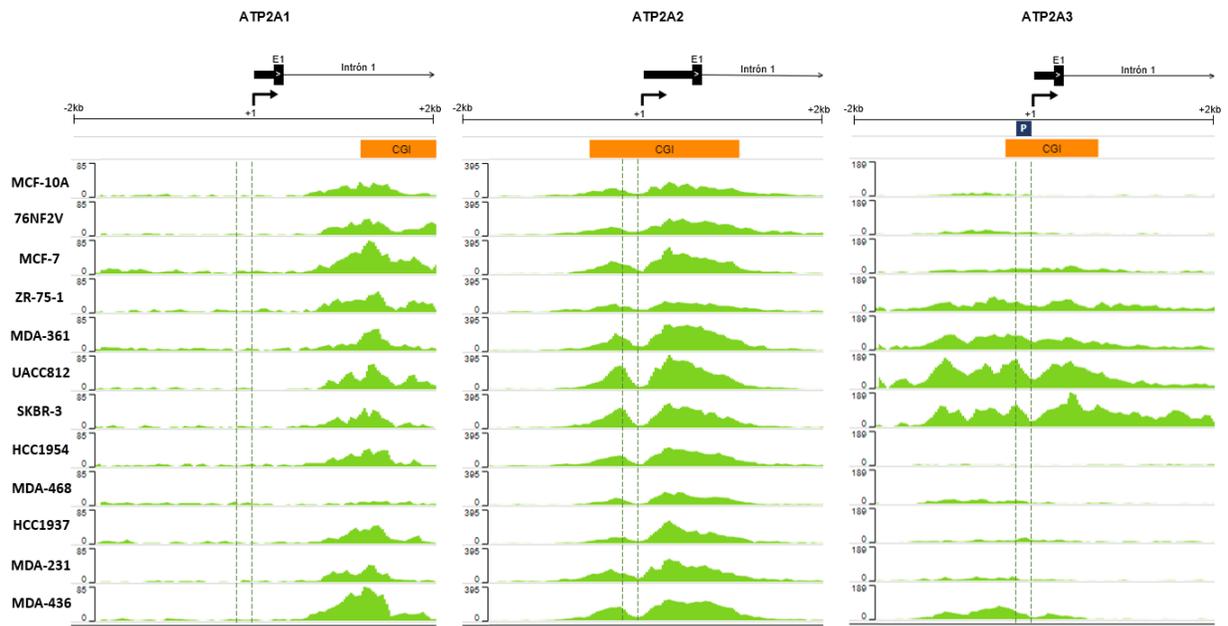


Figura 21. Distribución de la marca de eucromatina H3K27ac en la región promotora proximal de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares por subtipos de cáncer de mama. Abundancia de la marca H3K27ac en promotor de *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* para 12 líneas celulares de los subtipos luminal A, luminal B, Her2 y triple negativo. Se incluyen células no tumorigénicas MCF-10A y 76NF2V. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción (+1, TSS) y la orientación del gen. La zona de visualización abarca 4 kb (+2kb y -2kb del TSS), se indica zona del promotor proximal, isla CpG y primer exón/intrón. El eje de las Y fue ajustado a la señal máxima de cada región del gen para cada conjunto de datasets. Gráfica generada en WashU Epigenome Browser.

Finalmente, la marca de heterocromatina H3K27me3 fue abundante en las líneas MCF-7 (luminal A) y HCC1937 (triple negativo), con menor abundancia en MCF-10A y 76NF2V (no tumorigénicas) y con ausencia total en las líneas celulares restantes (Figura 22).

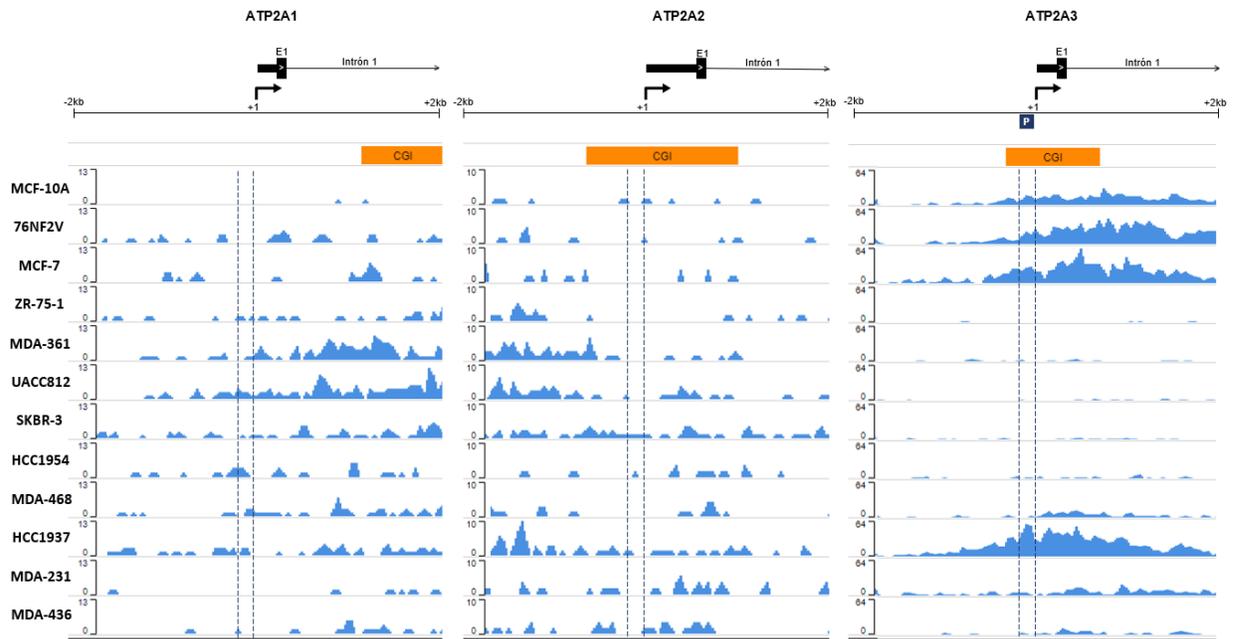


Figura 22. Distribución de la marca de heterocromatina H3K27me3 en la región promotora proximal de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares por subtipos de cáncer de mama. Abundancia de la marca H3K27me3 en promotor de *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* para 12 líneas celulares de los subtipos luminal A, luminal B, Her2 y triple negativo. Se incluyen las líneas celulares no tumorigénicas MCF-10A y 76NF2V. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción (+1, TSS) y la orientación del gen. La zona de visualización abarca 4 kb (+2kb y -2kb del TSS), se indica la zona del promotor proximal, isla CpG y primer exón/intrón. El eje de las Y fue ajustado a la señal máxima de cada región del gen para cada conjunto de datasets. Gráfica generada en WashU Epigenome Browser.

VII.4. Análisis de la correlación entre la expresión de *SERCA1*, *SERCA2* y *SERCA3* con el pronóstico y supervivencia de pacientes con cáncer de mama

Se analizó la correlación entre la expresión de las bombas *SERCA* con la supervivencia y el pronóstico de pacientes con cáncer de mama por subtipo molecular. Los datos de 4504 muestras de pacientes de cáncer de mama obtenidos en Kaplan Meier Plotter se dividieron en los cuatro subtipos principales luminal A (2057), luminal B (1374), Her2 (293) y triple negativo (780) en cohortes de mayor y menor expresión de *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*.

Como podemos observar en la figura 23, existe una asociación significativa entre la expresión de *ATP2A1* y la supervivencia de pacientes. Esto ocurre tanto en luminal A ($p= 5e-.08$), B ($p= 0.0026$) y triple negativo ($p= 0.00018$). En el subtipo Her2 no se obtuvo un valor pronóstico significativo ($p= 0.27$). En el luminal A se tiene una supervivencia de 228 meses en

la cohorte de mayor expresión y de 216 en la de menor expresión; en luminal B se tuvo una supervivencia de 162 meses en la cohorte de mayor expresión y 163 en la de menor expresión; finalmente, en triple negativo se obtuvo una supervivencia de 31 en mayor expresión y 17 en menor expresión de *ATP2A1*. Todos los subtipos, con excepción de Her2, tuvieron una HR menor a 1, por lo que la expresión de *SERCA1* se constituye como un factor de protección o supervivencia. En los subtipos luminales A y triple negativo, principalmente luminal A, la alta expresión de *ATP2A1* se asoció con una mayor supervivencia en los pacientes de cáncer de mama.

Como vemos en la figura 24, la expresión de *ATP2A2* tiene una asociación significativa con la supervivencia de pacientes de cáncer de mama. Esto ocurre en los subtipos luminal A ($p=0.002$) y triple negativo ($p=0.016$). En los subtipos luminal B y Her2 no se obtuvo un valor pronóstico significativo ($p=0.32$ y $p=0.16$ respectivamente). En luminal A se tiene una supervivencia de 216 meses en la cohorte de mayor expresión y de 228 en la de menor expresión; mientras que en triple negativo se obtuvo una supervivencia de 35 en mayor expresión y 19 en menor expresión de *ATP2A2*. Los subtipos luminales A y triple negativo tuvieron una HR menor a 1, por lo que la expresión de *SERCA2* se constituye como un factor de protección o supervivencia en estos subtipos. En el subtipo triple negativo, la alta expresión de *ATP2A2* se asoció con una mayor supervivencia en los pacientes de cáncer de mama.

Finalmente, como vemos en la figura 25, existe una asociación significativa entre la expresión de *ATP2A3* y la supervivencia de pacientes. Esto ocurre en los subtipos luminal A ($p=0.016$), B ($p=0.02$) y triple negativo ($p=0.0011$). La significancia del subtipo Her2 se acerca a tener un valor pronóstico significativo ($p=0.054$). En luminal A se tiene una supervivencia de 216 meses en la cohorte de mayor expresión y de 228 en la de menor expresión; en luminal B se tuvo una supervivencia de 171 meses en la cohorte de mayor expresión y 162 en la de menor expresión; finalmente, en triple negativo se obtuvo una supervivencia de 36 en mayor expresión y 17 en menor expresión de *SERCA3*. Todos los subtipos, con excepción de Her2, tuvieron una HR menor a 1, por lo que la expresión de *SERCA3* se constituye como un factor de protección o supervivencia. En los subtipos luminales B y triple negativo, particularmente triple negativo, la alta expresión de *ATP2A3* se asoció con una mayor supervivencia en los pacientes de cáncer de mama.

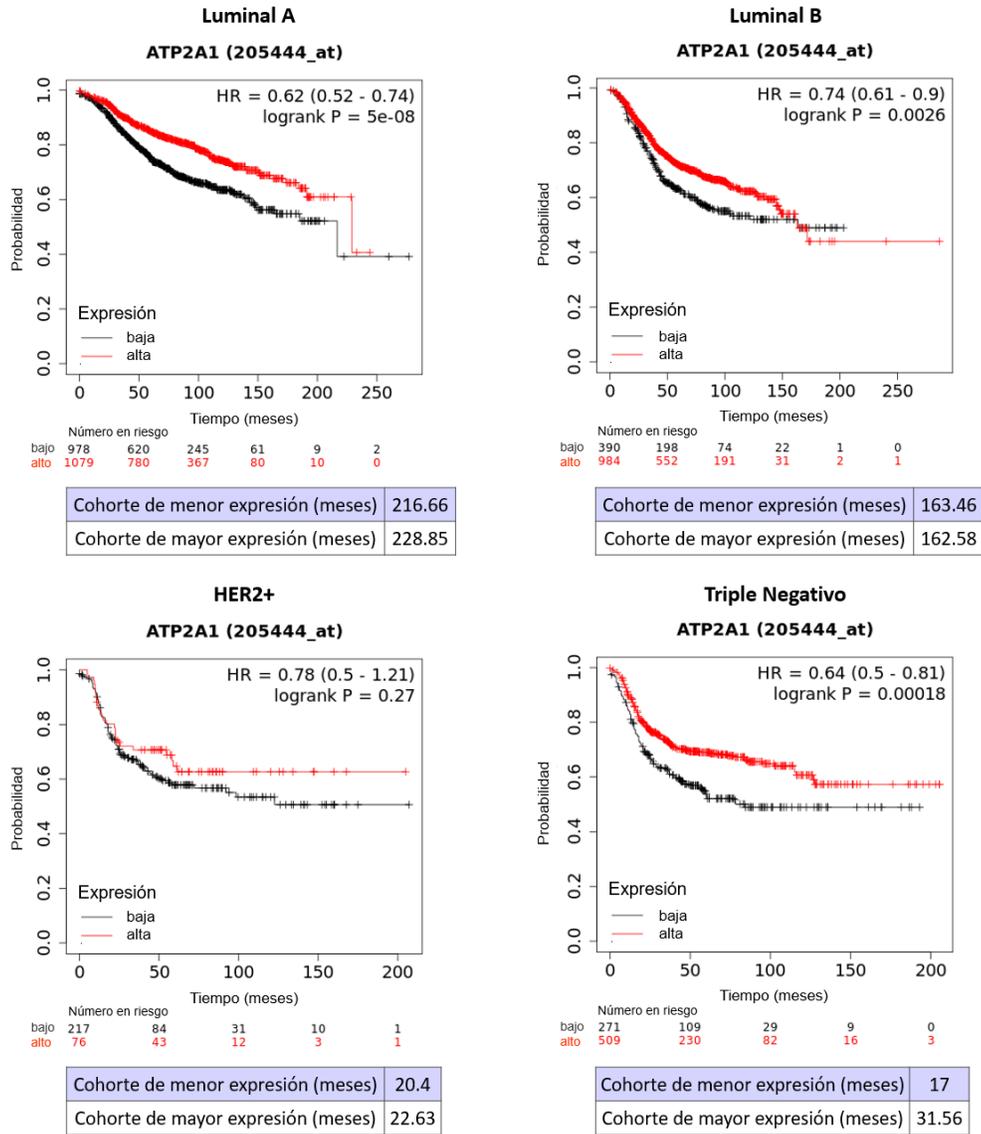


Figura 23. Correlación de la expresión de SERCA1 con la supervivencia y pronóstico de pacientes de cáncer de mama por subtipo molecular. Gráficos de correlación de Kaplan-Meier para expresión de *ATP2A1* en 4504 muestras de pacientes con cáncer de mama para los subtipos luminal A (2057), luminal B (1374), Her2 (293) y triple negativo (780). Las muestras de pacientes se dividieron por selección automática, y se muestran dos cohortes, de mayor y menos expresión (meses). Se muestra el factor de protección (HR<1) y valor P de significancia (logrank p<0.05). Gráficas generadas en Kaplan Meier Plotter.

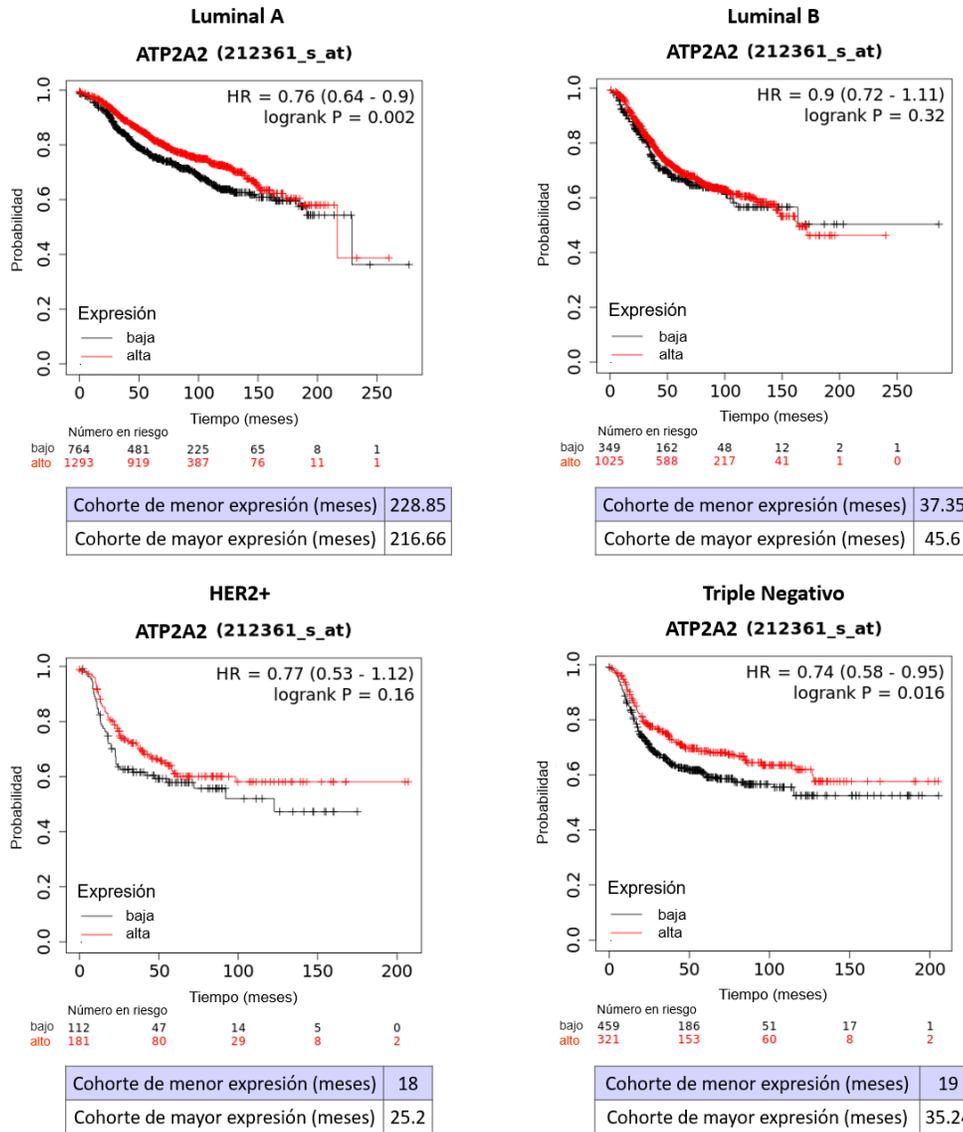


Figura 24. Correlación de la expresión de SERCA2 con la supervivencia y pronóstico de pacientes de cáncer de mama por subtipo molecular. Gráficos de correlación de Kaplan-Meier para expresión de ATP2A2 en 4504 muestras de pacientes con cáncer de mama para los subtipos luminal A (2057), luminal B (1374), Her2 (293) y triple negativo (780). Las muestras de pacientes se dividieron por selección automática, y se muestran dos cohortes, de mayor y menos expresión (meses). Se muestra el factor de protección (HR<1) y valor P de significancia (logrank p<0.05). Gráficas generadas en Kaplan Meier Plotter.

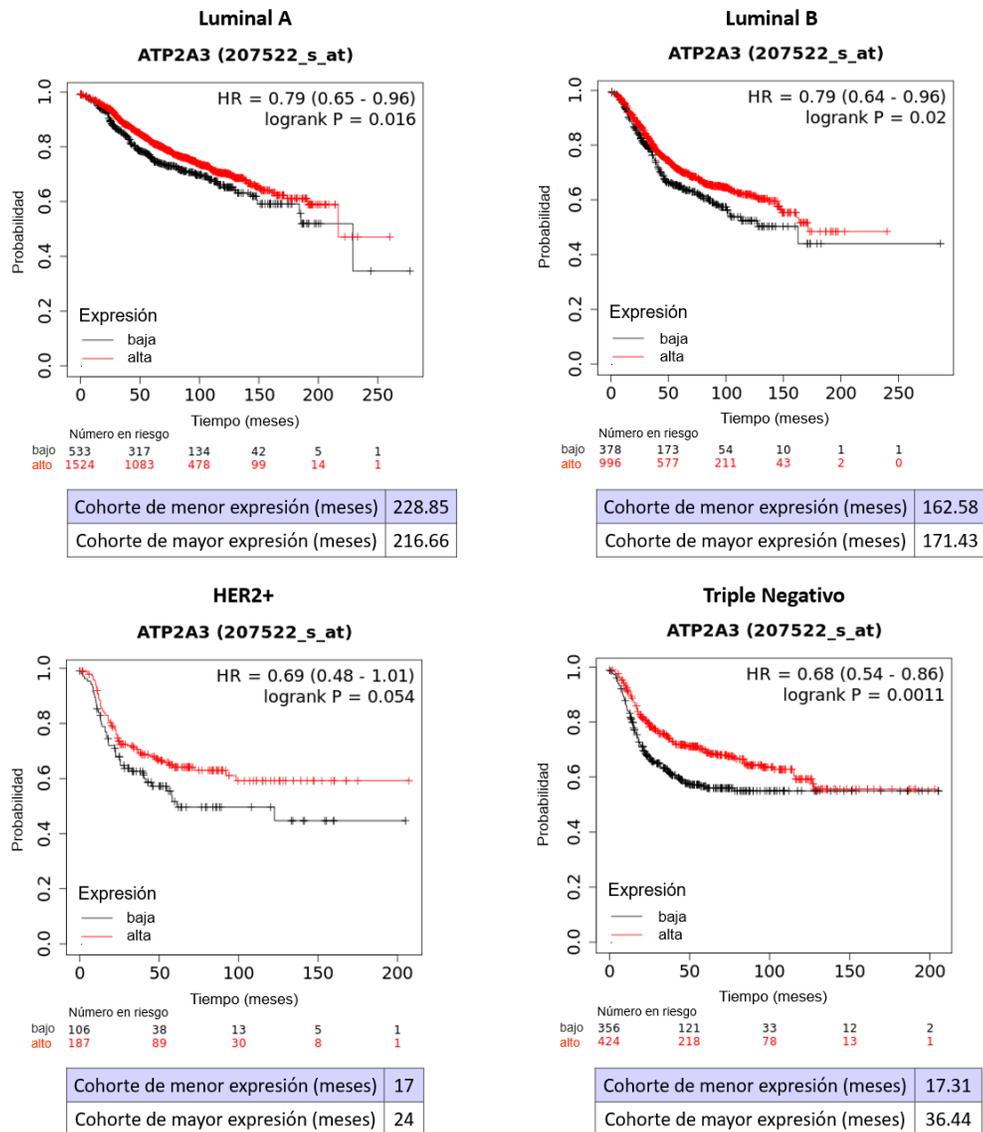


Figura 25. Correlación de la expresión de SERCA3 con la supervivencia y pronóstico de pacientes de cáncer de mama por subtipo molecular. Gráficos de correlación de Kaplan-Meier para expresión de *ATP2A3* en 4504 muestras de pacientes con cáncer de mama para los subtipos luminal A (2057), luminal B (1374), Her2 (293) y triple negativo (780). Las muestras de pacientes se dividieron por selección automática, y se muestran dos cohortes, de mayor y menos expresión (meses). Se muestra el factor de protección (HR<1) y valor P de significancia (logrank p<0.05). Gráficas generadas en Kaplan Meier Plotter.

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1. Análisis de la expresión de los genes de las bombas SERCA en cáncer de mama

Como podemos recordar, las bombas SERCA están codificadas por tres genes, *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*, localizados en cromosomas distintos, que dan lugar a tres isoformas principales: SERCA1, SERCA2 y SERCA3. Estas tres isoformas producen distintas variantes por *splicing* alternativo cuya expresión es tejido-desarrollo específica (Lipskaia et al., 2014). Se ha reconocido la expresión de SERCA1 principalmente en músculo esquelético, siendo sus isoformas SERCA1a propia de adultos y SERCA1b de neonatos. Por su parte, SERCA2a es expresada mayormente en músculo esquelético de contracción lenta y cardiaco, mientras que SERCA2b se expresa de manera ubicua, considerándose una bomba de calcio constitutiva o “*house-keeping*”; la isoforma SERCA2c (999 aa) fue recientemente descubierta en músculo cardiaco (Fan et al., 2007; Periasamy y Kalyanasundaram, 2007; Pegoraro et al., 2011). En el caso de SERCA3, esta posee seis variantes, de las cuales SERCA3a presenta alta abundancia en sangre, cerebelo, pulmones, bazo y glándula salival (Figura 8). Además, tiene una amplia distribución en múltiples tejidos y tipos celulares, como es tejido epitelial, endotelial, fibroblastos, plaquetas, células de origen hematopoyético (ej. Linfocitos) así como órganos digestivos, células del sistema nervioso, glándulas y tejido mamario (Fan et al., 2007; Pegoraro et al., 2011).

Al comparar muestras de tejido mamario normal y tumoral de cáncer de mama, se observó un aumento significativo de SERCA1 en tumores (Figura 9). Sin embargo, SERCA1 tiene los niveles de expresión más bajos incluso en tumores, a comparación de SERCA2 y 3, debido a su expresión tejido-específica de músculo esquelético. En la publicación por Davis et al., 2013 no se reportan cambios en la expresión de *ATP2A1* para MDA-MB-468, línea celular triple negativa inducida a EMT, proceso relacionado al desarrollo tumoral. Como se esperaba, debido a su expresión constitutiva, la expresión de SERCA2 se mantiene alta y constante tanto en tejido normal, como tumoral; sin haber diferencias en su expresión entre muestras normales y tumorales (Figura 9).

La expresión de SERCA3 es abundante en tejido mamario normal; sin embargo, se ha observado una disminución drástica en cáncer de mama, incluso durante etapas tempranas en lesiones no malignas (Papp y Brouland, 2011). En nuestro análisis observamos un aumento

significativo de la expresión de SERCA3 en tumores en comparación con tejido normal (Figura 9), contrario a la disminución mencionada anteriormente. Cabe mencionar que las muestras tumorales analizadas son muestras heterogéneas, donde pueden incluirse tumores de distintos subtipos moleculares, grados o estadios de cáncer de mama.

Se procedió a analizar la expresión de las bombas de calcio en muestras de tumores divididas por subtipo molecular. Para ello se esperaba que los subtipos luminal A, B y Her2 tuvieran la mayor expresión de SERCA3, mientras que las triples negativas tuvieran pérdida total o parcial de su expresión (Varga et al., 2018, Papp y Brauland, 2011). Como vemos en la figura 10, observamos un aumento en la expresión de SERCA3 enfocado en los subtipos luminal A, B y Her2. Esto es concordante con el patrón de expresión esperado, además de ser observado igualmente en la figura 11, al analizar distintas muestras tumorales de pacientes por microarreglos clasificadas por subtipo molecular.

En la figura 11 se observa la mayor expresión de SERCA3 en el subtipo luminal B, seguido de Her2 y luminal A, siendo ausente en la mayoría de las muestras triple negativas, al igual que las de tejido sano. La expresión de SERCA1 y SERCA2 se mantiene ausente para el primero y abundante para el segundo, a lo largo de las diferentes muestras tumorales y subtipos, como se ha observado previamente usando muestras de todos los subtipos.

Este patrón se observó igualmente en líneas celulares de cáncer de mama. Como se muestra en la figura 13a, al analizar 49 líneas celulares de los diferentes subtipos, vemos abundancia de SERCA3 en los subtipos luminal A y B, seguida de Her2 y nula para triple negativo. SERCA1 se encontró ausente como se esperaba; sin embargo, SERCA2 tuvo variaciones, sobre todo en muestras triple negativo.

Además, se realizó un análisis con líneas celulares de cáncer de mama específicas, de las cuales se tiene información acerca de su estatus de expresión de SERCA3 (Figura 12 y 13b). En la figura 12 observamos las líneas celulares con la menor expresión de SERCA3, entre las que resaltan las triples negativas MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT-549 y HCC1806, que sobreexpresan Her2 como HCC1569 y HCC1954, finalizando con la luminal ZR-75-30. De estas, BT-549 y HCC1954 tuvieron nula expresión de SERCA3. Por otro lado, SERCA3 fue abundante en el resto de las líneas celulares, principalmente en las luminales B BT-474, UACC812, MDA-MB-361, luminal A MCF-7, y que sobreexpresan Her2, AU565 y SKBR-3.

La expresión constitutiva de SERCA2 se mantiene abundante en todas las líneas celulares, mientras que SERCA1 se encuentra ausente en la mayoría de ellas.

En la figura 13b observamos que SERCA3 se encuentra ausente en las líneas triple negativo, así como en las líneas no tumorigénicas MCF-10A y MCF-12a, las cuales, aunque se consideren normales, presentan un comportamiento basal (Chávez et al., 2010; Varga et al., 2018). SERCA3 es abundante en luminales A, B y Her2, con excepción de algunas líneas como HCC1954 (Her2), CAMA1 y T47D (Luminales A), de las cuales, HCC1954 fue mencionada anteriormente por su nula expresión de SERCA3. SERCA1 y SERCA2 presentan variaciones a lo largo de las líneas celulares; sin embargo, SERCA2 se mantiene abundante en la mayoría de ellas.

Finalmente, al realizar un análisis de expresión diferencial entre líneas normales y líneas de los diferentes subtipos, pudimos corroborar la misma tendencia observada anteriormente (Figura 14). En líneas luminales A observamos sobreexpresión de SERCA3 en ZR-75-1, así como de su respectivo marcador, el receptor de estrógenos *ESR1*; en MCF-7 no se observan cambios en la expresión de SERCA3, a pesar de ser una línea celular que lo expresa abundantemente. En el caso de las luminales B, observamos sobreexpresión de sus tres receptores correspondientes, así como de SERCA3, tal como se esperaba conforme a su subtipo. En el caso del subtipo Her2, el aumento se observó en SKBR3, línea que sobreexpresa SERCA3, mientras que HCC1954 presenta niveles bajos como se ha observado anteriormente; su marcador *ERBB2* se sobreexpresa conforme a su subtipo. En el caso de las triples negativas, observamos un aumento de SERCA3 y del receptor *ESR1* que, por su estatus triple negativo, está comprobado que normalmente no se expresa.

Se toma en cuenta que los análisis son en referencia a las líneas normales, donde un aumento en la expresión no es necesariamente un aumento biológico real, como observamos en las líneas triple negativo que expresan algunos receptores como el receptor *ESR1*, así como el aumento de *ERBB2* en líneas luminales A. Esto puede deberse a la manera en que están normalizados los datos (Log10), donde un leve aumento en comparación de líneas normales, se visualiza con una mayor o menor expresión. Estas diferencias también pueden deberse a la naturaleza de la técnica y su tipo de análisis.

Como se esperaba, las líneas normales presentaron un comportamiento basal, con nula expresión de sus tres receptores y de SERCA3. Cabe mencionar que *ATP2A3* tuvo diferencias

significativas en su expresión para los cuatro subtipos moleculares de cáncer de mama, sobre todo su sobreexpresión en las líneas celulares luminales y Her2, así como su disminución en las líneas celulares normales. Los genes *ATP2A1* y *ATP2A2* fueron incluidos en el análisis; sin embargo, su expresión diferencial en los diferentes subtipos no resultó significativa, por lo que no se visualizan gráficamente.

Estos resultados de expresión por subtipo molecular están acorde a estudios anteriores donde se observa una alta expresión de SERCA3 en subtipos luminales y que sobreexpresan Her2, así como baja expresión en triple negativo (Varga et al., 2018). En nuestros análisis observamos un aumento considerable de SERCA3 en luminales y Her2, particularmente en luminales B, así como una expresión baja o nula en triple negativo. Se ha observado la pérdida de SERCA3 durante la tumorigénesis y en carcinomas ductales de mama triple negativo, siendo esta pérdida de SERCA3 el marcador más importante de tumores altamente proliferativos que no expresan ER (Papp y Brauland, 2011). Sin embargo, también observamos pérdida de SERCA3 en algunas líneas celulares de subtipo Her2, sobre todo HCC1954, así como la disminución de su expresión en algunas líneas celulares luminales.

Estas líneas particulares parecen ser la excepción a los patrones de variación en la expresión por subtipos de SERCA3 que hemos mencionado; a estas líneas celulares particulares, así como las líneas triples negativo, se les corroboraran sus patrones de metilación y enriquecimiento de histonas para explicar la pérdida total o parcial de la expresión de SERCA3.

VIII.2. Análisis de la metilación de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*

La metilación del DNA es uno de los principales responsables de la represión de genes implicados en el desarrollo de cáncer. Para ello se analizó el nivel de metilación del promotor de los genes que codifican para las bombas de calcio, *ATP2A1-3*, y poder así describir las variaciones en su expresión en cáncer de mama.

Como vemos en nuestro análisis de metilación del promotor de muestras normales y tumorales (Figura 15), no se observaron aumentos significativos en la metilación de *ATP2A3* ni *ATP2A2* en muestras de tumores de cáncer de mama; sus niveles de metilación tanto en muestras normales como tumorales son bajos, cercanos a 0. Por otro lado, en *ATP2A1* se observó un aumento significativo en muestras tumorales, donde *ATP2A1* posee los niveles de metilación

más altos, acercándose a valores de 1, lo cual concuerda con su ausencia en tejidos no musculares.

En cuanto a los patrones de metilación en muestras de tumores divididas por subtipos, observamos resultados similares a los mencionados previamente en muestras sin separar por subtipos. Los niveles de metilación del promotor de *ATP2A2* y *ATP2A3* se mantienen bajos en todos los subtipos, incluso en muestras de tejido normal. Como se esperaba, los niveles de *ATP2A1* son considerablemente altos en las muestras de tumores para los diferentes subtipos, siendo significativa en todas las muestras, menos en las triples negativas (Figura 16).

De manera similar, al analizar los niveles de metilación en líneas celulares por subtipo molecular, volvemos a ver niveles notables de metilación cercanos a 1 en el promotor de *ATP2A1* para todos los subtipos moleculares, concordante a lo observado en muestras tumorales. En *ATP2A2* tampoco observamos aumento de metilación por línea celular, excepto en MDA-MB-468 con valores cercanos a 0.2. En cuanto a *ATP2A3*, vemos un aumento en la metilación en la línea Her2 HCC1569 y en las triples negativas, siendo la más alta HBL-100, seguida de BT-549 y MDA-MB-231. No obstante, nuevamente los niveles de metilación de *ATP2A2* y *ATP2A3* se conservan bajos comparado con *ATP2A1*, en donde no observamos cambios en la metilación de *ATP2A2* y observamos un aumento en el subtipo triple negativo en *ATP2A3*. Dai et al., 2017, describe que los patrones de metilación de islas CpG tienden a ser muy similares entre líneas celulares y tumores.

Se ha visto que los distintos subtipos de cáncer de mama tienen perfiles de metilación específicos. Los tumores de cáncer de mama de subtipos Her2 se asociaron a hipermetilación de genes relacionados al desarrollo de cáncer (Bediaga et al., 2010). Mientras que para líneas triple negativo, se ha documentado un patrón hipometilado a nivel genómico, teniendo los niveles más bajos comparado con otros subtipos de cáncer de mama (Sher et al., 2020). De manera contraria, los subtipos ER+ o luminales, se han caracterizado por mayores niveles de metilación comparado con subtipos triple negativos (Gyorffy et al., 2016).

Nosotros no observamos metilación considerable en el promotor de *ATP2A3* para las muestras de tumores analizadas, mientras que en líneas celulares triple negativo se observó una tendencia a mayores niveles de metilación. En el caso de *ATP2A2*, se ha reportado la metilación del promotor en una isla CpG como responsable de la represión de *ATP2A2* en cáncer oral (Endo et al., 2004). Sin embargo, en cáncer de mama no observamos su represión sino alta expresión

como gen constitutivo, esto concordante con los niveles bajos de metilación observados. La metilación de *ATP2A1* es notoria en la región de su promotor tanto en muestras de tumores como líneas celulares, lo que nos comprueba su represión en cáncer de mama, por medio de su metilación como mecanismo epigenético.

Ya se ha reportado para *ATP2A2* y *ATP2A3* este patrón en la metilación de su promotor proximal para líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 (representantes de líneas luminales A y triple negativo). Se ha visto que este se encuentra sin metilar y sin respuesta o cambios de expresión ante tratamientos inhibidores de metiltransferasas, lo que ha llevado a concluir que estos genes no se encuentran regulados por metilación de su promotor proximal en ambas líneas celulares (Contreras et al., 2015 e Izquierdo et al., 2019). Esto ya se ha observado en otros tipos de carcinomas, como son de cuello y cabeza, pulmones, por lo que no se ha encontrado una correlación entre la baja expresión de *ATP2A3* y el estado de metilación de su promotor (Contreras et al., 2015). Korošec et al., 2009 demostró igualmente un promotor sin cambios en su metilación para *ATP2A3* en distintos tipos de cáncer, sugiriendo que no actúa como un gen supresor de tumores clásico, sino un gen cuya haplodeficiencia podría llevar a cambios en el ambiente celular que predispongan al desarrollo de cáncer. Esta información en conjunto, nos lleva a concluir que *ATP2A3* y *ATP2A2* no son genes cuya regulación está ligada a la metilación de su promotor.

VIII.3. Análisis de la abundancia de marcas de histonas en la región promotora de los genes *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer de mama

La regulación de la expresión génica mediante mecanismos epigenéticos como es el remodelado de la cromatina mediante la acetilación o metilación de histonas, es importante en eventos tempranos en el desarrollo de cáncer. La presencia de estas marcas de histonas en la región promotora puede ser un factor que determine la baja o alta expresión de las bombas de calcio en las diferentes líneas celulares. Por ello realizamos un análisis de presencia y abundancia de marcas de histonas canónicas en distintas líneas celulares representativas de los subtipos moleculares de cáncer de mama.

Se observaron patrones similares de localización y abundancia de marcas de histonas en la región promotora de los genes *ATP2A2* y *ATP2A1*, respectivamente. El primero se encuentra altamente enriquecido de todas las marcas permisivas analizadas en la zona de su promotor,

corroborando su expresión abundante en tejido mamario. El segundo carece de estas marcas de histonas permisivas en su región promotora, explicando su represión y expresión tejido-específica (Figura 19, 20 y 21). No se observó ningún patrón de abundancia o localización de la marca H3K27me3, aun esperando que esta estuviera enriquecida para *ATP2A1* por sus características de represión transcripcional (Figura 22).

En conjunto, los patrones de abundancia/localización de histonas y los niveles de metilación del promotor de *ATP2A2* y *ATP2A1* observados, logran explicar la expresión de ambos genes en cáncer de mama. *SERCA2* presenta una alta expresión, posiblemente atribuido a la abundancia de marcas de histonas permisivas y baja metilación de su promotor; mientras que la expresión de *SERCA1* se encuentra reprimida, resultado de la ausencia de marcas de histonas permisivas y una alta metilación de su promotor.

Concordante con los patrones de expresión que habíamos observado anteriormente en *SERCA3*, las líneas celulares de los subtipos luminal B presentan la abundancia más alta de marcas permisivas en el promotor de *ATP2A3*, seguida de Her2 y Luminal A, así como la no tumorigénica, 76NF2V (Figura 19, 20 y 21); estos tres primeros subtipos conocidos por su alta expresión de *SERCA3* (Varga et al., 2018). Se ha observado que la marca H3K9ac regula la expresión de un gran porcentaje de genes en luminales B y Her2 (Karsli-Ceppioglu et al., 2017). Jin et al., 2019 reporta que la acetilación de H3 y H4 es abundante en subtipos que sobreexpresan Her2, como observamos para la línea SKBR-3. Por otro lado, se correlacionó la ausencia en la expresión de *SERCA3* en la línea celular Her2 HCC1954 (Figura 12 y 13b), con la ausencia total de marcas permisivas (Figura 19, 20 y 21).

Las líneas triples negativo que no expresan *SERCA3*, incluyendo la no tumorigénica MCF-10A tuvieron alta abundancia de marcas permisivas. Por otro lado, la marca represiva H3K27me3 fue abundante en la línea triple negativa HCC1937, así como las no tumorigénicas MCF-10A y 76NF2V que no expresan *SERCA3* (Figura 22). De manera contrastante, MCF-7 presento abundancia de esta marca, a pesar de ser considerada de las líneas con mayor expresión de *SERCA3*; sin embargo, se ha reportado en otros trabajos que presenta alta abundancia de marcas permisivas (Izquierdo et al., 2019). Cabe mencionar que la marca H3K27me3 ha sido inconsistente en varios de nuestros análisis. Es importante mencionar que la expresión génica por remodelado de marcas de histonas no es la única modificación epigenética para la regulación

transcripcional, es posible que la ausencia de SERCA3 sea regulada por otros mecanismos, como puede ser la metilación del DNA.

Ya se han hecho análisis epigenéticos experimentales de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, representativas de subtipos luminales A y triple negativo, subtipos opuestos en su expresión de SERCA3. Eduardo et al., 2019, ha observado mediante datos de Encode, abundancia de las marcas permisivas H3K9ac y H3K27ac para MCF-7. Contreras et al., 2015 observo un aumento en la expresión de SERCA3 al tratar ambas líneas celulares con inhibidores de HDACS (TSA y NaB). Además de observar en MDA-MB-231 un aumento de la marca permisiva H3K9ac y un decremento de H3K9me3, proponiendo un remodelado de heterocromatina a eucromatina.

Como pudimos corroborar en nuestro análisis, niveles altos de metilación y acetilación de histonas han sido asociados a subtipos con mejor pronóstico como son los luminales (Vásquez et al., 2020). Sera necesario ampliar mediante datos experimentales, el análisis de abundancia de marcas en líneas celulares de los subtipos luminal B, las cuales resultaron con enriquecimiento significativo en marcas permisivas, además de poseer la más alta expresión de SERCA3. De igual forma, se deberán analizar estas marcas de histonas en líneas celulares triples negativas, que puedan explicar y correlacionar su baja expresión de SERCA3 con el patrón de abundancia de estas marcas.

VIII.4. Análisis de la correlación entre la expresión de SERCA1, SERCA2 y SERCA3 con el pronóstico y supervivencia de pacientes con cáncer de mama

Finalmente, se analizó la correlación entre la expresión de las bombas SERCA con la supervivencia y el pronóstico de pacientes con cáncer de mama por subtipo molecular. Como podemos observar en las figuras 23, 24 y 25, la expresión de las tres bombas SERCA se asocia con la supervivencia de los pacientes y esta presenta variaciones entre subtipos. De estas, SERCA1 y SERCA3 son las que más se asocian a la supervivencia.

En el caso de SERCA1, observamos que la asociación entre su expresión y la supervivencia en cáncer de mama es notoria en los subtipos luminales A, B y triple negativo (Figura 23). De los cuales, tenemos una mayor supervivencia a mayor expresión de SERCA1 en los subtipos luminales A y triple negativo. En el caso de SERCA2, su asociación con la supervivencia se cumple en luminales A y triple negativo (Figura 24). De estos, una mayor

expresión de SERCA2 se relaciona a mayor sobrevida en el subtipo triple negativo. Finalmente, en SERCA3, vemos una asociación de sobrevida con su expresión en luminales A, B y triple negativo (Figura 25). De estos, la tendencia de mayor sobrevida con mayor expresión de SERCA es observada en el subtipo triple negativo.

Como podemos notar, pacientes del subtipo triple negativo presentan una mayor sobrevida asociada a la alta expresión de SERCA. Por otro lado, los valores pronósticos de Her2 no fueron significativos para ninguna de las bombas SERCA.

La expresión de SERCA1 no ha sido tan estudiada en cáncer de mama. Debido a sus niveles bajos por su expresión tejido-específica, el análisis ha sido priorizado en SERCA2 y SERCA3. Sin embargo, se ha observado que en cáncer gástrico los pacientes que sobre expresaban SERCA1 tienen mejor pronóstico de vida (Zoppoli et al., 2019).

En SERCA2 se han observado resultados contrastantes en la correlación expresión-pronóstico de pacientes en diferentes tipos de cáncer: su sobreexpresión se correlaciona con un mejor pronóstico en pacientes con tumores astrocíticos (Li et al., 2017). Sin embargo, se ha observado en cáncer colorrectal que su sobreexpresión es un marcador pronóstico indicador de recaídas postoperatorias, y se ha correlacionado con mayor nivel de invasión, metástasis y avance de grado tumoral. De igual forma, pacientes con alta expresión de SERCA2 tienen un peor pronóstico y sobrevivencia en este tipo de cáncer (Chung et al., 2006; Huang et al., 2012). Por lo que el factor de protección de SERCA2 y su correlación con la sobrevida de los pacientes parece tener variaciones importantes de un tipo de cáncer a otro.

Ya se ha correlacionado positivamente la expresión de SERCA3 con un mejor pronóstico en pacientes de carcinoma gástrico (Xu et al., 2012). Esto también fue observado por Meneses et al., 2019, en muestras de tumores de cáncer gástrico y de colon mediante análisis de Kaplan-Meier, en el que vemos igualmente un pronóstico favorable en pacientes con niveles altos de expresión de SERCA3, constituyéndose como buen marcador en el pronóstico de pacientes.

En nuestros análisis, se hace hincapié en que los subtipos de cáncer de mama con altos niveles de SERCA, como son los luminales, tienen mayor sobrevivencia. Donde una mayor expresión de SERCA está ligada a un cáncer menos agresivo y más diferenciado, mientras que menores niveles de SERCA se relacionan a un pronóstico más agresivo y menos diferenciado como el triple negativo. Concluimos que hay una asociación significativa entre la expresión de SERCA y la sobrevida de pacientes de cáncer de mama, sobre todo en el subtipo triple negativo.

IX. CONCLUSIONES

- La expresión de RNAm del gen *ATP2A3* varía según los distintos subtipos moleculares de cáncer de mama. La expresión del gen *ATP2A2* es abundante en todos los subtipos moleculares por su naturaleza constitutiva; mientras que la expresión del gen *ATP2A1* es baja o ausente debido a su expresión músculo-específica.
- El subtipo luminal B posee los niveles más altos de expresión del RNAm de *ATP2A3*, seguida de Her2 y luminal A en líneas celulares y muestras de tumores de cáncer de mama.
- Los tumores y líneas celulares del subtipo triple negativo tienen los niveles más bajos de expresión de *ATP2A3*, proponiendo a este gen como un buen marcador del grado de agresividad del tumor.
- La baja expresión de *ATP2A1* en cáncer de mama es debida a niveles altos de metilación en su promotor y ausencia de marcas de histonas permisivas. Mientras que la abundancia de *ATP2A2* se debe al enriquecimiento de marcas de histonas permisivas y baja metilación.
- La expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* en muestras de tumores de cáncer de mama no es regulada significativamente por la metilación de su promotor, así mismo en líneas celulares de los subtipos Luminal A y B y Her2. Mientras que la metilación del gen *ATP2A1* es alta y es responsable de su baja expresión tanto en tumores como en líneas celulares.
- La presencia de marcas de histonas permisivas H3K4me3, H3K9ac y H3K27ac en el promotor del gen *ATP2A3* varía de acuerdo con la línea celular, siendo más abundantes en líneas celulares que expresan niveles altos de SERCA3, como es el subtipo luminal B. Mientras que estas fueron ausentes en la línea Her2 HCC1954, que no expresa SERCA3.
- La marca de histona represiva H3K27me3 no presenta un patrón específico de abundancia y presencia en *ATP2A2* y *ATP2A1*. Mientras que para *ATP2A3* presenta variaciones según la línea celular, siendo abundante tanto en líneas celulares que expresan y no expresan SERCA3.

- Existe una asociación significativa entre una alta expresión de las bombas SERCA2 y SERCA3 y una mayor supervivencia en pacientes de cáncer de mama, principalmente en el subtipo triple negativo.

X. PERSPECTIVAS

A partir de este acercamiento bioinformático, se propone realizar experimentos *in vitro* que analicen la expresión de SERCA3 en líneas celulares representativas de los diferentes subtipos de cáncer de mama; ya sea por qRT-PCR, RNA-seq o Western Blot para medir sus niveles de RNAm y proteína. Se propone el análisis de metilación del promotor del gen *ATP2A3* en distintas líneas celulares, sobre todo luminales y triples negativas. De igual forma es necesario realizar experimentos de ChIP-seq para evaluar la abundancia de marcas de histonas canónicas presentes para el gen de *ATP2A3*, que pudieran ser responsables de su regulación epigenética en las células en cultivo. Finalmente se podrían incluir experimentos con distintos tratamientos para inhibir HDACs o DNMTs, y analizar los cambios en la expresión de SERCA3.

XI. LITERATURA CITADA

- Adiga D., R. Radhakrishnan, S. Chakrabarty, P. Kumar y S. Prasada. 2020. The Role of Calcium Signaling in Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cells Tissues Organs*.
- Afgan E., D. Baker, B. Batut, M. van den Beek, D. Bouvier, M. Cech, J. Chilton, D. Clements, N. Caraor, B. Grüning, A. Guerler, J. Hillman, V. Jalili, H. Rasche, N. Soranzo, J. Goecks, J. Taylor, A. Nekrutenko y D. Blankenberg. 2018. The Galaxy platform for accessible reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 46(1): W537-W544.
- Aït L., A. Arbabian, H. Roudot, J. Brouland, F. Baran-Marszak, E. Salvaris, A. Boys, H. Drexler, A. Enyedi, R. Letestu, N. Vadin-Blank, y B. Papp. 2017. Induction of endoplasmic reticulum calcium pump expression during early leukemic B cell differentiation. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 36:87.
- Alberts, B., A. Johnson, y J. Lewis. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. New York, United States of America.
- Andrews S. 2010. FastQC A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Arbabian A., J. Brouland, A. Apati, K. Paszty, L. Hegedus, A. Enyedi, C. Chomienne y B. Papp. 2012. Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during lung cancer cell differentiation. *FEBS Journal*, 1-11.
- Arbabian A., J. Brouland, P. Gélebart, T. Kovacs, R. Bobe, J. Enouf y B. Papp. 2011. Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer. *BioFactors*, 37(3):139-149.
- Arruda, A. P., y G. S. Hotamisligil. 2015. Calcium Homeostasis and Organelle Function in the Pathogenesis of Obesity and Diabetes. *Cell metabolism*, 3: 381–397.
- Audia J. y R. Campbell. 2016. *Histone Modifications and Cancer*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 8(4).
- Barnett D., E. Garrison, A. Quinlan, M. Stromberg y G. Marth. 2011. BamTools: a C\mathplus\mathplus API and toolkit for analyzing and managing BAM files. *Bioinformatics*, 27(12), 1691–1692.
- Barretina J., G. Caponigro, N. Stransky, K. Venkatesan, A. Margolin, S. Kim, C. Wilson, J. Lehár, G. Kryukov, D. Sonkin, A. Reddy, M. Liu, L. Murray, M. Berger, J. Monahan, P. Morais, J. Meltzer, A. Korejwa, J. Jané, F. Mapa, J. Thibault, E. Bric, P. Raman, A.

- Shipway, I. Engels, J. Cheng, G. Yu, J. Yu, P. Aspesi, M. de Silva, K. Jagtap, M. Jones, L. Wang, C. Hatton, E. Palescandolo, S. Gupta, S. Mahan, C. Sougnez, R. Onofrio, T. Liefeld, L. MacConaill, W. Wincker, M. Reich, N. Li, K. Mesirov, S. Gabriel, G. Getz, K. Ardlie, V. Chan, V. Myer, B. Weber, J. Porter, M. Warmuth, P. Finan, J. Harris, M. Meyerson, T. Golud, M. Morissey, W. Sellers, R. Schlegel y L. Garraway. 2012. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483(7391):603-607.
- Berridge M., M. Bootman., y H. Roderick. 2003. Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7:517-29.
- Biswas M., K. Voltz, J. Smith y J. Langowski. 2011. Role of Histone Tails in Structural Stability of the Nucleosome. *PLOS Computational Biology*, 7(12).
- Brini M., y E. Carafoli. 2009. Calcium Pumps in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 89:1341-1378.
- Brouland J., P. Gelebart, T. Kovacs, J. Enouf, J. Grossmann y B. Papp. 2005. The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. *American Journal of Pathology*, 167:233-242.
- Cancer Genome Atlas Network. 2012.. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature*, 490(7418), 61–70.
- Casemore D., y C. Xing. 2015. SERCA as a target for cancer therapies. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*, 2:100-103.
- Chemaly E., L Troncone y D. Lebeche. 2018. SERCA Control of Cell Death and Survival. *Cell Calcium*, 69:46-61.
- Chen L, T. Zeng, X. Pan, Y. Zhang, T. Huang y. Cai. 2019. Identifying Methylation Pattern and Genes Associated with Breast Cancer Subtypes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17):4269.
- Chew Y., G. Camporeale, N. Kothapalli, G. Sarath y J. Zempleni. 2006. Lysine residues in N- and C-terminal regions of human histone H2A are targets of biotinylation by biotinidase. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(4):225-233.

- Chung F., S. Lin, C. Lu, C. Yeh, F. Chen, J. Hsieh, T. Huang y J. Wang. 2006. Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase 2 Expression as a Tumor Marker in Colorectal Cancer. *The American Journal of Surgical Pathology*, 30(8): 969-974.
- Clapham D. 2007. Calcium Signaling. *Cell*: 131.
- Contreras E., A. Hernández, L. Flores, A. Zarain, y J. Santiago. 2015. Histone deacetylase inhibitors promote the expression of *ATP2A3* gene in breast cancer cell lines. *Molecular Carcinogénesis*, 10:1477-85.
- Crepin A., G. Bidaux, F. Vanden, E. Dewailly, V. Goffin, N. Prevarskaya y C. Slomianny. 2007. Prolactin stimulates prostate cell proliferation by increasing endoplasmic reticulum content due to SERCA 2b over-expression. *Biochemical Journal*, 401:49-55.
- Dai X., H. Cheng, Z. Bai y J. Li. 2017. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*, 8(16): 3131-3141.
- Dai X., T. Li, Z. Bai, Y. Yang, X. Liu, J. Zhan y B. Shi. 2015. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American Journal of Cancer Research*, 5(10): 2929-2943.
- Dang D. y R. Rao. 2016. Calcium-ATPases: Gene Disorders and Dysregulation in Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1344-1350.
- Das P. y R. Singal. 2004. DNA methylation and cancer. *Journal of Clinical Oncology* 22(22):4632-42.
- Davis F., M. Parsonage, P. Cabot, M. Parat, E. Thompson, S. Roberts-Thomson y G. Monteith. 2013. Assessment of gene expression of intracellular calcium channels, pumps and exchangers with epidermal growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition in a breast cancer cell line. *Cancer Cell International*, (13): 76.
- Deaton A. y A. Bird. 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Development*, 25(10):1010-1022.
- Dedeurwaerder S., C. Desmedt, E. Calonne, S. Singhal, B. Haibe, M. Defrance, S. Michiels, M. Volkmar, R. Deplus, J. Luciani, F. Lallemand, D. Larsimont, J. Toussaint, S. Haussy, F. Rothe, G. Rouas, O. Metzger, S. Majjaj, K. Saini, P. Putmans, V. Sotiriou y F. Fuks. 2011. DNA methylation profiling reveals a predominant immune component in breast cancers. *EMBO Molecular Medicine*, 3(12):726-41.

- Dumitrescu R. 2012. DNA methylation and histone modifications in breast cancer. *Methods of Molecular biology*, 863:35-45.
- Dumitrescu R. 2018. Interplay Between Genetic and Epigenetic Changes in Breast Cancer Subtypes. *Methods of Molecular Biology*, 1856:19-34.
- Edgar R., M. Domrachev y A. Lash. 2002. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research*, 30(1):207-10.
- Eliyatkın, N., E. Yalçın, B. Zengel, S. Aktaş y E. Vardar. 2015. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *The journal of breast health*, 11(2), 59–66.
- Elsheikh S., A. Green, E. Rakha, D. Powe, R. Ahmed, H. Collins, D. Soria, J. Garibaldi, C. Paish, A. Ammar, M. Grainge, G. Ball, M. Abdelghany, L. Martinez, D. Heery e I. Ellis. 2009. Global Histone Modifications in Breast Cancer Correlate with Tumor Phenotypes, Prognostic Factors and Patient Outcome. *Cancer Research*, 69(9).
- Endo Y., K. Uzawa, Y. Mochida, M. Shiiba, H. Bukawa, H. Yokoe y H. Tanzawa. 2004. Sarcoendoplasmic reticulum Ca (2+) ATPase type 2 downregulated in human oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 110(2):225-31.
- Ewels P., M. Magnusson, S. Lundin y M. Kaller. 2016. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19):3047-3048.
- Flores L., G. Rodríguez y A. Zarain. 2013. Participación de las bombas de calcio del retículo endoplasmático en el cáncer. *Revista de Educación Bioquímica*, 4: 137:144.
- Flores L., G. Rodríguez y A. Zarain. 2016. Induction of cell differentiation activates transcription of the Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase 3 gene (*ATP2A3*) in gastric and colon cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, 56(2):735-750.
- Franco H., A. Nagari, V. Malladi, W. Li, Y. Xi, D. Richardson, K. Allton, K. Tanaka, J. Li, S. Murakami, K. Keyomarsi, M. Bedford, X. Shi, W. Li, M. Barton, S. Dent y W. Kraus. 2018. Enhancer transcription reveals subtype-specific gene expression programs controlling breast cancer pathogenesis. *Genome Research*, 28(2):159-170.
- Gao Y., L. Chen, Y. Han, F. Wu, W. Yang, Z. Zhang, T. Huo, Y. Zhu, C. Yu, H. Kim, M. Lee, Z. Tang, K. Phillips, B. He, S. Jung, Y. Song, B. Zhu, R. Zu y Q. Feng. 2020. Acetylation of histone H3K27 signals the transcriptional elongation for estrogen receptor alpha. *Communications Biology*, 165.

- Gélébart P., T. Kovács, J. Brouland, R. van Gorp, J. Grossmann, N. Rivard, Y. Panis, V. Martin, R. Bredoux, J. Enouf, y B. Papp. 2002. Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 29:26310-20.
- Giri A. y T. Aittokallio. 2019. DNMT Inhibitors Increase Methylation in the Cancer Genome. *Frontiers in Pharmacology*, 10:385.
- Global Cancer Observatory: Cancer Today. Globocan. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>, acceso el 02/Septiembre/2021.
- Goldman M., B. Craft, M. Hastie, K. Repecka, F. Mcdade, A. Kamath, A. Benerjee, Y. Luo, D. Rogers, A. Brooks, J. Zhu y D. Haussler. 2020. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nature Biotechnology*, 38:675-678.
- González C. y T. Alkon. 2013. Guías de práctica clínica Exarmed. InterSistemas.
- GraphPad Prism version 5.00 for Windows. 2007. GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.
- GTEX Consortium. Human genomics. 2015. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science*, 348(6235):648-660.
- Györfy B. 2021. Survival analysis across the entire transcriptome identifies biomarkers with the highest prognostic power in breast cancer. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19:4101-4109.
- Györfy B., G. Bottai, T. Fleischer, G. Munkácsy, J. Budczies, L. Paladini, A. Børresen-Dale, V. Kristensen, L. Santarpia. 2016 Aberrant DNA methylation impacts gene expression and prognosis in breast cancer subtypes. *International Journal of Cancer*, 138(1):87-97.
- Han L., S. Zheng, S. Sun, T. Huang y Z. Zhao. 2010. Genome-Wide DNA Methylation Profiling in 40 Breast Cancer Cell Lines. *Advanced Intelligent Computing Theories and Applications*, 277–284.
- Hernández A., E. Izquierdo, G. Hernández, A. Zarain y J. Santiago. 2020. Transcriptional and epigenetic landscape of Ca²⁺-signaling genes in hepatocellular carcinoma. *Journal of Cell Communication and signaling*.

- Hernández A., E. Izquierdo, I. Meneses, G. Rodríguez, A. Zarain y J. Santiago. 2019. Histone deacetylase inhibitors promote ATP2A3 gene expression in hepatocellular carcinoma cells: p300 as a transcriptional regulator. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 113:8-16.
- Hong C., M. Kuyng y T. Roh. 2012. Characterization of Chromatic Structure-associated Histone Modifications in Breast Cancer Cells. *Genomics & Informatics*, 10(3):145-152.
- Horton J., S. Siamakpour, C. Lee, Y. Zhou, W. Chen, J. Geradts, D. Fels, P. Hoang, K. Ashcraft, J. Groth, H. Kung, M. Dewhirst y J. Chi. 2015. FAS Death Receptor: A Breast Cancer Subtype-Specific Radiation Response Biomarker and Potential Therapeutic Target. *Radiation Research*, 184(5):456-69.
- Hovnanian A. 2007. SERCA pumps and diseases. *Subcellular Biochemistry*, 45:337-63.
- Huang M., H. Wang, T. Tok, H. Chang, M. Chang, T. Cheng, J. Wang y S. Lin. 2012. *EVI2V*, *ATP2A2*, *S100B*, *TM4SF3* and *OLFM4* As Potential Prognostic Markers for Postoperative Taiwanese Colorectal Cancer Patients. *DNA and Cell Biology*, 31(4):625-635.
- Iamshanova O., A. Fiorio y N. Prevarskaya. 2017. Molecular mechanisms of tumor invasion: regulation by calcium signals. *The Journal of Physiology*, 595(10):3063-3075.
- Izquierdo E., D. Lozano, A. Hernández y A. Zarain. 2020. Las Bombas de Calcio SERCA: Su Papel en la Patogénesis Tumoral e Implicaciones Clínicas. *Revista de Educación Bioquímica*, (39)2:40-51.
- Izquierdo E., G. Rodríguez, I. Meneses-Morales, y A. Zarain. 2017. *ATP2A3* gene as an important player for resveratrol anticancer activity in breast cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, 7:1703:1711.
- Jia R., Z. Li, W. Liang, Y. Ji, Y. Weng, Y. Liang y P. Ning. 2020. Identification of key genes unique to a luminal A and basal-like breast cancer subtypes via bioinformatic analysis. *World Journal of Surgical Oncology*, 18: 268
- Jiang G., S. Zhang, A. Yazdanparast, M. Li, A. Vikram, Y. Liu, S. Mounika y L. Cheng. 2016. Comprehensive comparison of molecular portraits between cell lines and tumors in breast cancer. *BMC Genomics*, 17:525.
- Jin W., Q. Li, Y. Liu y Zuo. 2019. Effect of the key histone modifications on the expression of genes related to breast cancer. *Genomics*, 112(1):853-858.

- Karsli-Ceppioglu S., A. Dagdemir, G. Judes, A. Lebert, F. Penault-Llorca, Y. Bignon y D. Bernard. 2017. The Epigenetic Landscape of Promoter Genome-wide Analysis in Breast Cancer. *Scientific Reports*, 7, 6597.
- Kim D., B. Langmead y S. Salzberg. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12(4):357-360.
- Kim H., y S. Bae. 2011. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *American Journal of Translational Research*, 3(2):166-179.
- Kiruma H. 2013. Histone modifications for human epigenome analysis. *Journal of Human Genetics*, 48:439-445.
- Korošec B., D. Glavac, T. Rott Y M. Ravnik. 2006. Alterations in the *ATP2A2* gene in correlation with colon and lung cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 171:105-111.
- Korošec B., D. Glavac, V. Volavsek y M. Ravnik. 2008. Alterations in genes encoding sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca (2+) pumps in association with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 181:112-118.
- Korošec, B., D. Glavač, M. Volavšek y M. Ravnik-Glavač. 2009. *ATP2A3* gene is involved in cancer susceptibility. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 188(2): 88–94.
- Krueger F. 2021. Trim Galore. GitHub repository. <https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore.com/fenderglass/Flye>.
- Kulis M. y M. Esteller. 2010. DNA methylation and cancer. *Advances in genetics*, 70:27-56.
- Langmead B y S. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4):357–359.
- Leinonen R. y H. Sugawara. 2010. The Sequence Read Archive. *Nucleic Acids Research*, 39(1): D19-D21.
- Li D., S. Hsu, D. Purushotham, R. Sears y T. Wang. 2019. WashU Epigenome Browser update. *Nucleic Acids Research*, 47(W1): W158-W165.
- Li H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin. 2009. The Sequence Alignment/MAP format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16):2078-2079.

- Li W., N. Zhong, J. He, Y. Li, L. Hou, H. Liu, C. Xia, L. Wang y. Lu. 2017. High *ATP2A2* expression correlates with better prognosis of diffuse astrocytic tumor patients. *Oncology Reports*, 37(5):2865-2874.
- Liao Y., G. Smyth y W. Shi. 2013. featureCounts: an efficient general-purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7):923-930.
- Lipskaia, L., Z. Keuylian, K. Blirando, N. Mougnot, A. Jacquet, C. Rouxel, H. Sghairi, Z. Elaib, R., Blaise, S. Adnot, R. Hajjar, E. Chemaly, I. Limon, y R. Bobe. 2014. Expression of sarco (endo) plasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) system in normal mouse cardiovascular tissues, heart failure and atherosclerosis. *Biochimica et biophysica acta*, 11:2705–2718.
- Liu L., G. Boivin, V. Prasad, M. Periasamy y G. Shull. 2001. Squamous cell tumors in mice heterozygous for a null allele of *Atp2a2*, encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoform 2 Ca^{2+} pump. *Journal of Biological Chemistry*, 276:26737-26740.
- Love M., W. Huber y S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(2).
- Makena M. y R. Rao. 2019. Subtype Specific Targeting of Calcium Signaling in Breast Cancer. *Cell Calcium*, 102109.
- Maubant S., B. Tesson, V. Maire, M. Ye, G. Rigaiil, D. Gentien, F. Cruzalegui, G. Tucker, S. Roman y T. Dubois. 2015. Transcriptome analysis of Wnt3a-treated triple-negative breast cancer cells. *PLoS One*, 10(4).
- Mekahli D., G. Byltyneck, J. Parys, H. De Smedt, y L. Missiaen. 2011. Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6: a004317.
- Meneses-Morales I., E. Izquierdo, L. Flores, G. Rodríguez, A. Hernández y A. Zarain. 2019. Epigenetic regulation of the human *ATP2A3* gene promoter in gastric and colon cancer cell lines. *Molecular Carcinogenesis*, 58(6):887-897.
- Miller J. y P. Grant. 2013. The Role of DNA Methylation in Histone Modifications in Transcriptional Regulation in Humans. *Subcellular Biochemistry*, 61:289-317.
- Misawa K., A. Imai, H. Matsui, A. Kanai, Y. Misawa, D. Mochizuki, M. Mima, S. Yamada, T. Kurokawa, T. Nakagawa y H. Mineta. 2020. Identification of novel methylation markers

- in HPV-associated oropharyngeal cancer: genome-wide discovery, tissue verification and validation testing in ctDNA. *Oncogene*, 39:4741-4755.
- Monteith G., F. Davis y S. Roberts-Thomson. 2012. Calcium Channels and Pumps in Cancer: Changes and Consequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 38:31666-73.
- Moore L., T. Le y G. Fan. 2013. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1):23-38.
- Navarrete M y P. Pérez. 2017. Epigenetic alterations in acute lymphoblastic leukemia. *Boletín Médico del Hospital Infantil*, 74(4):243-264.
- Nevin C., y M. Carroll. 2015. Sperm DNA Methylation, Infertility and Transgenerational Epigenetics. *HSOA Journal of Genetics and Genomic Sciences*, 1:004.
- Pacifico F., L. Ulianich, S. De Micheli, S. Treglia, A. Leonardi, P. Vito, S. Formisano, E. Consiglio y B. Di Jeso. 2003. The expression of the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases in thyroid and its down-regulation following neoplastic transformation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 30:399-409.
- Pagliari L., M. Marchesini y G. Roti. 2021. Targeting oncogenic Notch signaling with SERCA inhibitors. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(8).
- Papatheodorou I., P. Moreno, J. Manning, A. Muñoz, N. George, S. Fexova, N. Fonseca, A. Fülgrabe, M. Green, N. Huang, L. Huerta, H. Iqbal, M. Jianu, S. Mohammed, L. Zhao, A. Jamuczak, S. Jupp, J. Marioni, K. Meyer, R. Petryszak, C. Prada, C. Talavera, S. Teichmann, J. Vizcaino y A. Brazma. 2020. Expression Atlas Update: from tissues to single cells. *Nucleic Acids Research*, 48(8): D77-D83.
- Papp B., P. Brouland, P. Gélébart, T. Kovács, y C. Chomienne. 2004. Endoplasmic reticulum calcium transport ATPase expression during differentiation of colon cancer and leukemia cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 4:1223-1236.
- Papp B., y J. Brouland. 2011. Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Pump Expression during Breast Tumorigenesis. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 5:163-174.
- Pegoraro C., N. Pollet y A. Monsoro-Burq. 2011. Tissue-specific expression of Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases (ATP2A/SERCA) 1, 2, 3 during *Xenopus laevis* development. *Gene Expression Patterns* (11): 122-128.
- Periasamy M., y A. Kalyanasundaram. 2007. SERCA Pump Isoforms: Their Role in Calcium Transport and Disease. *Muscle Nerve*, 35:430-442.

- Perou, C., T. Sørli, M. Eisen, M. van de Rijn, S. Jeffrey, C. Rees, J. Pollack, D. Ross, H. Johnsen, L. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. Zhu, P. Loning, A. Borresen-Dale, P. Brown y D. Botstein et al. 2000. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 406, 747–752.
- Prasad V., G. Boivin, M. Miller, L. Liu, C. Erwin, B. Warner y G. Shull. 2005. Haploinsufficiency of *ATP2A2*, encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoform 2 Ca^{2+} pump, predisposes mice to squamous cell tumors via a novel mode of cancer susceptibility. *Cancer Research*, 65(19):8655-61.
- Ramírez F., D. Ryan, B. Grüning, V. Bhardwaj, F. Kilpert, A. Richter, S. Heyne, F. Dündar y T. Manke. 2016. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research*, 44(W1): W160-W165.
- Riaz M., M. van Jaarsveld, A. Hollestelle, W. Prager-van der Smissen, A. Heine, A. Boersma, J. Liu, J. Helmijr, B. Ozturk, M. Smid, E. Wiemer, J. Foekens y J. Martens. 2013. miRNA expression profiling of 51 human breast cancer cell lines reveals subtype and driver mutation-specific miRNAs. *Breast Cancer Research*, 15(2): R33.
- Roderick H. y Cook S. 2008. Ca^{2+} signaling checkpoints in cancer: remodeling Ca^{2+} for cancer cell proliferation and survival. *Nature Reviews Cancer*, 8:361-375.
- Ronde J., J. Hannemann, H. Halfwerk, L. Mulder, M. Straver, M. Vrancken, M. Van de Vijver, L. Wessels y S. Rodenhuis. 2010. Concordance of clinical and molecular breast cancer subtyping in the context of preoperative chemotherapy response. *Breast Cancer Research and Treatment*, 119(1):119-26
- Schwarz, D. S., y M. D. Blower. 2015. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and molecular life sciences*, 1:79–94.
- Sher G., N. Salman, A. Khan, K. Prabhu, A. Raza, M. Kulinski, S. Dermime, M. Haris, K. Junejo y S. Uddin. 2020. Epigenetic and breast cancer therapy: Promising diagnostic and therapeutic applications. *Seminars in Cancer Biology*, (20): 30181-4.
- Smith B. y J. Denu. 2009. Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1789(1):45-57.
- Sproul D., C. Nestor, J. Culley, J. Dickson, M. Dixon, D. Harrison, R. Meehan, A. Sims y B. Ramsahoye. 2011. Transcriptionally repressed genes become aberrantly methylated and

- distinguish tumors of different lineages in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(11):4364-4369.
- Stefansson O., S. Moran, A. Gomez, S. Sayols, C. Arribas, J. Sandoval, H. Hilmarisdottir, E. Olafsdottir, L. Tryggvadottir, J. Jonasson, J. Eyfjord y M. Esteller. 2015. *Molecular Oncology*, 9(3):555-568.
- Szerlong H., y J. Hansen. 2011. Nucleosome distribution and linker DNA: connecting nuclear function to dynamic chromatin structure. *Biochemistry and Cell Biology*, 89(1):24-34.
- Toyoshima C. y G. Inesi. 2004. Structural Basis of Ion Pumping by Ca^{2+} -ATPase of the Sarcoplasmic Reticulum. *Annual Review of Biochemistry*, 73:269-92.
- Vandecaetsbeek, I., P. Vangheluwe, L. Raeymaekers, F. Wuytack y J. Vanoevelen. 2011. The Ca^{2+} pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(5).
- Vanhoutvin S., F. Troost, H. Hamer, P. Lindsey, G. Koek, D. Jonkers, A. Kodde, K. Venema y R. Brummer. 2009. Butyrate-induced transcriptional changes in human colonic mucosa. *PLoS One*, 4:6759.
- Varga, K., A. Hollósi, K. Pászty, L. Hegedűs, G. Szakács, J. Tímár, B. Papp, A. Enyedi, y R. Padányi. 2018. Expression of calcium pumps is differentially regulated by histone deacetylase inhibitors and estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *BMC cancer*, 1:1029.
- Vásquez I., E. Fernández, J. Márquez y G. Luna. 2020. epigenética del cáncer de mama. *Revista Mexicana de Mastología*, 10(2).
- Wang Z., C. Zang, J. Rosenfeld, D. Schones, A. Barski, S. Cuddapah, K. Cui, T. Roh, W. Peng, M. Zhang y K. Zhao. 2008. Combinatorial patterns of histone acetylation's and methylations in the human genome. *Natural Genetics*, 40(7):897-903.
- Wapenaar H y F. Dekker. 2016. Histone acetyltransferases: challenges in targeting bi-substrate enzymes. *Clinical Epigenetics*, 8:59.
- Watson H. 2015. *Biological Membranes. Essays in Biochemistry*, 59:43-69.
- Workman J. y R. Kingston. 1998. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 67:545-79.
- Wray S., y T. Burdyga. 2010. Sarcoplasmic Reticulum Function in Smooth Muscle. *Physiological Reviews*, 90:113-178.

- Xi Y., J. Shi, W. Li, K. Tanaka, K. Allton, D. Richardson, J. Li, H. Franco, A. Nagari, V. Malladi, L. Coletta, M. Simper, K. Keyomarsi, J. Shen, M. Bedford, X. Shi, M. Barton, W. Kraus, W. Li y S. Dent. 2018. Histone Modification profiling in breast cancer cell lines highlights commonalities and differences among subtypes. *BMC Genomics*, 19:150.
- Xu X., W. Gou, X. Yang, G. Wang, H. Takahashi, M. Yu, X. Mao, Y. Takano y H. Zheng. 2012. Aberrant SERCA3 expression is closely linked to pathogenesis, invasion, metastasis, and prognosis of gastric carcinomas. *Tumor Biology*, 33(6):1845-54.
- Xu, W. Parmigiani y P. Marks. 2007. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, 26:5541-5552.
- Yang J., Y. Wu, Y. Guo, P. Lee y X. Li. 2015. Metformin induces ER stress-dependent apoptosis through miR-708-5p/NNAT pathway in prostate cancer. *Oncogenesis*, 4-158.
- Yoon S., y G. Hyeon. 2016. HDAC and HDAC inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Diseases. *Chonnam Medical Journal*, 52(1):1-11.
- Zenkova D., V. Kamenev, R. Sablina, M. Artyomov y A. Sergushichev. Phantasm: visual and interactive gene expression analysis. <https://genome.ifmo.ru/phantasm>.
- Zhang T., F. Li, L. Liu, H. Jiang, H. Hu, X. Du, X. Ge, J. Cao y. Wang. 2019. Salinomycin triggers endoplasmic reticulum stress through ATP2A3 upregulation in PC-3 cells. *BMC Cancer*, 1:381.
- Zoppoli P., G. Calice, S. Laurino, V. Ruggieri, F. Rocca, G. Torre, M. Ciuffi, E. Amendola, F. Vita, A. Petrillo, G. Napolitano, G. Falco y S. Russi. 2019. TRPV2 Calcium Channel Gene Expression and Outcomes in Gastric Cancer Patients: A Clinically Relevant Association. *Journal of Clinical Medicine*, 8(5):662.