



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Expresión génica de SERCA2 y SERCA3 en células MCF-7
y MDA-MB-231 de cáncer de mama tratadas con butirato
de sodio, tricostatina A o 5-aza-2'dc

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias Biomédicas

PRESENTA:

Q.F.B. Erika Anahi Contreras Leal

Director de tesis:

Dr. Juan Santiago García

Co-director:

Dr. Ángel Zarain Herzberg

Xalapa, Ver.

Febrero, 2019

Becario CONACYT No. 223272

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE CUADROS	5
LISTA DE ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	10
CAPÍTULO 1 Generalidades del cáncer de mama	10
1.1 Epidemiología	10
1.2 Clasificación del cáncer de mama	11
1.3 Cambios moleculares en cáncer de mama	12
CAPÍTULO 2 Ion calcio y proliferación celular	13
2.1 Papel del Ca ²⁺ en la proliferación celular	15
2.2 Remodelación de la homeostasis del Ca ²⁺ y cáncer	17
CAPÍTULO 3 Enzimas SERCA	18
3.1 Genética de las enzimas SERCA	18
3.2 Características bioquímicas de las enzimas SERCA	20
3.3 Regulación de la actividad de las enzimas SERCA	21
3.4 Las enzimas SERCA y cáncer	22
CAPÍTULO 4 Mecanismos epigenéticos que regulan la expresión génica	24
4.1 Acetilación/desacetilación de histonas	25
4.2 Metilación del ADN	27
4.3 Interpretación de las modificaciones epigenéticas	30
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	32
METODOLOGÍA	33
Cultivo celulares y tratamientos	33
Purificación de ARN total	33
Reacciones de transcripción reversa y PCR de punto final	34
PCR en tiempo real	35
Reacciones de inmunoprecipitación de la cromatina ChiP	35

Análisis estadístico	37
RESULTADOS	38
Expresión de SERCA2b y SERCA3a en células MCF-7 tratadas con diferentes concentraciones de NaB o TSA	38
Expresión de SERCA2b y SERCA3a en células MDA-MB-231 tratadas con diferentes concentraciones de NaB o TSA	40
El NaB y el TSA incrementan la acetilación de la H3K9, y el NaB disminuye la metilación de H3K9	42
Expresión de SERCA2b y SERCA3a en células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas	42
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXOS	63
Anexo I Análisis de expresión de SERCA3a y SERCA2b en muestras de cáncer de mama de pacientes	64
Anexo II Artículo científico original	65

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Anatomía del seno y tipos de cáncer de mama.	10
Figura 2. Mecanismos que regulan las concentraciones intracelulares de Ca ²⁺ .	15
Figura 3. Edición alterna de los ARN mensajeros que codifican para las enzimas SERCA1, SERCA2 y SERCA3.	19
Figura 4. Las desacetilasas de histonas y las acetiltransferasas de histonas tienen actividades opuestas.	26
Figura 5. La metilación del ADN es un mecanismo epigenético que regula la transcripción.	29
Figura 6. La 5-azacitosina inhibe a las ADN-metiltransferasas.	29
Figura 7. Integridad del ARN obtenido de líneas celulares de cáncer de mama sometidas a diversos tratamientos.	39
Figura 8. Gel de agarosa al 2% que muestra los productos de PCR amplificados a partir de ADNc de células MCF-7.	39
Figura 9. El butirato de sodio (NaB) y la tricostatina A (TSA) estimulan la expresión de SERCA3a en células MCF-7.	40
Figura 10. El butirato de sodio (NaB) y la tricostatina A (TSA) estimulan la expresión de SERCA3a en células MDA-MB-231 de cáncer de mama.	41
Figura 11. El ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina muestra que NaB y TSA promueven un incremento de la acetilación de H3	43
Figura 12. La 5-aza-2'-dC no estimula la expresión de SERCA2b y SERCA3a en células MCF-7 y MDA-MB-231.	44
Figura 13. El NaB y la TSA inducen la transcripción del gen <i>ATP2A3</i> al aumentar H3K9Ac.	49

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Clasificación de los subtipos de cáncer de mama.	12
CUADRO 2. Alteraciones génicas asociadas al cáncer de mama.	13
CUADRO 3. Cambios en la expresión de las bombas y canales de Ca ²⁺ en tumores y líneas celulares de cáncer de humano.	17
CUADRO 4. Mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de las enzimas SERCA.	23
CUADRO 5. Modificaciones epigenéticas y estados de la cromatina.	30
CUADRO 6. Primers empleados para qRT-PCR y para analizar los promotores de los genes <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> .	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BCL2	Linfoma de células B2
Ca²⁺	Ion Calcio
CaM	Calmodulina
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
CpG	Citocina-Guanina
HACs	Acetilinasas de histonas
HDACs	Desacetilasas de histonas
HDACi	Inhibidores de desacetilasas de histonas
H3K4	Lisina 4 de la histona H3
H3K9	Lisina 9 de la Histona 3
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP3R	Receptor de IP3
mM	Milimolar
μM	Micro molar
NaB	Butirato de sodio
ND	Dato no disponible
NFAT	Factor nuclear de activación de células T
°C	Grados centígrados
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKC	Proteína cinasa C
PMCA	ATPasa de Ca ²⁺ de la membrana plasmática
RE	Receptor de estrógenos
SERCA	ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarco(endo)plásmico
SERCA2b	ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarco(endo)plásmico isoforma 2b
SERCA3a	ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarco(endo)plásmico isoforma 3a
TBE	Amortiguador de Tris-borato-EDTA
TRPM	Receptor de potencial transitorio tipo melastina
TRPV	Receptor de potencial transitorio tipo vaniloide
TSA	Tricostatina A

RESUMEN

Las ATPasas-Ca²⁺ de retículo endoplásmico (SERCA) son enzimas que transportan el ion calcio (Ca²⁺) del citoplasma al lumen de este organelo y desempeñan un papel fundamental en la homeostasis y señalización del Ca²⁺ celular. Hasta el momento se sabe que la metilación del promotor es un mecanismo epigenético que reprime la transcripción de SERCA2 en cáncer oral. Por su parte, la expresión de SERCA3 se estimula bajo el tratamiento con inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi) en células de cáncer gástrico, colón y pulmón. En el presente trabajo, se analizó la expresión de SERCA2b y SERCA3a líneas celulares de cáncer de mama tratadas con los HDACi butirato de sodio (NaB) y tricostaina A (TSA) o con 5-aza-2'deoxicitidina, un inhibidor de ADN-metiltransferasas.

Los resultados muestran que la inhibición de las desacetilasas de histonas, con NaB o TSA, induce la expresión de SERCA3a, mientras que la expresión de SERCA2b no cambia en células MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama. Experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) muestran un aumento en la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 en células MDA-MB-231 tratadas con NaB o TSA. Además, el NaB provocó una disminución en la metilación de la lisina 9 de la histona H3, sugiriendo que estas modificaciones inducen la expresión de SERCA3a a través de la remodelación de la cromatina. Por otro lado, la inhibición de ADN-metiltransferasas con 5-Aza-2-dC no estimula la expresión de SERCA2b y SERCA3a, probablemente debido a que los promotores de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* no están metilados.

En conclusión, el butirato de sodio y la tricostatina A inducen la expresión de SERCA3, no así de SERC2b, a través de un aumento en la acetilación de la histona H3, que podría inducir un estado abierto de la cromatina; mientras que un inhibidor de ADN-metiltransferasas no regula la expresión de ambos genes, sugiriendo que el promotor de los genes que codifican estas enzimas no está metilado en las células estudiadas.

ABSTRACT

Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPases are enzymes that transport calcium from the cytoplasm to the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) and play an important role in Ca^{2+} homeostasis and signaling. Recent studies have shown that the expression of SERCA2 and SERCA3 is considerably decreased in human colon, gastric, oral, breast, lung and choroid plexus cancers. It has been shown that methylation in CpG islands of the promoter of, is an epigenetic mechanism responsible, in part, for the repression of SERCA2 in oral cancer. In addition, treatment of gastric, colon, and lung cancer cells with HDAC inhibitors promotes SERCA3 expression. In the present study, we analyze SERCA2b and SERCA3a expression in tumors and cell lines of human breast cancer treated with HDACi sodium butyrate (NaB) or tricostatin A (TSA), or 5-Aza-2'dc, a DNA methyltransferase inhibitor.

The results show that the inhibition of histone deacetylases by sodium butyrate or tricostatin A resulted in a marked induction of SERCA3 expression, whereas SERCA2 expression did not change significantly in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. ChIP assays show that NaB or TSA treatment of MDA-MB-231 cells increases H3K9 acetylation. NaB also decreases H3K9 methylation; suggesting that these modifications stimulate SERCA3 mRNA expression, through a chromatin remodeling mechanism. In addition, we found that 5-Aza-2'dc did not stimulate SERCA2b and SERCA3a in these cells, suggesting that promoter methylation status does not alter their expression in these cell lines.

Our data indicate that HDACi increase histone H3 acetylation, inducing chromatin changes that promote SERCA3 expression, whereas SERCA2 expression is not affected by this mechanism, and that the expression of both genes is not regulated by a DNA-methyl transferase inhibitor, suggesting that they are not methylated.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad clínica y genéticamente heterogénea. El incremento en el entendimiento de la heterogeneidad, que es intrínseca a varios subtipos de cáncer de mama, podría determinar la forma del futuro diagnóstico, pronóstico y tratamiento (Malhotra GK et al., 2010).

Se ha sugerido que la pérdida del fenotipo diferenciado y la proliferación celular descontrolada están asociadas a un incremento sostenido de Ca^{2+} en el citosol u oscilaciones sostenidas de Ca^{2+} , así como por la depleción de Ca^{2+} en el interior del retículo endoplásmico (Lipskaia y Lompré, 2004; Lipskaia et al., 2007). Estos cambios en las concentraciones de Ca^{2+} en la célula se deben a alteraciones en la maquinaria de regulación de Ca^{2+} . Las enzimas SERCA son las principales enzimas encargadas de regular la homeostasis de Ca^{2+} en la célula, ya que contribuyen a remover el 90% de Ca^{2+} citosólico libre (MacLennan et al., 1985). Existen tres genes que codifican estas enzimas, *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*, que dan origen a SERCA1, SERCA2 y SERCA3 (Lytton y MacLennan, 1988; Dode et al; 1996). La expresión de SERCA3 está suprimida o ausente en varios tipos de cáncer y células tumorales en cultivo, en comparación con tejido normal correspondiente, lo cual sugiere que el cambio anormal en la expresión de esta enzima es un evento temprano durante la carcinogénesis (Gélébart et al., 2002; Arbabian et al., 2013; Ait-Ghezali et al., 2014), por su parte se ha demostrado que la expresión de SERCA2b está alterada en cáncer oral (Endo et al., 2004).

Las desacetilasas de histonas promueven la expresión de SERCA3 en algunas líneas celulares de cáncer, pero se desconoce el mecanismo responsable de esta activación transcripcional. Por lo tanto, en el presente trabajo se analizaron los mecanismos moleculares a través de los cuales los inhibidores de desacetilasas de histonas activan la transcripción de SERCA3 en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama. Este estudio aporta la primera evidencia de que la acetilación e hipometilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9) modulan la expresión de SERCA3.

ANTECEDENTES

1. Generalidades del cáncer de mama

El cáncer de mama empieza con el crecimiento anormal o descontrolado en diferentes tipos de células, en la mayoría de los casos ocurre en las células que forman la unidad ductal-lobular (Figura 1). Esta patología abarca un grupo heterogéneo de lesiones con diferentes características histológicas, aspectos pronósticos y clínicos (Zardavas et al., 2015).

1.1 Epidemiología del cáncer de mama

La incidencia del cáncer de mama se estimó en 2 millones de casos nuevos en 2018 en el mundo y representa el cáncer más frecuente en mujeres, con el 24.2% dentro de todos los tipos de cáncer. Esta neoplasia constituye la primera causa de muerte en la población femenina mundial, la OMS estimó que en 2018 fallecieron 626 mil personas por cáncer de mama en el mundo (GLOBOCAN, 2018).

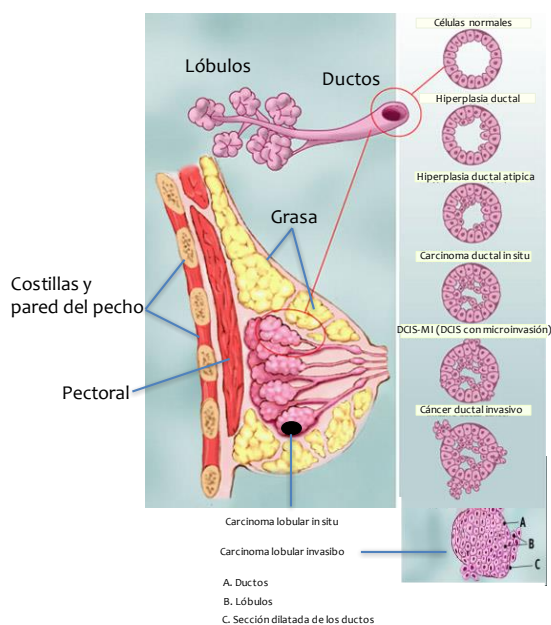


Figura 1. Anatomía del seno y tipos de cáncer de mama. Modificado de <http://www.breastcancer.org>. La proliferación acelerada y no controlada de las células de la mama se originan en los lóbulos o ductos en la mayoría de los casos.

En México la incidencia de cáncer de mama en 2018 fue de 39.5 nuevos casos y con 9.9 defunciones por cada 100 mil mujeres de todas las edades (GLOBOCAN, 2018).

La historia familiar es el factor de riesgo más importante. La historia familiar incluye los síndromes de predisposición genética (5-6 % de los cánceres de mama). El riesgo de desarrollar cáncer en las mujeres portadoras de mutaciones germinales en los genes BRCA1 y BRCA2. La edad \geq 50 años, sin antecedentes familiares de cáncer. Otros factores de riesgos son: la historia reproductiva: menarca temprana, primer embarazo > 30 años, nuliparidad, no lactancia, terapia de reemplazo hormonal o THS > 5 años. La presencia de procesos benignos mamarios como hiperplasias atípicas. Las dietas altas en calorías, llevar una vida sedentaria y el abuso del alcohol. Otros cambios moleculares como: sobreexpresión de HER-2 o mutaciones en los genes TP53, RB (Marzo-Castillejo et al., 2018; Chen, 2018).

1.2 Clasificación del cáncer de mama

La clasificación del cáncer de mama se basa en los siguientes criterios: tipo histológico, grado del tumor, estado de los ganglios linfáticos y la presencia de marcadores predictivos como el receptor de estrógenos (RE) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Posteriormente se asigna el estadio: I, II, III o IV, dónde el estadio IV representa la etapa más avanzada (Key et al., 2001).

La OMS clasifica al cáncer de mama en 17 categorías, sobre la base de varias características microscópicas (Tan y Ellis, 2012). Sin embargo, la relevancia clínica de esta clasificación histológica es limitada, porque la gran mayoría de los casos (> 70%) se clasifican como "carcinoma ductal invasivo o infiltrante", y estos casos demuestran una considerable divergencia en sensibilidades de tratamiento y comportamiento clínico (Zardavas et al., 2015).

El desarrollo de perfiles moleculares por medio de microarreglos de ADN, demostró, a través del perfil de expresión génica y la expresión inmunohistoquímica del RE α , receptor de progesterona (RP) y HER2, que el cáncer de mama podría clasificarse en al

menos cinco subtipos: luminal A, luminal B, HER2, basales y normales. Las características moleculares de estos subtipos se resumen en el Cuadro 1 (Zardabas et al., 2015).

1.3 Cambios moleculares asociados al cáncer de mama

Entre los cambios moleculares más frecuentes detectados en cáncer de mama se encuentran los oncogenes, como el receptor del factor del crecimiento epidérmico humano 2 (HER-2), ciclinas y genes supresores de tumores como el TP53, BRCA1 y BRCA2 (por breast cancer susceptibility gen 1 and 2) y el gen de la proteína retinoblastoma (RB). Los genes BRCA, TP53 y RB tienen funciones críticas en el control del ciclo celular Cuadro 2. Estos oncogenes juegan un papel fundamental en la carcinogénesis y la sobreexpresión o mutaciones de éstos se relaciona con mayor agresividad tumoral (Torrades, 2003; Van de Vijver et al., 2002).

Cuadro 1. Clasificación de los subtipos celulares de cáncer de mama		
Luminal A	RE ⁺ , HER2 ⁻	RP ^{+/-} , Bajo en Ki67, responsivo a terapia endócrina, frecuentemente responsivo a quimioterapia
Luminal B	RE ⁺ , HER2 ⁺	RP ⁺ , Alto en Ki67, usualmente responsivo a terapia endocrina, respuesta variable a quimioterapia. HER2 ⁺ son responsivos a trastuzumab
Basal	RE ⁻ , RP ⁻ , HER2 ⁻	EGFR ⁺ y/o citoqueratina 5/6 ⁺ , alto en Ki67, no responsivo a terapia endócrina, frecuentemente responsivo a quimioterapia
Bajo en claudinas	RE ⁻ , RP ⁻ , HER2 ⁻	Bajo en Ki67, E-caderina, claudina-3, claudina-4 y claudina-7. Respuesta intermedia a quimioterapia
HER 2	RE ⁻ , RP ⁻ , HER2 ⁺	Alto en Ki67, responsivo a trastuzumab, responsivo a quimioterapia

Modificado de Holliday y Speirs, 2011.

Cuadro. 2 Alteraciones génicas asociadas al cáncer de mama		
Gen	Modificación	Frecuencia (%)
Reparación del ADN		
BRCA1 y BRCA2 (por breast cancer susceptibility gene 1 y 2)	Mutación	5-10
Factores de crecimiento y receptores		
EGFR	Sobreexpresión	20-40
HER-2/neu también llamado c-erbB-2	Sobreexpresión	20-40
FGF1/FGF4	Sobreexpresión	20-40
TGF- β	Sobreexpresión	Desconocida
Moléculas de señalización intracelular		
HRAS	Mutación	5-10
c-src	Sobreexpresión	5-70
Reguladores de proliferación celular		
TP53	Mutación/inactivación	30-40
RB1	Inactivación	20-40
Ciclina D	Sobreexpresión	35-45
TGF- α	Desregulación	Desconocido
Moléculas de adhesión y proteasas		
E-caderina	Expresión reducida o ausente	60-47
P-caderina	Expresión reducida o ausente	30-35
Catepsina-D	Sobreexpresión	20-24
MMPs	Expresión aumentada	20-80
Otros genes		
Bcl-2	Sobreexpresión	30-45
c-myc	Amplificación	5-10
nm23	Expresión disminuida	Desconocida

Modificado de Torrades, 2003.

2. Ion calcio y proliferación celular

El ion calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero que activa directamente a diversos componentes de las vías intracelulares de señalización, como: calpaína o isoenzimas de la proteína cinasa C, o cinasas dependientes de Ca^{2+} -calmodulina (Figura 2). Estas

vías regulan varios procesos celulares tan importantes como la contracción muscular, actividad neuronal, proliferación celular, apoptosis, expresión génica, entre otros (Figura 2) (Berridge et al., 2000).

Los procesos de señalización por Ca^{2+} se originan a partir del reconocimiento de estímulos extracelulares. La unión de factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores, quimiocinas o péptidos bioactivos, a sus respectivos receptores en la superficie celular promueve la activación de los receptores acoplados a la proteína G en la membrana plasmática dan como resultado la formación de dos segundos mensajeros potentes, el diacilglicerol y el inositol 1,4,5-trifosfato o IP_3 . Este último provoca la apertura de canales de Ca^{2+} y la liberación de Ca^{2+} del lumen del retículo endoplásmico, también llamado retículo sarco(end)plásmico en células musculares, organelo que representa el principal almacén intracelular de Ca^{2+} (Figura 2) (Berridge et al., 2000). El Ca^{2+} liberado puede promover un mayor influjo de Ca^{2+} al activar canales sensibles al Ca^{2+} localizados en la membrana plasmática, también activa al receptor de rianodina (RYR) (llamado así porque es sensible al alcaloide rianodina). A este proceso se le conoce como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Berridge et al., 2000). Con la apertura de estos canales, el Ca^{2+} fluye rápidamente hacia el citosol, incrementando la concentración local de Ca^{2+} de ~ 100 nM a ~ 1 μM (Clapham, 2007).

La señal de Ca^{2+} puede durar desde milisegundos hasta alrededor de 2 horas. En células endoteliales en estado de reposo, es decir que no están proliferando, la duración total de la señal de Ca^{2+} es de alrededor de 1 segundo (Lipskaia y Lompré, 2004).

La plasticidad y diversidad de los mecanismos de señalización regulados por Ca^{2+} se debe en gran medida al trabajo en conjunto de un grupo de proteínas: canales, bombas de Ca^{2+} y proteínas de unión al Ca^{2+} , intercambiadores de Ca^{2+} . Estas proteínas regulan la amplitud, localización y duración de la señal generada por este catión, a su vez contribuyen al establecimiento de gradientes de Ca^{2+} en los compartimentos celulares (Figura 2) (Monteith et al., 2007).

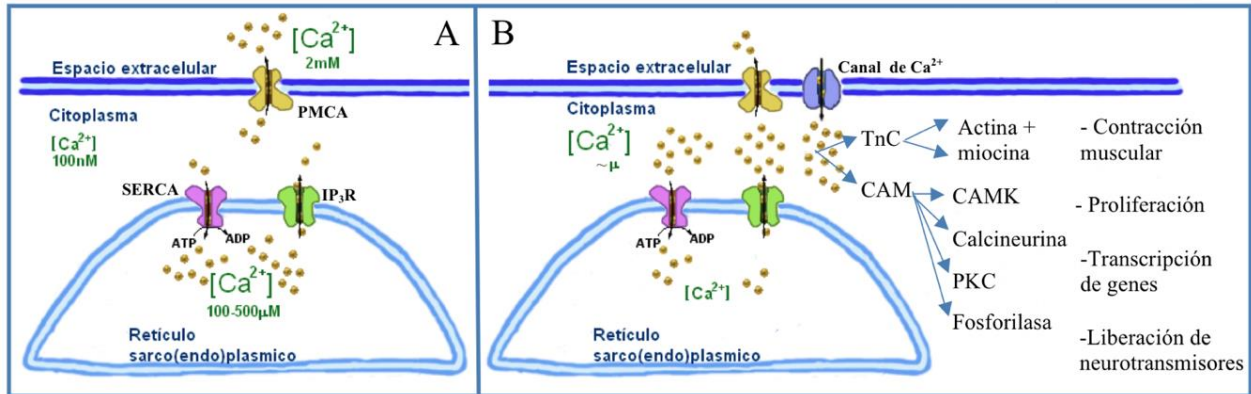


Figura 2. Mecanismos que regulan las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} . En el panel A se muestran las concentraciones intracelulares y extracelulares de Ca^{2+} y tres de las proteínas que participan en la homeostasis de este catión, la ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA), la enzima SERCA y el canal de liberación de calcio activado por IP₃ (IP₃R). Panel B, en respuesta a señales celulares y extracelulares hay liberación de Ca^{2+} del lumen del RE y entrada masiva de Ca^{2+} del espacio extracelular. El aumento en la concentración citoplásmica de Ca^{2+} activa varias proteínas involucradas en procesos celulares importantes, como la proliferación celular, contracción muscular, expresión génica. Las enzimas SERCA se encargan de mantener los gradientes intracelulares de Ca^{2+} al participar activamente en la recaptura de este catión, y con ello regulan la activación de las vías de señalización dependientes de Ca^{2+} . Los círculos amarillos representan los iones Ca^{2+} (Modificado de Monteith et al., 2007).

Después de que el Ca^{2+} ha llevado a cabo sus funciones de señalización, se debe remover rápidamente del citosol para restablecer los niveles basales de Ca^{2+} y con ello parar los procesos de señalización activados por este catión. La célula utiliza varios mecanismos para llevar a cabo esta función, los cuales involucran a las enzimas SERCA y las ATPasas de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) (Monteith et al., 2007).

La principal diferencia entre estas bombas de Ca^{2+} es que la actividad de las enzimas SERCA contribuye a remover aproximadamente el 90% del Ca^{2+} citosólico libre; mientras que las PMCA remueven cerca del 10% (MacLennan et al., 1985).

2.1 Papel del Ca^{2+} en la proliferación celular

El Ca^{2+} tiene un papel importante durante todo el ciclo celular, especialmente en la fase G1 y en las transiciones G1/S y G2/M. Cuando la célula pasa a través de las fases G1,

G1/S y mitosis, existen cambios en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} (Roderick y Cook, 2008). Se ha propuesto que el Ca^{2+} extracelular tiene un papel importante en la proliferación, ya que al depletar este catión del medio extracelular cesa la proliferación celular. Las células son especialmente sensibles a la depleción del Ca^{2+} extracelular en la fase G1, en donde se requiere para la expresión de los genes de inducción temprana, como FOS, JUN, MYC, y para la fosforilación de RB1 en G1/S (Roderick y Cook, 2008). En la mayoría de las células quiescentes la liberación, entrada y recaptura del Ca^{2+} son eventos transitorios. Pero al parecer, la proliferación no es consecuencia de un aumento repentino o transitorio en la concentración del Ca^{2+} intracelular, sino más bien del influjo continuo del Ca^{2+} extracelular, activado por la liberación sostenida del Ca^{2+} intracelular, promovido por la producción prolongada de IP3, inducida a su vez por la estimulación de mitógenos en la superficie celular (Lipskaia et al., 2007).

En células que están proliferando el incremento de Ca^{2+} citosólico sostenido (al menos 1-2 horas) es necesario para activar a la calcineurina, una fosfatasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina, que desfosforila a varias proteínas, entre ellas, al factor de transcripción NFAT (Lipskaia y Lompré, 2004; Lipskaia et al., 2007). NFAT es un mediador de la proliferación en casi todos los tipos celulares, excepto en células excitables (Lipskaia y Lompré, 2004). En su estado inactivo, fosforilado, NFAT se encuentra en el citosol, pero cuando se desfosforila por la acción de la calcineurina se transporta rápidamente al interior del núcleo, en donde se une al sitio promotor de varios genes blanco que regulan la progresión del ciclo celular (Hadri et al., 2006). Diversos factores están involucrados para generar este tipo de señal de Ca^{2+} citoplásmico, incluyendo al IP3, el receptor de IP3 y el canal de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática operados por la liberación del Ca^{2+} intracelular y las enzimas SERCA que controlan la recaptura del Ca^{2+} a su almacén intracelular, y con ello la amplitud y propagación de la señal de Ca^{2+} (Lipskaia et al., 2007).

En situaciones patológicas o por efecto de diversos factores de crecimiento, la señal intracelular de Ca^{2+} se altera, manteniendo activadas algunas vías de señalización, que

a su vez activan o reprimen la transcripción de ciertos genes, que promueven el crecimiento o la proliferación celular (Lipskaia et al., 2007).

2.2 Remodelación de la homeostasis de Ca²⁺ y cáncer

La evidencia indica que las células cancerosas remodelan la actividad o expresión de los componentes de su maquinaria de señalización de Ca²⁺, como los canales de Ca²⁺ TRPM8 y TRPV6, las bombas de Ca²⁺ dependientes de ATP, PMCA1 y PMCA2 y SERCA2 y SERCA3, en varios tipos de cáncer (Roderick y Cook, 2008; Papp y Brouland, 2011) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Cambios en la expresión de las bombas y canales de Ca²⁺ en tumores y líneas celulares de cáncer de humano				
Enzima o Canal	Tipo de cáncer	Cambio		Referencia
		ARNm	Proteína	
TRPM8	Cáncer de mama, melanoma, adenocarcinoma colorectal, cáncer de pulmón: muestras de tejido de pacientes	↑	ND	Tsavalier et al, 2001.
TRPV6	Cáncer de mama, ovario, tiroides, colon: muestras de tejido de pacientes	↑	ND	Zhuang et al, 2002.
PMCA1	Cáncer de mama: líneas celulares	↑	ND	Lee et al., 2002.
PMCA2	Cáncer de mama: líneas celulares	↑	ND	Lee et al., 2005.
SERCA2	Cáncer oral	↓	ND	Endo et al., 2004.
SERCA3	Cáncer de mama: muestras de tejido de pacientes	ND	↓	Papp y Brouland, 2011.
	Cáncer de pulmón y líneas celulares	ND	↓	Arbabian et al., 2013.
	Cáncer de plexos coroideos	ND	↓	Ait-Ghezali et al., 2014.

*TRPM, receptor de potencial transitorio tipo melastina; PRPV, receptor potencial transitorio tipo vaniloide; PMCA, ATPasa de Ca²⁺ de la membrana plasmática; SERCA, ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarco(endo)plásmico; ND, dato no disponible.

Los cambios en la expresión de las bombas y canales de Ca^{2+} conllevan a que la homeostasis de Ca^{2+} en la célula y en el retículo endoplásmico esté alterada, favoreciendo los procesos de tumorigénesis y progresión del tumor como angiogénesis, invasión y metástasis. Esto se debe a la plasticidad y diversidad de los mecanismos de señalización regulados por Ca^{2+} y en gran medida al trabajo en conjunto de este grupo de proteínas. Las bombas y canales de Ca^{2+} regulan la amplitud, localización y duración de la señal generada por este catión, a su vez contribuyen al establecimiento de gradientes de Ca^{2+} en los compartimentos celulares que son necesarios para activar las vías de señalización de Ca^{2+} (Monteith et al., 2007).

3. Enzimas SERCA

Las enzimas SERCA, por Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPases, comprenden un grupo de enzimas ubicadas en la membrana del retículo endoplásmico que transportan el Ca^{2+} del citoplasma hacia el lumen del retículo sarco(endo)plásmico (MacLennan et al., 1985). Estas enzimas remueven aproximadamente el 90% del Ca^{2+} citosólico libre (MacLennan et al., 1985).

3.1 Genética de las enzimas SERCA

En los vertebrados superiores existen tres genes homólogos que codifican para las enzimas SERCA: *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*, también referidos como SERCA1, SERCA2 y SERCA3 (Lytton y MacLennan, 1988; Dode et al., 1996). El gen *ATP2A1* da origen a dos isoformas por la edición alterna del ARN mensajero (ARNm), SERCA1a se expresa en el músculo de contracción rápida de adulto y SERCA1b se expresa en el mismo tejido en etapa neonatal (Figura 3a) (Brandl et al., 1987; Korczak et al., 1988). Por su parte, el gen *ATP2A2* codifica para tres isoformas, producidas por la edición alterna del ARNm, denominadas SERCA2a, SERCA2b y SERCA2c (Figura 3b). La isoforma SERCA2a se expresa predominantemente en el músculo cardíaco y en menor cantidad en el músculo esquelético de contracción lenta, aunque también se expresa en niveles más bajos en el músculo liso y en tejidos no musculares. La isoforma SERCA2b es ubicua, se expresa en todos los tipos celulares, principalmente en el músculo liso y en tejidos no musculares (Lytton y MacLennan, 1988; De la Bastie et al., 1988;

Gunteski-Hamblin, 1988; Eggermont et al., 1990). La isoforma SERCA2c se expresa durante la diferenciación monocítica y en varios tipos de células no musculares (Gélébart et al., 2002) (Figura 3b).

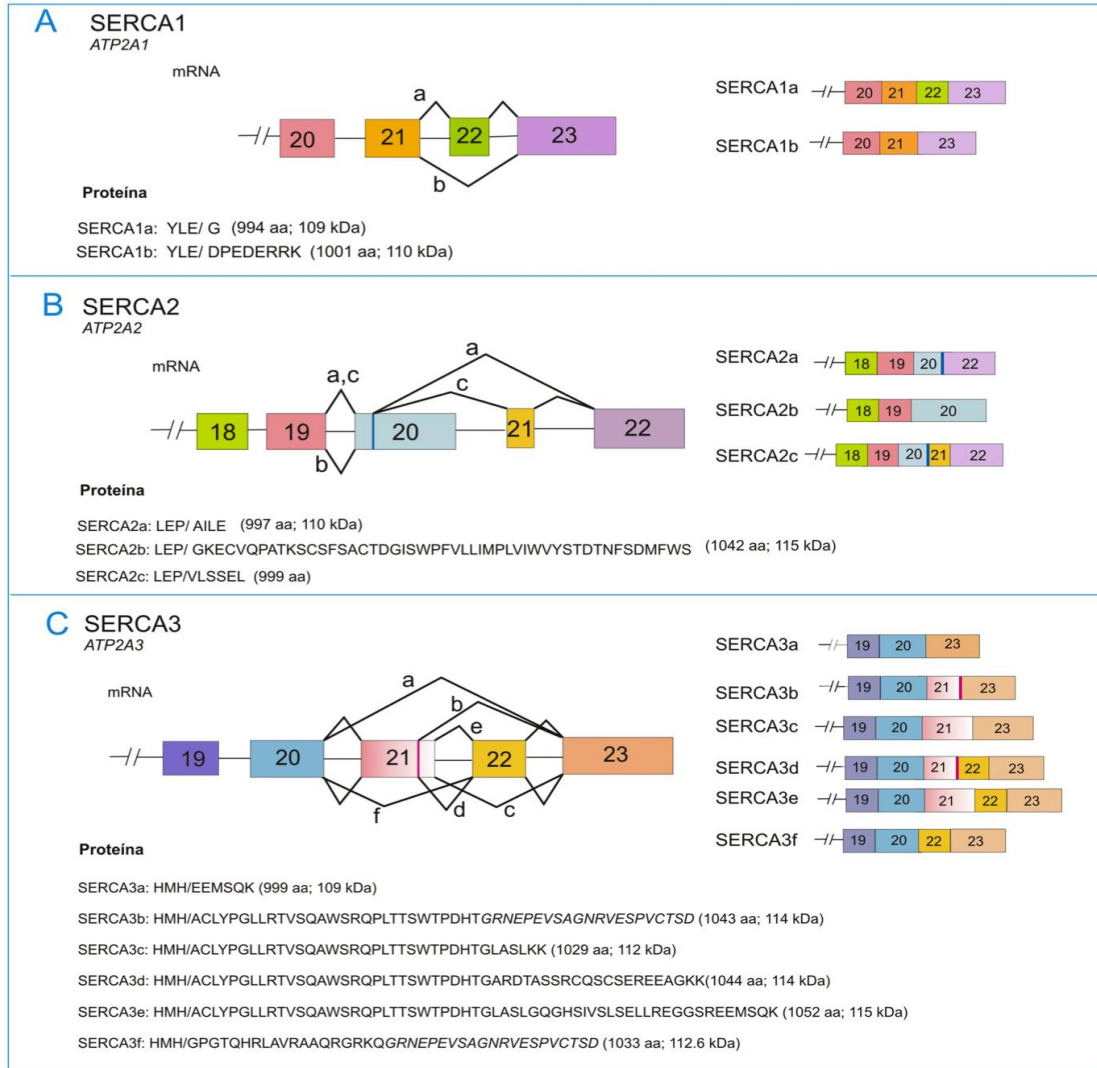


Figura 3. Edición alternativa de los mensajeros que codifican para las enzimas SERCA1, SERCA2 y SERCA3. A) La edición alternativa del ARN mensajero de SERCA1 genera dos isoformas, una que carece del exón 22 (isoforma a) y la otra que lo incluye (isoforma b). B) El ARNm de SERCA2 da origen a tres variantes, SERCA2a incluye parte del exón 20 que empalma con el exón 22; SERCA2b incluye el exón 20 completo y excluye los exones 21 y 22; SERCA2c incluye parte del exón 20 que empalma con el exón 21 y éste a su vez con el exón 22. C) El procesamiento del transcrito primario de SERCA3 es más complejo y genera seis variantes. El ARNm de SERCA3a excluye al exón 21 y 22. Los mensajeros de SERCA3b y SERCA3c insertan parcial o totalmente el exón 21, mientras que SERCA3d y SERCA3e incluyen parcial o totalmente el exón 21, e incluyen el exón 22. El ARNm de SERCAf carece del exón 21 pero incluye el exón 22. Debajo de los tres esquemas que representan la edición de los mensajeros se encuentra la secuencia de aminoácidos carboxilo terminal de las proteínas SERCA, para mostrar la diferencia que existe en esta región entre las diversas isoformas (Modificado de Wuytack et al., 2002).

La edición alterna del mensajero del gen *ATP2A3* es más compleja, da origen a seis isoformas en humanos, denominadas SERCA3a, 3b, 3c, 3d, 3e y 3f (Figura 3c) (Anger et al., 1993; Bobe et al., 1994; MacLennan et al., 1997). Este gen se expresa en una gran variedad de tejidos no musculares, principalmente en células endoteliales, células de origen hematopoyético, células β -del páncreas y células de Purkinje. SERCA3 casi siempre co-expresa con SERCA2b (Mountian et al., 1999).

3.2 Características bioquímicas de las enzimas SERCA

Aunque todas las enzimas SERCA bombean Ca^{2+} del citoplasma al lumen del retículo sarco(end)plásmico, las características bioquímicas de las isoformas difieren sustancialmente. La diferencia principal radica en su afinidad y capacidad de transporte de Ca^{2+} . Al expresarlas en células COS en cultivo, SERCA2b tiene mayor afinidad por Ca^{2+} pero menor velocidad catalítica que SERCA2a. Se ha propuesto que esta diferencia aparente de afinidad para el Ca^{2+} citosólico se puede deber a un efecto cinético y en gran medida a los últimos 12 aminoácidos que conforman la cola en la isoforma SERCA2b, si se remueve esta secuencia de aminoácidos la enzima adquiere las mismas propiedades que SERCA2a (Lyttton et al., 1992, Verboomen et al., 1994).

Por su parte, todas las isoformas de la enzima SERCA3 manifiestan una afinidad similar para Ca^{2+} , pero regulan las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} y del RE de manera diferente, las isoformas SERCA3a, 3b, 3d y 3e presentan una mayor actividad de transporte de Ca^{2+} , en comparación con la isoforma SERCA3c (Martin et al., 2002).

Además, SERCA3 tienen una menor afinidad por Ca^{2+} ($K_{ca} = 1.2 \mu\text{M}$) que SERCA2b ($K_{ca} = 0.2 \mu\text{M}$), y tanto las enzimas SERCA3 como SERCA1 presentan una mayor velocidad catalítica que SERCA2 (Lyttton et al., 1992), además de un menor pH óptimo de actividad (Poch et al., 1998). La menor afinidad de las enzimas SERCA3 por el Ca^{2+} podría sugerir que únicamente se activan cuando el Ca^{2+} alcanza concentraciones altas en el citoplasma, por ejemplo, después de una estimulación masiva o durante el pico de oscilaciones citosólicas de Ca^{2+} (Arredouani et al., 2002).

3.3 Regulación de la actividad de las enzimas SERCA

La actividad de las enzimas SERCA también se regula por la interacción con dos proteínas que actúan como inhibidores endógenos reversibles, fosfolamban y sarcoplipina, las cuales se encuentran en la membrana del retículo endoplásmico (Sutliff et al., 1999; James et al., 1989; Odermatt et al., 1996). Fosfolamban en su estado fosforilado se asocia con las enzimas SERCA1a, SERCA2a y SERCA2b, inhibiéndolas. La inhibición se manifiesta por una disminución aparente de la afinidad por Ca^{2+} y en su capacidad para transportar a este catión. Fosfolamban no interacciona con la enzima SERCA3, debido a que esta enzima no posee una secuencia de reconocimiento de seis aminoácidos en el dominio N (Lys397-Asp-Asp-Lys-Pro-Val), que se encuentra en las enzimas SERCA1 y SERCA2 (Martin et al., 2002). La actividad de SERCA2b también se regula por las proteínas calreticulina y calnexina, presentes en el retículo endoplásmico, que al unirse a la enzima incrementan su afinidad por Ca^{2+} y disminuyen su velocidad catalítica (Jonh et al., 1998; Roderick et al., 2000).

El inhibidor más específico de todas las enzimas SERCA y que no afecta a otras bombas de Ca^{2+} , es la tapsigargina, una lactona sesquiterpénica que se extrae de las raíces de *Thapsia garganica*. Este inhibidor se une a SERCA en la conformación E2 y la inhibe de manera irreversible (Sagara et al., 1992). La inhibición de la actividad de las enzimas SERCA por la tapsigargina, o la depleción de Ca^{2+} del retículo endoplásmico por medio de ionóforos de Ca^{2+} , altera la señal intracelular por Ca^{2+} , lo que resulta en la inhibición de la proliferación celular. Pero cuando la tapsigargina se administra de manera crónica la proliferación celular se reactiva de forma descontrolada promoviendo la formación de tumores *in vivo* e *in vitro* (Bergner y Huber, 2008; Hakii et al., 1986). A partir de estas observaciones se sugiere que la concentración de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico y la actividad de las enzimas SERCA tienen un papel importante en la regulación de la proliferación celular y la adquisición del fenotipo maligno.

3.4 Expresión de las enzimas SERCA en cáncer

La primera evidencia de la posible relación entre las enzimas SERCA y cáncer se encontró en ratones mutantes que expresan solo una copia funcional del gen *ATP2A2*. Estos ratones desarrollan, en edad avanzada, tumores espontáneos en las células escamosas de la piel, tracto digestivo y cavidad oral (Liu et al., 2001). Con esta evidencia se iniciaron estudios en muestras de cáncer y células tumorales de humano en cultivo. Endo et al., (2004) analizaron la expresión del gen *ATP2A2*, que codifica para SERCA2, en células de cáncer oral en humanos (OSCCs, por oral squamous cell carcinoma), así como en líneas celulares derivadas de OSCC y células normales del epitelio oral. Encontraron que la expresión de SERCA2 disminuyó o estaba ausente en el 42% de las muestras de OSCCs y en las líneas celulares derivadas de OSCCs, contrario a lo observado en células normales del epitelio oral (Cuadro 4). Esta alteración no se debió a mutaciones en la región codificante del gen *ATP2A2*, sino a cambios en la metilación de su sitio promotor. La metilación aberrante del promotor fue responsable de suprimir la expresión del gen *ATP2A2* en la tercera parte de los casos de OSCCs analizados. La expresión de este gen se restauró al tratar las líneas celulares derivadas de OSCC con 5-aza-2-deoxidina, un análogo de la citosina capaz de inhibir a las ADN-metiltransferasas (Endo et al., 2004). Estos datos sugieren que la metilación de los promotores tiene una influencia importante en la expresión de SERCA2 en células de cáncer oral en humanos, pero no es el único mecanismo implicado en la represión de la transcripción de SERCA2.

Por su parte, la expresión de SERCA3 está considerablemente reducida o ausente en cáncer de colon, gástrico, plexos coroideos y pulmón, en comparación con las células de epitelio normal de estos tejidos que expresan esta enzima en niveles altos (Cuadro 4) (Gélébart et al., 2002; Brouland et al., 2005; Arbabian et al., 2013; Ait-Ghezali et al., 2014). Además, el grado de pérdida de expresión de SERCA3 correlaciona con el progreso del tumor y el grado de pérdida de diferenciación celular de tumores benignos y malignos, por lo cual se sugiere que la expresión de SERCA3 se podría comportar como un marcador de diferenciación celular en varios tipos celulares (Gélébart et al.,

2002; Wuytack et al., 2002, Brouland et al., 2005; Arbabian et al., 2013; Ait-Ghezali et al., 2014).

Gélébart et al., encontraron que la expresión de SERCA3 aumenta a medida que las células de las criptas del colon maduran, pero en células de carcinoma de colon, dicha expresión está sumamente disminuida o ausente (Gélébart et al., 2002). De manera adicional, Ait-Ghezali et al., encontraron que SERCA3 se expresa abundantemente en células epiteliales de los plexos coroideos, mientras que su expresión está disminuida en papilomas o ausente en carcinomas de esta región del cerebro (Ait-Ghezali et al., 2014).

Cuadro 4. Mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de SERCA2 y SERCA3 en cáncer

Enzima	Tipo de cáncer	Cambio en expresión	Mecanismo epigenético relacionado con su regulación	Referencia
SERCA2	Cáncer oral: líneas celulares y tejidos de pacientes	↓	Metilación del promotor del gen	Endo et al., 2004
SERCA3	Cáncer gástrico y de colon: líneas celulares	↓	Acetilación de histonas en líneas celulares	Gélébart et al., 2002
	Cáncer de mama: tejidos de pacientes	↓	ND	Papp y Brouland, 2011
	Cáncer de pulmón: líneas celulares y tejidos de pacientes	↓	Acetilación de histonas en líneas celulares	Arbabian et al., 2013
	Cáncer de cerebro (plexos coroideos): líneas celulares y tejidos de pacientes	↓	ND	Ait-Ghezali et al., 2014

ND: No determinado

Por otro lado, se reportó que la expresión de SERCA3 está considerablemente disminuida en lesiones epiteliales no-malignas tempranas de mama y permanece disminuida en carcinoma lobular, en comparación con células epiteliales que conforman los acinos de la mama y que expresan SERCA3 de forma abundante. Lo mismo ocurre con las lesiones benignas del epitelio ductal, así como en carcinomas ductales, donde la expresión de SERCA3 está disminuida en comparación con epitelio ductal normal que expresan cantidades significativas de SERCA3. La disminución en la expresión de SERCA3 en lesiones de la mama no necesariamente precancerosas, indica que la recaptura apropiada de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico está involucrada con el establecimiento y mantenimiento del fenotipo acinar completamente diferenciado (Papp y Brouland, 2011).

Con el fin de comprender los mecanismos que regulan la expresión de SERCA3, Gélébart et al, trataron líneas celulares de cáncer de colon y cáncer gástrico con inhibidores de desacetilasas de histonas, encontrando que estos inhibidores inducen la expresión de SERCA3 en estas células (Gélébart et al., 2002). De manera similar, Arbabian et al., demostraron que los inhibidores de desacetilasas de histonas inducen la expresión de SERCA3 en líneas celulares de cáncer de pulmón (Arbabian et al., 2013). Esto sugiere que la acetilación de las histonas es un mecanismo que regula la expresión de SERCA3 en diferentes células de tipo epitelial.

4. Mecanismos epigenéticos que regulan la expresión génica

El inicio de la transcripción requiere que la maquinaria molecular responsable (ARN polimerasa y factores de transcripción) accedan físicamente a la hebra de ADN que se transcribirá. En ocasiones el ADN se puede transcribir cuando se encuentra bajo la forma de complejos con las histonas (nucleosomas) pero también puede ser necesario que estos se desensamblen para permitir el acceso a la maquinaria de transcripción. La accesibilidad del ADN está estrechamente relacionada con la condensación de la cromatina y con las modificaciones como la metilación de citosinas en el ADN o modificaciones de las histonas asociadas al ADN, tales como: acetilación, metilación, fosforilación, entre otros. Estas modificaciones, que no afectan la secuencia del ADN,

se denominan modificaciones epigenéticas y constituyen un mecanismo que permite incrementar o disminuir la expresión de un gen de acuerdo con los requerimientos de sus productos, sin que esto afecte la secuencia de nucleótidos del gen en cuestión (Watson et al., 2004).

4.1 Acetilación/desacetilación de las histonas

La acetilación de las histonas ocurre en residuos de lisinas que se encuentran hacia el amino terminal y se lleva a cabo por las enzimas acetiltransferasas de histonas o acetilasas de histonas (HACs). A pH fisiológico, los grupos de lisina del extremo amino terminal de las histonas están protonados, esto les confiere una fuerte carga positiva, base de su interacción con el ADN de carga negativa. La acetilación neutraliza la carga positiva de las lisinas, lo que cambia la interacción ADN-histona y altera la estructura de la cromatina, la relaja y facilita el acceso de factores de transcripción al ADN y como resultado activa la expresión de diversos genes (Watson et al., 2004) (Figura 4). Cuando las desacetilasas de histonas (HDACs) remueven los grupos acetilos de las histonas, las cargas positivas se restauran y el ADN vuelve a interactuar con los residuos de lisina de las histonas (Figura 4). La desacetilación de las histonas lleva a la represión de la transcripción, porque los factores de transcripción necesarios, factores regulatorios y el complejo de la ARN polimerasa son incapaces de tener acceso al ADN (Kusdistani y Grunstein, 2003). Hasta la fecha se han reportado 18 desacetilasas de histonas para humano, las cuales se clasifican en 4 clases con base en la estructura de sus dominios. La clase I incluye las HDAC1, 2, 3 y 8. En la clase II se encuentran las desacetilasas HDAC4, 5, 7 y 9. Las HDAC6 y HDAC10 poseen dos sitios catalíticos por lo cual se incluyen en la clase IIa, mientras que la HDAC11 en su centro catalítico tiene residuos conservados que se comparten con las desacetilasas clase I y II y algunas veces se le ubica en la clase IV (HDAC Inhibitors Base, 2015). La inhibición de las desacetilasas de histonas por la acción de ciertos hidroxamatos, ácidos alifáticos, péptidos cíclicos y benzamidas se asocia con la activación de la transcripción génica (Dokmanovic et al., 2007).

Desde hace varios años el NaB y la TSA han sido dos agentes esenciales para determinar el papel de la acetilación de las histonas en la estructura y función de la cromatina (Yoshida et al., 1990; Davie, 2003). En años recientes se ha implementado el uso de análogos de estos inhibidores de HDACs como una estrategia para terapias epigenéticas contra el cáncer de mama y otros tipos de cáncer (Vigushin et al., 2001). En octubre del 2006 la FDA aprobó el uso de Vorionostat, un inhibidor estructuralmente similar a TSA para el tratamiento de ciertos casos raros de cáncer cutáneo, como es el caso de los linfomas cutáneos de células T. Actualmente, al menos 12 inhibidores de HDACs se encuentran en fase clínica y se están probando solos o en combinación con la quimio y radio terapias en pacientes con tumores sólidos, incluyendo los tumores de mama (HDAC Inhibitors Base, 2015).

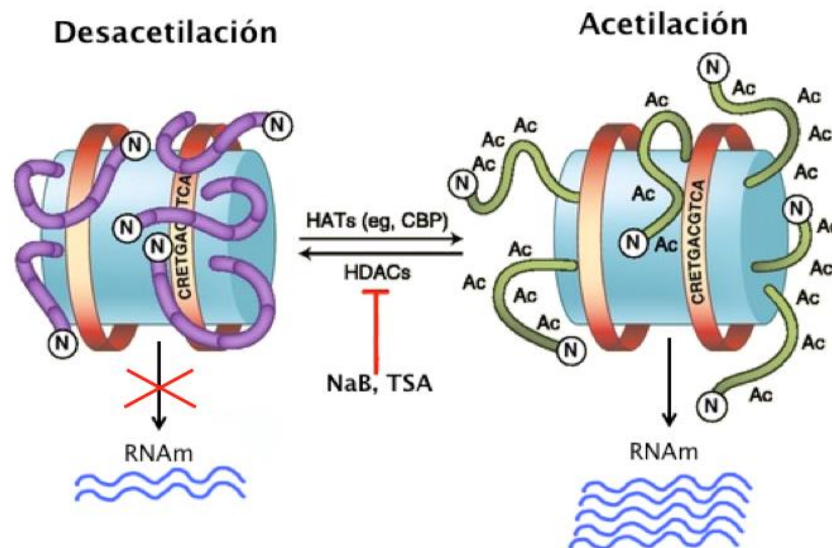


Figura 4. Las desacetilasas de histonas y las acetiltransferasas de histonas tienen actividades opuestas. Los nucleosomas que se muestran como barriles azules, se componen de octámeros de histonas que se unen al ADN. La región del amino terminal de las histonas contiene residuos de lisina que interactúan directamente con el ADN. En un estado transcripcional apagado (nucleosoma de la izquierda), la carga positiva del residuo de lisina interactúa con la carga negativa de los grupos fosfato del ADN, mientras que en un estado transcripcionalmente activo (nucleosoma de la derecha) se modifican los residuos de lisina por adición de grupos acetilo que neutralizan su carga positiva. El estado acetilado se asocia con la activación transcripcional. La actividad opuesta se lleva a cabo por la acción de las HDAC, que remueven los grupos acetilo de las histonas, correlacionando con el silenciamiento de la transcripción. Inhibidores de las HDAC como tricostatina A [TSA] y butirato de sodio [NaB] interactúan directamente con las HDAC, evitando que estas enzimas remuevan los grupos acetilo de los residuos de lisina, favoreciendo de esta manera un estado hiperacetilado y transcripcionalmente activo (Modificado de McQuown y Wood, 2010).

El NaB es un ácido graso de cadena corta, producido por la fermentación de las fibras de la dieta, lo que sugiere que el NaB puede estar inhibiendo el desarrollo del cáncer de colon. El NaB inhibe a la mayoría de las HDACs, excepto a las de clase III y de la clase II a las HDAC6 y 10 (Davie, 2003).

La TSA es un hidroxamato producido por las actinobacterias *Streptomyces*, el cual inhibe a las HDACs clase I y clase II, excepto las HDAC 5 y 10. Se ha demostrado que este inhibidor no tiene efecto sobre la actividad de otras enzimas, como proteínas cinasas, fosfatasas, topoisomerasas y la proteína calmodulina (Yoshida et al., 1990). Al ser un inhibidor específico de las HDACs es de gran utilidad para analizar el papel de la acetilación de las histonas. La TSA manifiesta una actividad antitumoral potente, dependiente de la dosis, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Mientras que la TSA se une al átomo de Zn^{2+} de las desacetilasas de histonas bloqueando su actividad, el NaB interactúa con estas enzimas de una forma no específica (Cousens et al., 1979). Se ha reportado que la acción del NaB se lleva a cabo principalmente a través de la unión de los factores de transcripción Sp1/Sp3 en los sitios denominados elementos de respuesta a NaB. Los promotores de los genes que responden a NaB poseen varios de estos sitios. La estimulación de la expresión de la proteína p21 por efecto del NaB es el ejemplo más conocido de este mecanismo, lo que explica que el NaB induce el arresto del ciclo celular. Se sabe que la unión de una proteína similar a Sp1 en el promotor del gen que codifica para la proteína p21 favorece el reclutamiento de las proteínas p300 y una HAT que actúa como coactivador, lo que favorece la acetilación de las histonas en la región del promotor de interés, dando como resultado la relajación de la cromatina y la inducción de la expresión del gen p21a. El incremento de los niveles de esta proteína por efecto del NaB, tiene como resultado el arresto de la célula y por ende la disminución de la proliferación celular (Davie, 2003).

4.2 La metilación del ADN

En los humanos y otros mamíferos, la metilación del ADN es una modificación covalente del ADN catalizada por las enzimas ADN metiltransferasas o DNMTs

(DNMT1, DNMT3A y DNMT3B). Esta modificación ocurre típicamente en una citosina que precede a una guanina en los di nucleótidos CpG. Se ha demostrado recientemente que la función opuesta la llevan a cabo varias enzimas de forma cooperativa, tales como: TET, AID y TDG (Kohli y Zhang, 2013). Generalmente en condiciones normales, las regiones con alto contenido en CpG que forman las llamadas islas de CpG, se encuentran desmetiladas. Mientras que la metilación de dichas secuencias, algunas de las cuales se encuentran en las regiones promotoras de varios genes, se asocia con represión de la expresión génica (Kohli y Zhang, 2013) (Figura 5).

Para demostrar el papel de la metilación en la expresión génica se han utilizado principalmente dos moléculas, la 5-azacitidina y la 5-aza-2'-deoxicitidina (5-aza-2'-dC), conocida también como Decitabine, las cuales son análogos de la citosina, la diferencia radica en que la 5-aza se incorpora al ADN y ARN, y la 5-aza-2'-dC se une únicamente al ADN durante el proceso de duplicación, pero a diferencia de la citosina no se metila (Christman, 2002) (Figura 6.). La 5-aza-2'-dC ha mostrado tener un efecto en la expresión del receptor de estrógenos de tipo α (RE- α) en células de cáncer de mama RE- α negativas, lo cual permite los efectos de tamoxifen, un antagonista del 17 β -estradiol, que al unirse al RE- α detiene la proliferación celular. Los tipos de cáncer de mama que son RE- α negativos han mostrado ser clínicamente más agresivos y de peor pronóstico, debido a la carencia de las terapias hormonales dirigidas a este receptor (Li et al., 2010).

Se ha reportado que la metilación del ADN favorece la desacetilación de las histonas, a través del reclutamiento de desacetilasas de histonas, que remueven grupos acetilo unidos a los residuos de lisinas en las histonas, debido a la unión de proteínas al ADN metilado (MeCP2), promoviendo el empaquetamiento de la cromatina y en consecuencia el bloqueo de la transcripción. Se ha visto que los genes que se transcriben activamente en ciertos tejidos poseen islas CpG sin metilar o islas hipometiladas, mientras que en los tejidos donde el gen no se expresa están metilados o hipermetilados (Weinberg, 2007).

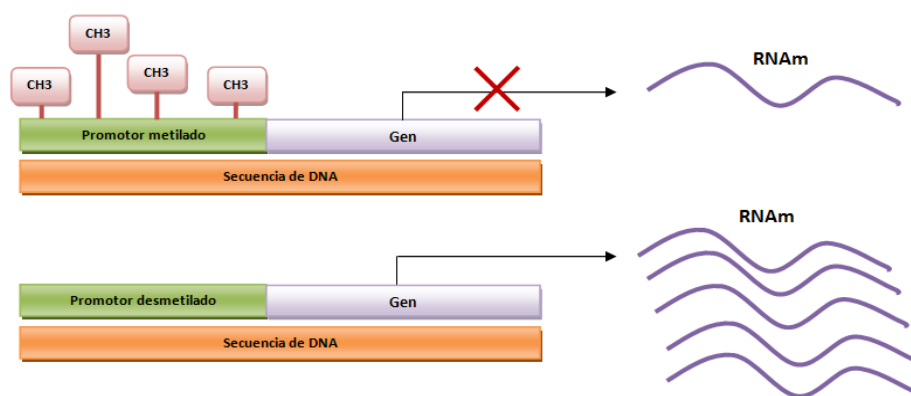


Figura 5. La metilación del ADN es un mecanismo epigenético que regula la transcripción. La adición química de un grupo metilo en las citosinas que preceden a una guanina en la región promotora de diversos genes es un evento relacionado con el silenciamiento de la expresión de un gen.

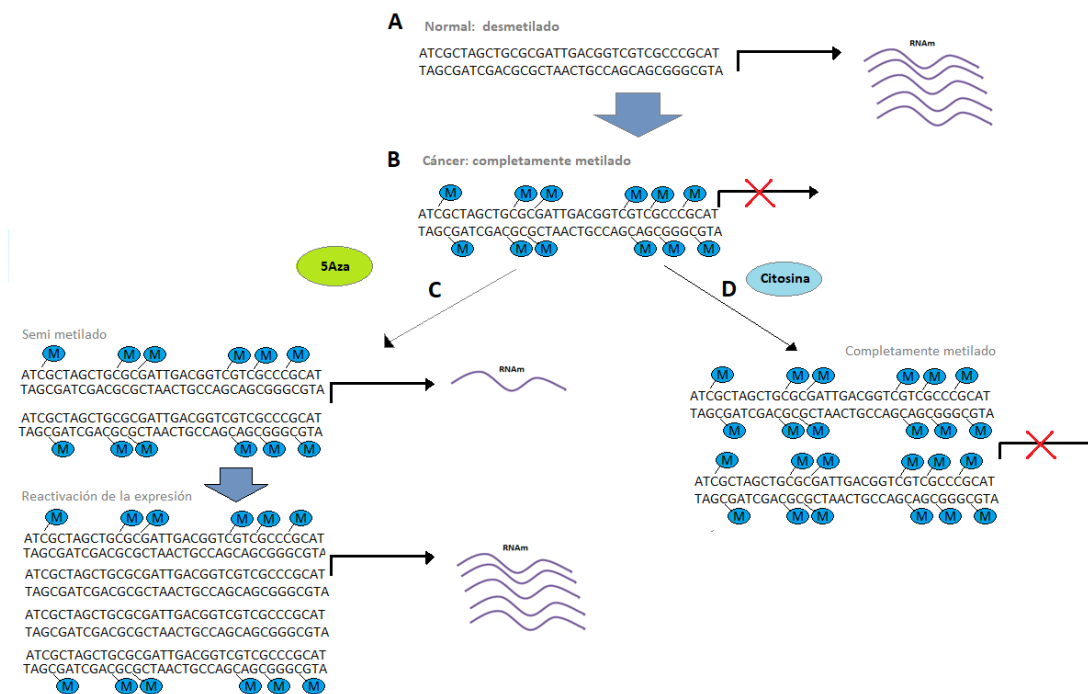


Figura 6. Modelo que esquematiza el efecto de 5-aza-2'dC en la expresión de un gen hipotético de interés.

A. Se representa una secuencia del promotor de un gen hipotético de interés en una célula normal que se encuentra desmetilado y su expresión activa, B. En una célula tumoral, este promotor se encuentra metilado y su expresión suprimida. C. Al tratar la célula cancerosa con el análogo de la citosina la 5-aza-2'dC se pierde progresivamente, en cada duplicación, la marca de metilación en el promotor del gen de interés, este cambio activa su transcripción. D. En ausencia de la 5-aza-2'dC, durante el proceso de duplicación se intercala la citosina y la hebra hija de ADN nuevamente se metila, la marca de metilación mantiene apagada la expresión del gen de interés. Círculos azules, grupos metilo. Modificado de Isaa JP. 2007.

4.3 Interpretación de las modificaciones epigenéticas

Con el descubrimiento de la primera acetil transferasa de histonas en 1996, los modelos epigenéticos culminaron con la hipótesis del código de las histonas. Esta hipótesis predice que la modificación covalente en aminoácidos específicos del amino terminal de las histonas puede conducir a un nivel de organización distinto de la cromatina, de heterocromatina a eucromatina (Cuadro 5) (Lachner y Jenuwein, 2002). Esta hipótesis se apoya en la identificación y caracterización de otras enzimas que modifican a las histonas, tales como: la cinasa de la histona H3, la metiltransferasa de histonas de arginina y lisina (HMTasas) (Lachner y Jenuwein, 2002). Una de las cuales, la MLL4 permite la metilación de H3K4 (Nightingale et al., 2007).

Cuadro 5. Modificaciones epigenéticas y estados de la cromatina		
<i>Modificación epigenética</i>	<i>Eucromatina (expresión activa)</i>	<i>Heterocromatina (expresión silenciada o apagada)</i>
Metilación del ADN	Hipometilación	Hipermetilación
Acetilación de las histonas	Hiperacetilación de las histonas H3 y H4	Hipoacetilación de las histonas H3 y H4
Metilación de las histonas	H3K4me2, H3K4me3 y H3K9me1.	H3K27me2, H3K27me3, H3K9me2, H3K9me3

(Adaptado de Lachner y Jenuwein, 2002)

JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas se ha demostrado que los HDACi revierten las modificaciones epigenéticas específicas que llevan al silenciamiento de genes importantes en la reparación del ADN, apoptosis y el control del ciclo celular que se han reportado alterados en varios tipos de cáncer, incluyendo: p21, p18, p19, IGFs, TGF- β , RE (Tsubaki et al., 2001; Malinen et al., 2008; Ammanamachi y Brattain, 2004).

Se ha reportado que el tratamiento de las células MDA-MB-231 con TSA o SAHA, solo o en combinación con 5-aza-2'dC, restaura la expresión del RE; de tal forma que los tumores que no expresan este receptor podrían incrementar su respuesta a la terapia con Tamoxifen (Zhou et al., 2007; Jang et al., 2004; Sharma et al., 2006; Li et al., 2010).

También se ha demostrado que la expresión de las enzimas SERCA2 o SERCA3 está disminuida o ausente en varios tipos de cáncer, comparado con células normales. Los HDACi reactivan la expresión de SERCA3 en diversos tipos de cáncer a través de la acetilación de las histonas, aunque se desconocen los cambios específicos en la cromatina. Por otro lado, se ha demostrado que la 5-aza-2'dC reactiva la expresión de SERCA2 en células de cáncer oral. No obstante, de estos estudios, la expresión de SERCA2b y SERCA3a no se ha estudiado en líneas celulares de cáncer de mama tratadas con HDACi o inhibidores de ADN metiltransferasas.

El cáncer de mama constituye una prioridad de salud en México, es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres (GLOBOCAN, 2018). Por lo que se requieren más estudios para comprender el mecanismo molecular de estos inhibidores con el fin de desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de cáncer de mama.

Por lo anterior, se plantearon las siguientes preguntas de investigación:

¿La expresión de SERCA2b y SERCA3a se estimulará en las células MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama tratadas con NaB, TSA o 5-Aza-2'dC?

¿Cuáles son las modificaciones específicas en las histonas que estimulan la expresión de SERCA3a, en respuesta a los HDACi?

HIPÓTESIS

La expresión de SERCA2b y SERCA3a se estimula en células MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama tratadas con NaB, TSA o la 5-Aza-2'dC a través de la remodelación de la cromatina e hipometilación del ADN.

OBJETIVOS

General:

Determinar la expresión de SERCA2b y SERCA3a en células MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama tratadas con NaB, TSA o con 5-aza-2'dC; así como los cambios en la cromatina inducidos por estos inhibidores.

Particulares:

1. Analizar la expresión de SERCA2b y SERCA3a en células MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama tratadas con NaB o TSA, por medio de PCR en tiempo real.
2. Analizar, por medio de inmunoprecipitación de la cromatina, cambios en modificaciones de la histona H3 en células MDA-MB-231 tratadas con NaB o TSA.
3. Determinar el efecto de 5-aza-2'dC en la expresión de SERCA2b y SERCA3a en células MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama, por medio de PCR en tiempo real.

METODOLOGÍA

Cultivos celulares y tratamientos. Las líneas celulares MCF-7 (RE-positiva) y MDA-MB-231 (RE-negativa) de cáncer de mama, proporcionadas por la Dr. Nora Gutiérrez Nájera (INMEGEN, México), se cultivaron en medio DMEM (por Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma-Aldrich, EUA) con alta glucosa [4,500 mg/L], suplementado con suero fetal bovino al 10%, kanamicina 70 mg/L (Gibco BRL), penicilina-estreptomicina 0.5% (Gibco BRL) y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂.

Para estudiar el papel de las HDACs en la regulación de la transcripción de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*, las células se sembraron en cajas de 6 pozos, cuando alcanzaron 70-80% de confluencia, determinado por examinación con un microscopio (2 a 3 días posteriores al día de siembra), se trataron con TSA (50, 75 o 100 nM) (Sigma-Aldrich, EUA, cat. T8552) o NaB (1, 2 o 3 mM) (Fluka, Cat. 19364). Por su parte, para estudiar el papel de la metilación del promotor en la regulación de la transcripción de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*, las células se trataron con 5-aza-2-deoxicitidina (1, 2 o 5 µM) (Sigma-Aldrich, Cat. A3656). Las células se incubaron durante 72 h, el medio se reemplazó cada 24 h con medio fresco con los inhibidores respectivos.

Purificación de ARN total. Concluido el tratamiento con NaB, TSA o 5'-Aza-2dC, se removió el medio y las células se lavaron dos veces con PBS 1X, se adicionó 1 mL de Trizol (Invitrogen, Thermo Scientific, EUA) a cada pozo. Las placas se dejaron en agitación por 5-10 min y se congelaron a -70°C por 10-20 min. Trascorrido ese tiempo se descongelaron y se pusieron otros 5 min en agitación. Se colectó el material de cada pozo y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril y se adicionaron 200 µL de cloroformo (Sigma-Aldrich, EUA). Los tubos se agitaron vigorosamente con un vortex, se dejaron reposar 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron por 15 min/12,000 xg a 4°C, para separar el ARN del material celular, ADN y proteínas. Se colectó la fase acuosa y se transfirió a un tubo eppendorf, se adicionaron 500 µL de isopropanol. Después de agitar, los tubos se dejaron reposar 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron 10 min/12,000 xg a 4°C para precipitar el ARN. El sobrenadante se decantó y la pastilla resultante se lavó con 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó 5

min/12,000 xg a 4°C. El sobrenadante se decantó y la pastilla se dejó secar durante 30 min a temperatura ambiente y se resuspendió en agua libre de ARNasas.

La concentración y pureza del ARN se determinó a 260/280 nm con un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, EUA). La integridad del ARN se determinó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1%, en presencia de bromuro de etidio [0.5 µg/mL]. Se cargaron 3 µg de ARN total de cada una de las muestras por carril y se separaron a 80 volts por 1 h en buffer TBE 1x (Tris pH 7.6 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM), y se capturó la imagen para visualizar el ARN.

Reacciones de transcripción reversa y PCR de punto final. Las reacciones de transcripción reversa (RT) se realizaron de la siguiente manera: en un tubo se mezclaron, 1.5 µg de ARN total, 1 µL de dNTPs 10 mM, 75 nmoles de hexámeros al azar, agua libre de ARNasas para un volumen final de 18 µL. Los tubos se incubaron a 65°C por 5 min y se enfriaron inmediatamente en hielo. Posteriormente se agregó 7.5 µL de buffer 5x, 3 µL de DTT 100 mM, 1µL de inhibidor de ARNasas y 200U de transcriptasa reversa M-MLV y agua libre de ARNasas para un volumen final de 30 µL. El contenido del tubo se mezcló y se incubó a 37°C durante 50 min y a 70°C durante 15 min de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Invitrogen, Thermo Scientific, EUA). Después las muestras se dejaron enfriar y se adicionó 1 µL (2U) de ARNasa H, se incubaron a 37°C por 20 min.

Las reacciones de PCR convencional o de punto final se realizaron con 1 µL de ADNc de cada una de las muestras (equivalente a 50 ng de ARN inicial), mezcla de PCR que contiene: MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 200 µM, Taq polimerasa (1 U), agua y 1 µL de primers (para una concentración final de 200 nM). Los primers específicos empleados para amplificar las isoformas SERCA2a, 2b, 2c, SERCA3a, 3b, 3c, GAPDH y β-actina se muestran en el cuadro 6. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C durante 3 min, 30 ciclos de 95°C por 30 seg, 60°C por 30seg, 72°C por 30 seg. Los productos amplificados se analizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2% (Gélébart et al., 2002).

PCR en tiempo real. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron por triplicado, para lo cual se empleó 1 µL de ADNc de cada una de las muestras (equivalente a 50 ng de ARN inicial), 6µL de mezcla de PCR 2x, que contiene Taq polimerasa, dNTPs, buffer con Mg²⁺ y SYBRGreen (Invitrogen, Thermo Scientific), después se adicionó 1 µL de la mezcla de oligonucleótidos específicos para cada una de las isoformas de SERCA y para pan-SERCA3 (Cuadro 6) y agua para un volumen final de 12 µL. También se incluyeron reacciones por triplicado para cada muestra con primers para β-actina o GAPDH, que sirvieron como control interno para normalizar los datos. Las condiciones de amplificación fueron 50°C durante 2 min, 95°C durante 8.5 min, 40 ciclos de 95°C por 30 seg, 60°C por 1 min, en un termociclador 7500 (Applied Biosystems, EUA). Los datos de PCR en tiempo real se analizaron por medio del programa LinReg, los valores del control interno se emplearon para normalizar los datos y calcular los niveles de expresión de los ARNm para SERCA2 y SERCA3 de acuerdo con Pfaffl, 2001.

Cuadro 6. Primers empleados para qRT-PCR y análisis de los promotores de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*

Primers	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')	Producto de PCR
SERCA2a	CGAACCCTTGCCACTCATCTTC	CGGTTACTCCAGTATTGCAGGTTC	151 bp
SERCA2b	CGAACCCTTGCCACTCATCTTC	TGCCGAGAACGAGCAGGATTTG	181 bp
SERCA2c	CGAACCCTTGCCACTCATCTTC	TCCAGTATTGACAGCAGAGCAGG	205 bp
SERCA3a	GAGTCACGCTTCCCCACCACC *	GGCTATTTCTTCGTGCATGTGGTTC *	319 bp
SERCA3b	GAGTCACGCTTCCCCACCACC *	GGC TCA TTT CTT CCG GTG TGG TC *	407 bp
SERCA3c	GAGTCACGCTTCCCCACCACC *	GGCTATTTCTTCAAAGAGGCCAAC *	420 bp
Pan-SERCA3	CAGGGGACATTGTAGAAGTGGC	TGGTCACGGACACAGATTCACC	125pb
GAPDH	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	TGAGGAGGGGAGATTCAGTG	399 bp
β-Actin	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	200 bp
ATP2A2p-A	CCTCGATCCGGGTTCTA	GGCTGCTCTAATAGCATTATCG	213 bp
ATP2A3p-A	GCGGTCTCAGTTTCCCCTCTGC	TGTCCGTGCTGGGACCTTACCC	174 bp

* Acorde a secuencias reportadas por Gélébart et al., 2002.

Reacciones de inmunoprecipitación de la cromatina *ChIP*. Las células MDA-MB-231 se crecieron en cajas de 100 mm y se trataron con NaB 2 mM, TSA 100 nM por 72 h (tres cajas por cada condición), posteriormente se adicionó paraformaldehído a una

concentración final de 1% (540 μ L del stock 18.5% por cada 10 mL de medio de cultivo) para entrecruzar la cromatina. Se incubó por 10 min a temperatura ambiente en agitación suave, después se adicionó glicina a una concentración final de 0.125 M, incubando en agitación suave durante 5 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS 1x frío, se rasparon y colectaron en tubos, los cuales se centrifugaron a 2500 xg a 4°C y las pastillas se resuspendieron en buffer de lisis (Tris-HCl pH 8.0 50 mM, SDS 1%, EDTA 10 mM, e inhibidor de proteasas Sigma-Aldrich, EUA).

Los lisados celulares se sonicaron con un ultrasonificador de punta (Branson 250), se emplearon 12 pulsos de 10 segundos en un baño de hielo-agua, con pausas de 1 min entre cada pulso para evitar sobrecalentamiento de la muestra. El material sonicado se centrifugó a 16,000xg por 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se tomaron alícuotas que se separaron en geles de agarosa al 1% para corroborar el tamaño de los fragmentos de cromatina (400 a 1000 pb). El sobrenadante se transfirió en alícuotas equivalentes a 50 μ g de ADN (para cada inmunoprecipitación), las cuales se incubaron con 20 μ l de proteína G-agarosa (Santa Cruz Biotechnology, EUA) por 1 h/ 4°C en agitación oscilatoria para pre-aclarar el lisado. Se centrifugó a 1,500xg/1min/4°C, se colectó el sobrenadante y se tomó una alícuota de la cromatina total (Input), el resto se transfirió a un tubo eppendorf y se adicionaron 2 μ g de cada uno de los anticuerpos dirigidos contra las diferentes modificaciones de la histona H3 (H3K9-Acetil, H3K9-trimetil, H3K4-metil, Abcam, UK) y se incubó toda la noche a 4°C en agitación oscilatoria. Al día siguiente se agregaron 20 μ L de proteína G-agarosa y se incubó 1 h/ 4°C en agitación oscilatoria. Posteriormente se colectaron los complejos (anticuerpo/antígeno/ADN) por centrifugación 1,000xg/1 min y se descartó el sobrenadante. Los complejos se lavaron de manera secuencial con 1 mL de los siguientes buffers: buffer de lavado bajo en sales (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, SDS 0.1%, Triton X-100 1%), alto en sales (similar al bajo en sales, excepto que el NaCl fue 500 mM), buffer LiCl (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, LiCl 0.25 M, EDTA 1 mM, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 1%) y dos veces con buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8), incubando 5 min en agitación oscilatoria entre cada lavado. Posteriormente se adicionaron 100 μ L de buffer de elución (NaHCO₃ 0.1 M, SDS 1%) para resuspender cada inmunoprecipitado, se incubaron 15 min a

temperatura ambiente y se centrifugaron a 2,000xg/1 min, colectando el sobrenadante en otro tubo y se adicionaron por segunda vez 100 µL de buffer de elución. Por su parte, al input se le agregó 200 µL de buffer de elución. A cada tubo se le adicionaron 1 µL de ARNasa A y se incubó por 30 min/37°C y posteriormente se adicionaron 13 µL de la siguiente mezcla: 8 µL de Tris-HCl 1 M, 4 µL EDTA 0.5M y 1µL proteinasa K y se incubó toda la noche/55°C. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 8 µL de NaCl 5M y se incubó a 65°C/6 h para revertir el entrecruzamiento. Finalmente se realizaron extracciones con fenol, fenol-cloroformo, cloroformo-alcohol isoamílico para purificar los fragmentos de ADN. El ADN inmunoprecipitado en cada condición y el input se resuspendieron en 20 µL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA1mM, pH 8), el cual se empleó para la PCR de punto final y la PCR en tiempo real.

La PCR de punto final se realizó con 1 µL del inmunoprecipitado de las muestras o del input, 10 µL de la mezcla de reacción de PCR 2x (Promega, Madison, WI), 5 pmoles de cada primer para los promotores de los genes *ATP2A2* o *ATP2A3* (*ATP2A2p* o *ATP2A3p*, Cuadro 6), 1 µL de DMSO, agua cuanto baste para 20 µL; de acuerdo al siguiente programa: 95° C durante 3 min, 30 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C, 1 min a 72°C, y un paso de extensión final de 72°C 7 min. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 2% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio en un fotodocumentador XR 170-8170 (BioRad, EUA).

La PCR en tiempo real del ChiP se realizó con 1 µL de ADN inmunoprecipitado o de 1 µL de la dilución 1:100 del input, adicionando DMSO 5%; con las condiciones descritas anteriormente para tiempo real. Los datos se normalizaron como el porciento de la señal del input.

Análisis estadístico

Los datos de PCR en tiempo real se sometieron a la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si se ajustaban a una distribución normal. Debido a que los datos no cumplieron con el principio de normalidad, se realizó el análisis estadístico para datos no paramétricos con la prueba de Kruskal-Wallis, para comparar 4 grupos

independientes; utilizando el programa Statistica7 y el programa SigmaPlot para la elaboración de las gráficas. Un valor de $p < 0.01$ se consideró como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Se purificó ARN total de las células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con NaB o TSA durante 72 h, cuya integridad se corroboró por medio de electroforesis en geles de agarosa (Figura 7). Una vez confirmada la calidad de cada una de las muestras de ARN, como lo muestran las bandas de ARNr 28 y 18 S, este material se utilizó para la síntesis de ADNc, el cual se almacenó a -20° C hasta su uso posterior.

Parte del ADNc se empleó para probar los “primers” para amplificar las isoformas SERCA2a, 2b y 2c, SERCA3a, 3b y 3c, así como para GAPDH y β -actina. Todos los “primers” generaron el producto de PCR esperados (Figura 8).

Expresión de SERCA2b y SERCA3a en células MCF-7 tratadas con diferentes concentraciones de NaB o TSA

El tratamiento de las células MCF-7 de cáncer de mama con NaB durante 72 h estimuló la expresión de SERCA3a, con cambios significativos por arriba del control en células tratadas con NaB 2 y 3 mM (3.95 ± 0.93 y 5.1 ± 0.069 veces por arriba de las células control, respectivamente; $p < 0.01$) (Figura 9). Además, los primers que amplifican el ARNm de todas las isoformas de SERCA3 (pan-SERCA3) mostraron diferencias significativas en células MCF-7 tratadas con NaB 3 mM, comparadas con las células control, 6.92 ± 1.4 , $P < 0.01$; pero no se encontró diferencia entre el ARNm de SERCA3a y pan-SERCA3 (5.1 ± 0.069 vs 6.92 ± 1.4 , $P = 0.07$). Tampoco se observaron cambios en la expresión de la isoforma SERCA2b en ninguna de las concentraciones de NaB probadas (Figura 9).

Por otro lado, el tratamiento de células MCF-7 con TSA, un inhibidor de las HDAC clase I y II, a la concentración de 100 nM estimuló la expresión de SERCA3a (3.96 ± 0.022

veces por arriba de las células control; $p < 0.01$) (Figura 9). Sin embargo, no se encontró diferencia entre la expresión de SERCA3a y pan-SERCA3 (3.96 ± 0.301 vs 4.397 ± 0.584 ; $P = 0.45$). Para la isoforma SERCA2b no se observaron cambios en ninguna de las concentraciones de TSA probadas (Figura 9).

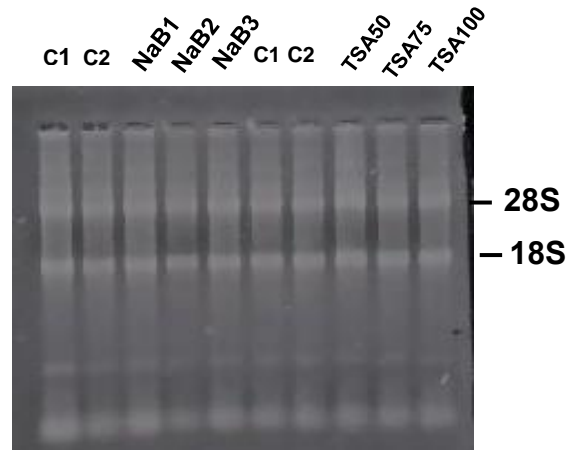


Figura 7. Integridad del ARN obtenido de líneas celulares de cáncer de mama sometidas a diversos tratamientos. C: Células control; NaB1, NaB2 y NaB3, Células tratadas con 1, 2 o 3 mM de NaB respectivamente; TSA50, TSA75 y TSA100, Células tratadas con 50, 75 y 100 nM de TSA respectivamente.

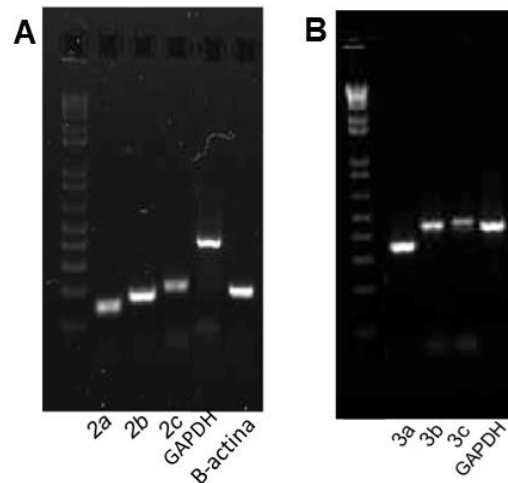


Figura 8. Gel de agarosa al 2% que muestra los productos de PCR amplificados a partir de ADNc de células MCF-7. A, productos de PCR obtenidos para SERCA2a (151 pb), 2b (181 pb) y 2c (205 pb), GAPDH (400 pb), β-actina (194 pb). B, productos de PCR obtenidos para SERCA3a (319 pb), SERCA3b (407 pb) y SERCA3c (420 pb).

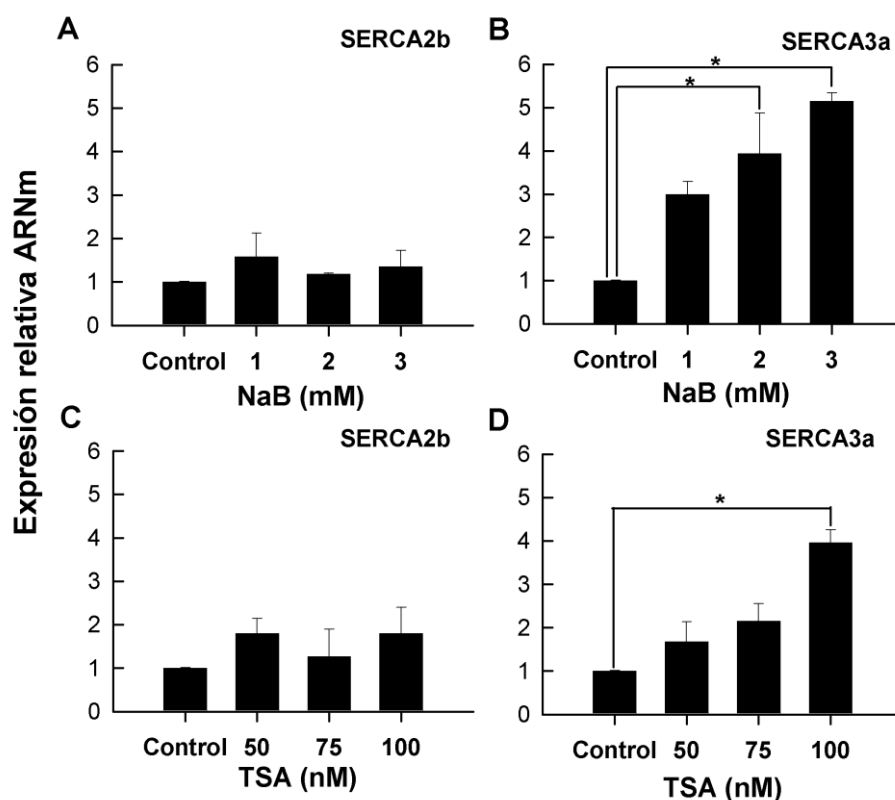


Figura 9. El butirato de sodio (NaB) y la Tricostatina A (TSA) estimulan la expresión de SERCA3a en células MCF-7. Las células MCF-7 se trataron con las concentraciones indicadas de NaB (A, B) o TSA (C, D) y la expresión de SERCA2b y SERCA3a se determinó por medio de RT-PCR. Existe una diferencia estadística significativa en la expresión de SERCA3a entre las células control y las células tratadas con 2 y 3 mM de NaB (B), así como entre las células control y las células tratadas con 100 nM de TSA (D). Los resultados se expresan como la media de tres experimentos independientes (cada uno realizado por triplicado) \pm SD. * $p < 0.01$

Expresión de SERCA2b y SERCA3a en células MDA-MB-231 tratadas con diferentes concentraciones de NaB o TSA

Los resultados muestran que NaB a 2 y 3 mM tiene un efecto marcado en la expresión de SERCA3a, observándose una estimulación de 7.56 ± 1.33 y 14.12 ± 3.15 veces por arriba del control, respectivamente, $p < 0.01$. La expresión del ARNm de pan-SERCA3 fue significativamente mayor en células tratadas con NaB 3 mM comparado con las células control (27.72 ± 1.12 , $P < 0.001$) y mayor que la expresión de SERCA3a (27.72 ± 1.12 vs 14.12 ± 3.15 ; $P < 0.01$). Mientras que la isoforma SERCA2b no mostró cambios significativos con estos tratamientos (Figura 10).

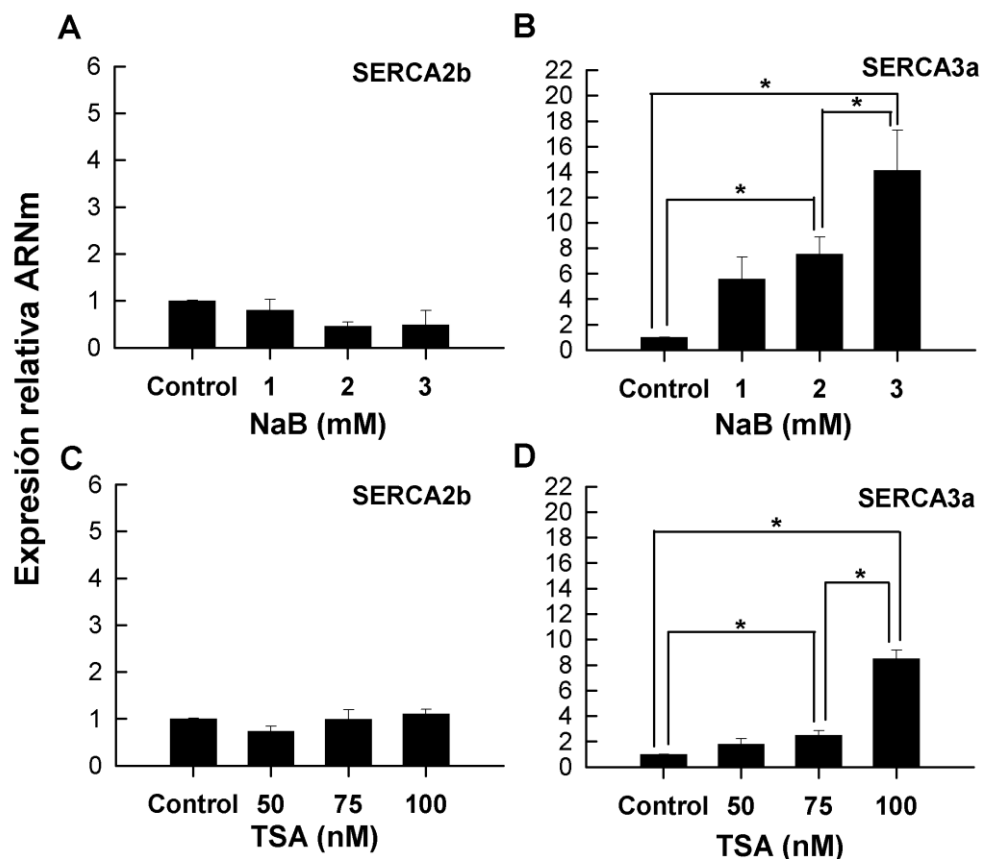


Figura 10. Efecto del butirato de sodio (NaB) y de la tricostatina A (TSA) en la expresión de las isoformas SERCA2b y SERCA3a en células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se trataron con las concentraciones indicadas de NaB (A, B) y TSA (C, D) y la expresión génica se determinó por medio de PCR tiempo real. La expresión de SERCA3a se incrementó considerablemente con NaB y TSA (B, D), observándose una estimulación significativa de su expresión a las concentraciones de 2 y 3 mM de NaB, 75 y 100 nM de TSA. Los resultados se expresan como la media de los triplicados de tres experimentos independientes \pm SD. * $p < 0.01$

El tratamiento de células MDA-MB-231 con TSA (75 y 100 nM) también estimuló la expresión de SERCA3a (2.5 ± 0.36 y 8.5 ± 0.68 veces por arriba de las células no tratadas, respectivamente, $p < 0.01$) (Figura 10). A su vez, la expresión de pan-SERCA3 con TSA 100 nM fue de 6.44 ± 1.17 por arriba de las células control ($p < 0.01$); sin embargo, no se encontró diferencia entre SERCA3a y pan-SERCA3 (8.5 ± 0.68 vs 6.44 ± 1.17 ; $p = 0.071$). Tampoco se observaron cambios significativos en la expresión de SERCA2b en células MDA-MB-231 tratadas con TSA (Figura 10).

El NaB y el TSA incrementan la acetilación de la H3K9, y el NaB disminuye la metilación de H3K9

Debido a que las células MDA-MB-231 mostraron un mayor incremento en la expresión de SERCA3a ante el tratamiento con NaB o TSA, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina con esta línea celular con la finalidad de analizar cambios en las modificaciones de las histonas. La Figura 11 muestra que el NaB y la TSA incrementan la acetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9Ac) en el promotor proximal del gen *ATP2A3*, sin afectar sustancialmente la metilación de la lisina 4 en H3 (H3K4me1); además, el NaB disminuye la trimetilación de H3K9me3 (Figura 11 A y B).

Por otro lado, el tratamiento con NaB y TSA no incrementó la acetilación de H3K9 en el promotor del gen *ATP2A2*, mientras que el NaB incrementó los niveles de H3K9me3 y H3K4me1 (Figura 11 C y D).

Expresión de SERCA2b y SERCA3a en células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con 5-aza-2'-dC

Para determinar si la metilación de las islas CpG de la región promotora de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* contribuye a la expresión del ARNm de SERCA2b y SERCA3a, las células MCF-7 y MDA-MB-231 se trataron con diferentes concentraciones de 5-aza-2'-dC, un inhibidor ADN-metiltransferasas, seguido del análisis por PCR en tiempo real. La expresión de los mensajeros para SERCA2b y SERCA3a no cambió ante ninguna de las concentraciones de 5-aza-2'-dC empleadas, en ambas líneas celulares (Figura 12).

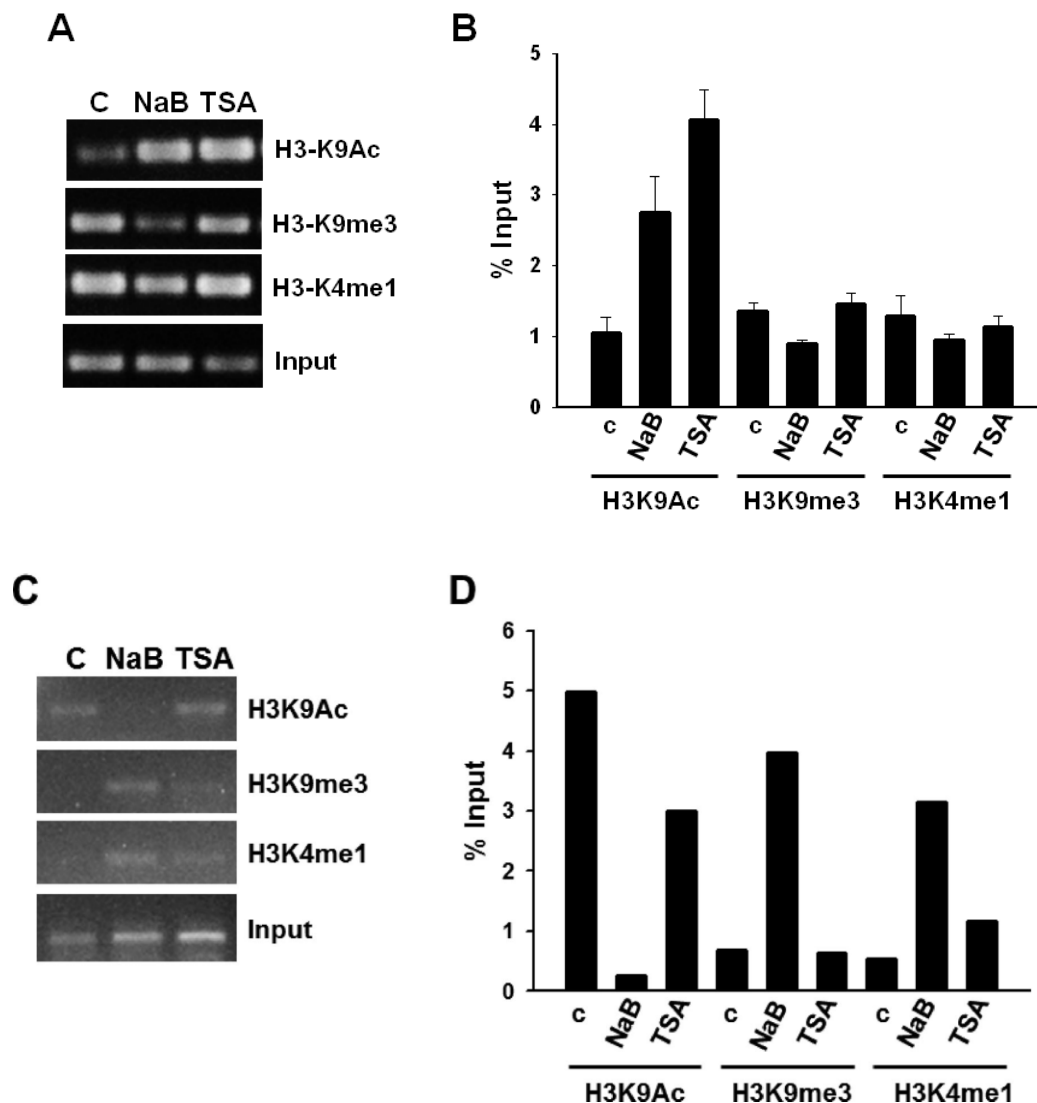


Figura 11. El ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina muestra que NaB y TSA promueven un incremento de la acetilación de H3 en el promotor del gen *ATP2A3*. La cromatina de las células MDA-MB-231 tratadas con NaB 2 mM o TSA 100 nM se inmunoprecipitó con los anticuerpos indicados para las modificaciones de H3. **A.** Gel de Agarosa (2%) que muestra los productos de amplificación por PCR de la región proximal del promotor del gen *ATP2A3* (-137 a +37). Se incluyeron muestras de ADN-cromatina antes de la inmunoprecipitación (input) para mostrar que se emplearon cantidades similares de ADN. **B.** Datos de PCR en tiempo real obtenidos con la cromatina inmunoprecipitada con los anticuerpos para las marcas de histonas mostradas en A, reportados como porcentaje de la cromatina inicial (input) (media \pm SD de triplicados). **C.** Gel de Agarosa (2%) que muestra los productos de amplificación de PCR de la región proximal del promotor del gen *ATP2A2* (-181 a +32). **D.** Análisis densitométrico del gel mostrado en C con el software Image J versión 1.36b <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. H3K9Ac, H3K9-Acetil; H3K9me3, H3K9-trimetil; H3K4me1, H3K4-momometil; C, control; NaB, butirato de sodio; TSA, tricostatina A. Datos representativos de dos experimentos independientes.

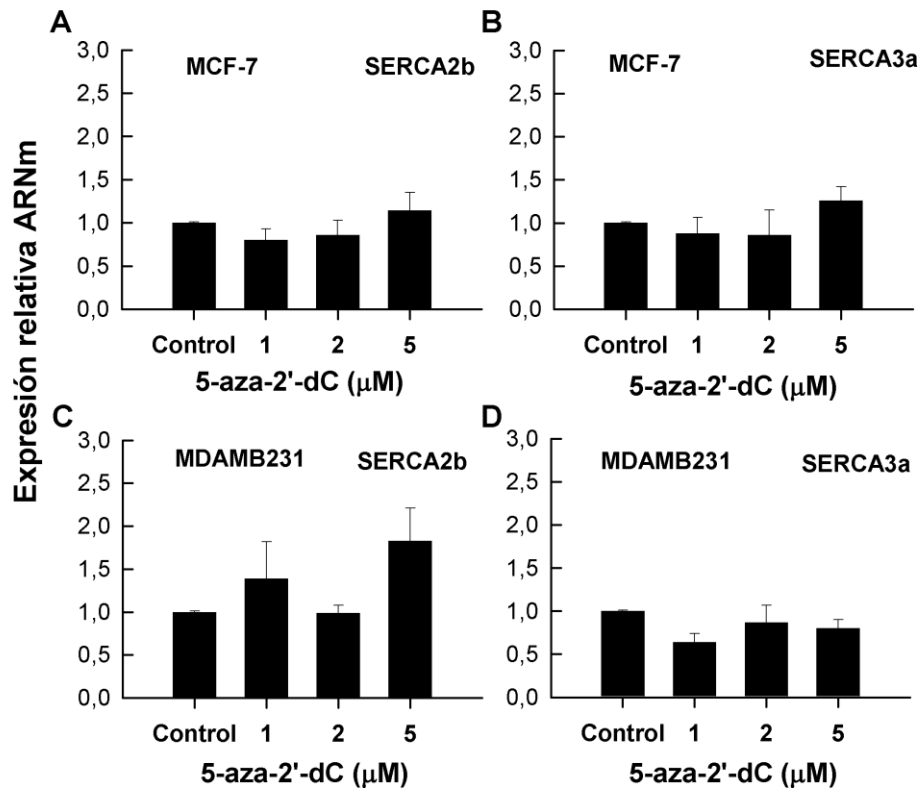


Figura 12. La 5-aza-2'-dC no estimula la expresión de SERCA2b y SERCA3a en células MCF-7 (A, B) y MDA-MB-231 (C, D). Las células se trataron con las concentraciones indicadas de 5-aza-2'-dC durante 72 h y la expresión de los ARNm se determinó por medio de PCR en tiempo real. No se encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión de SERCA2b y SERCA3a entre el control y las concentraciones de 1, 2, 5 μM de 5-aza-2'-dC en ambas líneas celulares. Los datos se expresan como el promedio de dos experimentos independientes realizados por triplicado ± SD.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este proyecto demuestran que la inhibición de las desacetilasas de histonas con butirato de sodio (NaB) o tricostatina A (TSA) promueve la expresión del ARNm para SERCA3 en células MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama en cultivo. Se observó una mayor expresión de SERCA3 en células MDA-MB-231 en comparación con las células MCF-7, así como un efecto mayor con NaB en comparación con TSA. Por su parte, los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina indican que el efecto del NaB y TSA es mediado a través del aumento en la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9). En paralelo, NaB provoca una disminución en la metilación de H3K9. De manera adicional, los resultados sugieren que los promotores de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* no están metilados en estas líneas celulares de cáncer de mama.

Efecto de los inhibidores de las desacetilasas de histonas NaB y TSA en la expresión de SERCA3a y SERCA2b

El tratamiento de las células MCF-7 y MDA-MB-231 con NaB o TSA indujo la expresión del ARN mensajero de SERCA3a de manera dependiente de la dosis, excepto el para las células MCF-7, donde TSA estimuló la expresión de esta isoforma a la concentración de 100 nM. Mientras que no se encontraron cambios significativos en la expresión del ARNm de SERCA2b bajo ningún tratamiento con NaB o TSA, lo que sugiere que la expresión de esta isoforma no está regulada por acetilación y desacetilación de las histonas.

Por otra parte, los resultados obtenidos con primers pan-SERCA3, que amplifican una región común de todas las isoformas de SERCA3 (SERCA3a-f), mostraron una expresión similar a SERCA3a en ambas líneas celulares tratadas con NaB y TSA. Esto sugiere que SERCA3a es la principal isoforma en estas líneas celulares. Solo se encontró diferencia en la expresión entre SERCA3a y pan-SERCA3 en las células MDA-MB-231 tratadas con NaB 3 mM, sugiriendo que bajo estas condiciones se expresan otras isoformas de SERCA3. Esto concuerda con reportes de la literatura que

establecen que los HDACi estimulan la expresión de SERCA3 en líneas celulares de cáncer de colon, gástrico y pulmón, mientras que SERCA2 no cambia o disminuye ligeramente (Gélébart, et al. 2002, Brouland, 2005, Arbabian et al, 2012). El hecho de que SERCA2b no presente cambios en su expresión, se podría deber a que esta enzima es constitutiva, mientras que la expresión de SERCA3a es inducible.

La mayor expresión de SERCA3 en las células MDA-MB-231, en comparación con células MCF-7, se podría deber a las características de esta línea y su fenotipo menos diferenciado. Las células MDA-MB-231 conforman el estrato epitelial-mesenquimal (mioepitelial), clasificadas con base en su expresión génica como tipo basal y bajo en claudinas con características de un epitelio menos diferenciado. En contraste, las células MCF-7 son de tipo ductal, clasificadas como tipo luminal A y conforman un epitelio totalmente diferenciado. Se ha sugerido que las células de tipo luminal requieren un sistema de recaptura de Ca^{2+} especializado. El estudio realizado por Papp y Brouland, 2011, muestra que la expresión de SERCA3 en tejido mamario normal es heterogénea, el mayor nivel se reportó en células luminales que conforman la estructura lobular y en un menor nivel en células luminales de los ductos; mientras que, en células mioepiteliales, la expresión de SERCA3 fue negativa. Sugiriendo que la expresión de SERCA3 se asocia al nivel de diferenciación de las células MDA-MB-231.

En el presente trabajo y en otros estudios, el NaB tuvo mayor efecto en la inducción de la expresión de SERCA3 en comparación con otros inhibidores de desacetilasas de histonas (Gelebart et al., 2002; Arbabian et al., 2012; Flores-Peredo et al., 2016). El mayor efecto en la expresión de SERCA3a con NaB, se puede deber a que está molécula tiene varios mecanismos de acción:

- a) Inhibe a las HDAC
- b) Funciona como donador de grupos acetilo
- c) Favorece el reclutamiento de factores de transcripción como Sp1, Sp3 y Klf-4

El NaB altera la expresión del 1-2% del genoma que contienen elementos de respuesta a butirato, como el gen p21 y el gen *ATP2A3*, a través de los sitios de unión con los

factores de transcripción Sp1/Sp3 y Klf-4 (Davie, 2003; Flores-Peredo et al., 2016). Flores-Peredo et al., sugieren que se puede desencadenar un efecto cooperativo en la unión de Sp/Klf-4 en múltiples sitios de la región proximal del gen *ATP2A3*, al demostrar que, al introducir una doble mutación de los sitios de unión para estos factores de transcripción, disminuye más del 90% la actividad transcripcional del gen *ATP2A3* en células KATO III tratadas con NaB o TSA. Actualmente se sugiere que este inhibidor favorece otras modificaciones en las histonas además de la hiperacetilación, aún faltan estudios que ayuden a esclarecer los mecanismos de acción del NaB.

Los HDACi activan otros genes (IGFs, p21, p18, p19, TGF- β , RE) en células de cáncer de mama

Existen reportes que indican que los HDACi revierten las modificaciones epigenéticas específicas que llevan al silenciamiento de genes importantes en la reparación del ADN, apoptosis y el control del ciclo celular, los cuales están alterados en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, tales como: los factores de crecimiento similar a insulina (IGFs) y el gen inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p21^(Waf1/Cip1), cuya expresión se incrementa en células de cáncer de mama MCF-7 y Hs578T en presencia de NaB (Tsubaki et al., 2001). Por su parte, la expresión de otros genes inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas p18 y p19 se estimula por TSA en células MCF-7 y MDA-MB-231 (Malinen et al., 2008). Además, se observó un incremento en la expresión del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) por el tratamiento con HDACi como SAHA, NaB o TSA en las células de cáncer de mama MCF-7 y ZR75 (Ammanamanchi y Brattain, 2004). También se ha encontrado que el tratamiento con TSA solo o en combinación con 5-aza-2'-dC, restaura la expresión del ARNm y de la proteína del receptor de estrógenos α (ER α), y promueve la sensibilidad a la quimioterapia con tamoxifen en células de cáncer de mama ER α negativas como MDA-MB-231 (Zhou et al., 2007; Jang et al., 2004; Sharma et al., 2006; Li et al., 2010). Se sabe que los factores de crecimiento similares a insulina (IGF) estimulan la proliferación celular, mientras que p21 bloquea el ciclo celular en la transición G1/S, mientras que p18 y p19 están involucrados en inhibir específicamente las cinasas dependientes de ciclinas 4 y 6

(CDK4 y CDK6), implicadas en el control de la fase G1 del ciclo celular. A su vez, TGF- β tiene la función de inhibidor de la proliferación, mientras que la estimulación de la expresión del receptor de estrógenos está asociada con la respuesta a tratamientos hormonales como el tamoxifen, que bloquea el efecto del estrógeno e inhibe el crecimiento del tumor. Con base en los estudios previos en células de cáncer de mama y en el presente, se indica que los HDACi pueden reactivar la expresión de genes que regulan la proliferación, diferenciación y muerte celular. Aunque el efecto de los HDACi en las células no es del todo claro.

Cambios en la acetilación y metilación de la histona H3 en células MDA-MB-231 tratadas con NaB y TSA

Los resultados obtenidos con los experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina o ChiP demuestran que el tratamiento de las células MDA-MB-231 con NaB o TSA incrementa la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9), a su vez el NaB disminuye el estado de trimetilación de H3K9, en la región promotora del gen *ATP2A3*. Estos resultados son la primera evidencia o demostración que el aumento en la expresión de SERCA3, en respuesta al tratamiento de células tumorales con HDACi, se asocia con un aumento en la acetilación de H3K9 y disminución en la metilación de H3K9, un mecanismo conocido como remodelación de la cromatina. Con base en nuestros resultados se propone el modelo siguiente:

Se sabe que el incremento en la acetilación y disminución de la metilación de H3K9, y el incremento de las formas metiladas de H3K4 (mono- di- y tri-metiladas) son marcas epigenéticas de activación transcripcional, mientras que el estado trimetilado de H3K9 es una marca de heterocromatina y se asocia con represión transcripcional (Litt et al., 2001; Lachner y Jenuwein, 2002; Kouzarides, 2007).

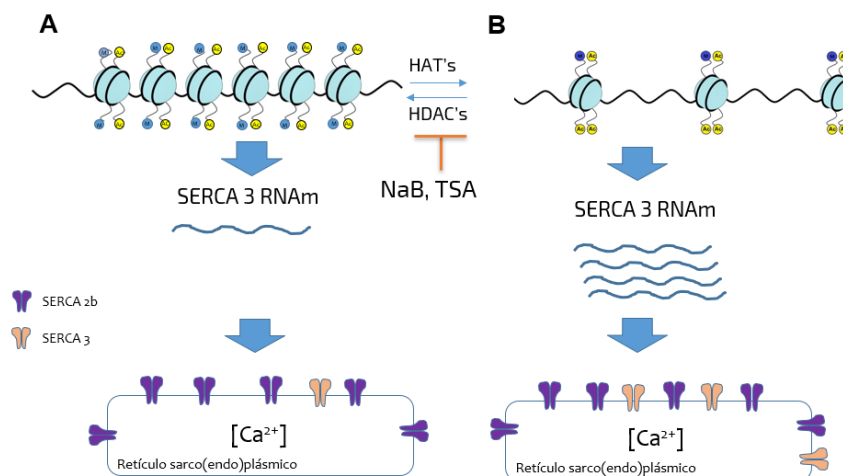


Figura 13. Modelo que propone los efectos del NaB y la TSA en activación transcripcional del gen *ATP2A3* en células MDA-MB-231 de cáncer de mama. Se representa gráficamente la cromatina del promotor del gen *ATP2A3*, el mensajero de SERCA3 y las ATPasas de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico. A. En ausencia de NaB o TSA, la proporción de H3K9me3, un marcador de heterocromatina es alta y la expresión del gen *ATP2A3* es muy baja, por lo que la recaptura de Ca^{2+} en el retículo sarco(endo)plásmico está mediada principalmente por SERCA2b. B. El tratamiento con NaB o TSA induce un aumento en la acetilación de H3K9 y a su vez NaB induce una disminución de H3K9me3. Estos cambios en H3K9 activan la transcripción del gen *ATP2A3* y aumento en la proteína SERCA3, lo que representa un mayor número de unidades de esta enzima en el retículo endoplásmico y lo que aumentaría la recaptura de Ca^{2+} . Los círculos azules indican grupos metilo, círculos amarillos grupos acetilo.

Flores-Peredo et al., (2016) reportaron un cambio de metilación/acetilación de H3K9 y la reactivación de la expresión de SERCA3 en células KATO-III tratadas con TSA. Por su parte, Kondo et al., (2004) demostraron que existe un cambio en la relación de metilación/acetilación del residuo H3K9 en cáncer de colon y que estas modificaciones activan la transcripción de diversos genes, como: megalina, fosfatidil inositol 3 cinasa-P101 (subunidad P101), trombospondina-4 (THBS4), THBS1, THBS2, KR18, LPH3, cuya función está relacionada con el desarrollo de diversos tipos de neoplasias. Además, Zhan et al., (2001) demostraron que en respuesta al tratamiento con NaB se produce un cambio de metilación de la lisina 9 a acetilación de este residuo en la histona H3. De manera sincronizada, el nivel de metilación de H3K4 y H3K79 (formas mono-, di- y tri-metiladas) incrementa progresivamente junto con el grado de acetilación de H3, que aumenta de la forma desacetilada, a mono-, di- a penta-acetilada. Esto

sugiere que las enzimas acetil transferasas H3K9 (HAT), metil transferasa H3K4 (Set 1) y metiltransferasa K3K79 (Dot 1) trabajan sinérgicamente en respuesta a los HDACi (Zhang et al., 2001). Se ha demostrado que la enzima metiltransferasa MLL4 es la responsable de la metilación de H3K4, cuya actividad depende del grado de acetilación de H3 (Nightingale et al., 2007).

Los resultados de inmunoprecipitación de la cromatina también indican que el NaB o TSA no incrementan la acetilación de H3K9 del promotor de SERCA2b; NaB parece incluso incrementar la trimetilación de H3K9, lo que se considera como, una marca de heterocromatina, represión transcripcional. Esto probablemente explica porque no se ve estimulación en la expresión de esta isoforma en respuesta al tratamiento con NaB o TSA en células MDA-MB-231.

Expresión de SERCA2b y SERCA3a en células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con 5-aza-2'-dC

Se encontró que la expresión de SERCA2b y SERCA3a no cambia en las células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con diferentes concentraciones de 5-aza-2'-dC (1, 2 y 5 μ M), sugiriendo que la expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* no se regula por la metilación del ADN en células MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama. Esto es consistente con los resultados de Glavac et al., (2008) y Korosec et al., (2009), quienes reportan que no hay cambio en la metilación de los promotores de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* en carcinomas de cabeza y cuello, colon, pulmón y cerebro. En otro grupo se reportó que el tratamiento de células KATO-III y Caco-2 con 5-aza-2'dC no tiene efecto en la expresión de SERCA3, debido a que el promotor no está metilado (Meneses-Morales *et al.*, 2019). Contrario a estos resultados, Endo et al., (2004) demostraron que el mecanismo involucrado en la baja expresión de SERCA2 en algunas muestras de carcinoma oral se debió a la metilación del promotor del gen *ATP2A2* y al tratar líneas celulares de cáncer oral con 5-aza-2'-dC se reactivó la expresión de SERCA2. Se ha sugerido que la regulación de la expresión por metilación de la región promotora de ciertos genes depende del tipo de tumor (Wu et al., 2010).

Posibles implicaciones de los cambios en la expresión de las enzimas SERCA en células tumorales

Gélébart et al., (2002) sugirieron que la expresión alterada de SERCA3 podría propiciar una menor capacidad en la recaptura de Ca^{2+} cuando el calcio aumenta en el citosol, debido a que la velocidad de transporte de esta enzima es 3 veces mayor en comparación con SERCA2b. Los cambios en la expresión de SERCA3 en respuesta a los HDACi correlacionan con un menor contenido de Ca^{2+} en el interior del retículo endoplásmico y una mayor concentración de Ca^{2+} citosólico basal (Gélébart et al., 2002; Flores-Peredo et al., 2016). A su vez, estudios realizados en clonas de células de cáncer de pulmón que expresan la proteína fluorescente indicadora de calcio (GCaMP2), la cual sirve como sensor de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , mostraron una disminución del Ca^{2+} almacenado en el retículo endoplásmico en células A549 de cáncer de pulmón tratadas con fenil butirato (Arbajian et al., 2013). Resultados similares se obtuvieron en células KATO III, tratadas con NaB o TSA, donde se observó una reducción de los niveles de Ca^{2+} en el interior del retículo endoplásmico, respecto a las células control sin tratamiento (Flores-Peredo et al., 2016).

El menor contenido de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico se puede deber a que las enzimas SERCA3 tienen una afinidad 10 veces menor por Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}}=1.2 \mu\text{M}$) comparado con SERCA2b ($K_{\text{Ca}}=0.2 \mu\text{M}$). Se sugiere que las enzimas SERCA3 se activan cuando las concentraciones de Ca^{2+} en el citosol son altas, por ejemplo, después de recibir una estimulación masiva o durante el pico de oscilaciones citosólicas de Ca^{2+} .

Avances continuos en los métodos para la caracterización de estas enzimas y otras proteínas que participan en la regulación de la señalización por Ca^{2+} puede ser de relevancia para determinar el papel que juegan estas proteínas en el desarrollo del cáncer, con el fin de proponer nuevas terapias para el tratamiento del cáncer.

CONCLUSIONES

La expresión de SERCA3a se estimula en células MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama tratadas con NaB o TSA, a través de un aumento en la acetilación de la lisina 9 de la histona H3, que induce la remodelación de la cromatina y activa la transcripción del gen *ATP2A3*; mientras que la expresión de SERCA2b no cambia por el tratamiento con NaB o TSA, sugiriendo que su expresión no se regula a través de la acetilación de las histonas.

Por otra parte, el tratamiento con 5-aza-2'dC no afecta la expresión de SERCA2b y SERCA3a, sugiriendo que la metilación del ADN no regula la expresión de ambos genes en las líneas celulares estudiadas.

Estos resultados confirman parcialmente la hipótesis planteada, debido a que el NaB y la TSA solo estimularon la expresión de SERCA3a, sin mostrar efecto en la expresión de SERCA2b. Además, la 5-Aza-2'dC no estimuló la expresión de SERCA2b y SERCA3a en ambas líneas celulares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anger, M., Samuel, JM., F. Marotte, F., Wuytack, F., Rappaport, L., & Lompré, A-M. (1993). The sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase mRNA isoform, SERCA 3, is expressed in endothelial and epithelial cells in various organs. *FEBS Lett*, 334: 45–48.

Arbaban, A., Brouland, JP., Apáti, A., et al. (2013). Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during lung cancer cell differentiation. *FEBS Journal*, 280: 5408-5418.

Ait-Ghezali, L., Arbaban, A., Jeibmann, A., et al. (2014). Loss of endoplasmic reticulum calcium pump expression in chroid plexus tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 40:726-735.

Ammanamanchi, S., & Brattain, MG. (2004). Restoration of transforming growth factor-beta signaling through receptor RI induction by histone deacetylase activity inhibition in breast cancer cells. *J Biol Chem*; 279:32620–32625.

Arredouani, A., Guiot, Y., Jonas, JC., et al. (2002). SERCA3 ablation does not impair insulin secretion but suggests distinct roles of different sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps for Ca^{2+} homeostasis in pancreatic β -cells. *Diabetes*, 51:3245-3253.

Bergner, A., & Huber, R.M. (2008). Regulation of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -store in cancer. *Anti-Cancer Agents Med Chem*, 8: 705-709.

Berridge, M.J., Lipp, P., & Bootman, M.D. (2000). The Versatility and universality of calcium signalling. *Nature*, 1:11-21.

Brandl, C.J., DeLeon, S., Martin, D., & MacLennan, D.H. (1987). Adult forms of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem*, 262: 3768-3774.

Breast cancer. 2014. Ardmore: Asociación de Breastcancer.org. Disponible en: <http://www.breastcancer.org>, consultado 19 de febrero 2016.

Brouland, J.P., Gélébart, P., Kovács, T., Enouf, J., Grossmann, J., & Papp, B. (2005). The Loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. *American J Pathol*, 167:233-242.

Chen, W.Y. Factors that modify breast cancer risk in women. En: Chagpar AB, Hayes DF, Vora SR, editors. UpToDate; 2018 [consultado 10-11-2018]. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/factors-that-modify-breast-cancer-risk-in-women>.

Christman, J.K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, 21:5483 – 5495.

Clapham, D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131:1047-1058.

Cousens, L. S., Gallwitz, D., & Alberts, B. M. (1979). Different accessibilities in chromatin to histone acetylase. *J Biol Chem*, 254: 1716-23.

Davie, J.R. (2003). Inhibition of histone descetylase activity by butyrate. *J Nutr*, 133:2485S-2493S.

De la Bastie, D., Wisnewski, C., Schwartz, K., & Lompré, A.M. (1988). (Ca²⁺ + Mg²⁺)-dependent ATPase mRNA from smooth muscle sarcoplasmic reticulum differs from that in cardiac and fast skeletal muscles. *FEBS Lett*, 229: 45-48.

Dode, L., Wuytack, F., Kools, P.F.J., Baba, F., Raeymaekers, L., Brik, F. Van De Ven, W.J.M. & Casteels, R. (1996). cDNA cloning, expression and chromosomal localization

of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene. *Biochem J*, 318:689-699.

Dokmanovic, M., Clarke, C., & Marks, P. A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives, *Mol. Cancer Res*, 5:981–989.

Endo, Y., Uzawa, K. Mochida, Y., Shiiba, M., Bukawa, H., Yokoe, H., & Tanzawa, H. (2004). Sarcoendoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase type 2 downregulated in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 110:225-231.

Eggermont, J., Wuytack, F., & Casteels, R. (1990). Characterization of the mRNAs encoding the gene 2 sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum Ca²⁺ pump in pig smooth muscle. *Biochem J*, 266:901–907.

Flores-Peredo, L., Rodríguez, G., Zarain-Herzberg, A. (2016). Induction of Cell Differentiation Activates Transcription of the Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase 3 Gene (ATP2A3) in Gastric and Colon Cancer Cells. *Mol Carcinog*, 9999:1-16.

Glavac, D., Volavsek, M., & Ravnik-Glavac, M. (2008). Alteraciones in genes encoding sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca(2+) pumps in association with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 181:112-118.

GLOBOCAN 2018 (IARC), Disponible en <http://gco.iarc.fr/>; The World Bank Group Indicators; available from <https://data.worldbank.org/indicator/NY.GDP.PCAP.CD> [consultado 31 enero 2019].

Gélébart, P.; Kovács, T. Brouland, J.P. van Gorp, R. Grossmann, J. Rivard, N. et al. (2002). Expression of endomembrane calcium pump in colon and gastric cancer cells: Induction of SERCA3 expression during differentiation. *J Biol Chem*, 277: 26310-26320.

Gunteski-Hamblin, A., Greeb, J., & Shull, G.E. (1988). A novel Ca²⁺ pump expressed in brain, kidney and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch

muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase gene. Identification of cDNAs encoding Ca^{2+} and other cation-transporting ATPases using an oligonucleotide probe derived from the ATP-binding site. *J Biol Chem*, 263: 15032-15040.

HADAC Inhibitors Base. (2015). Disponible y consultado en: 19 de mayo 2014 <http://www.hdacis.com>

Hadri, L., Pavoine, C., Lipskaia, L., Yacoubi, S., & Lompré, A.M. (2006). Transcription of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase type 3 gene, ATP2A3, is regulated by the calcineurin/NFAT pathway in endothelial cells. *Biochem J*, 394:27-33.

Hakii, H., Fujiki, H., Suganuma, M., Nakayasu, M., Tahira, T., Sugimura, T., et al. (1986). Thapsigargin, a histamine secretagogue, is a non-12-O-tetradecanolphorbol-13-acetate (TPA) type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res Clin Oncol*, 111:177-181.

Hendrich, B., & Bird, A. (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*, 18: 6538-6547.

Holliday, D.L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13:215.

Jean-Pier J.I. (2017) DNA Methylation as a Therapeutic Target in Cancer. *Clin Cancer Res*, 13(6): 1634-37.

Jang, E.R., Lim, S.J., Lee, E.S., et al (2004). The histone deacetylase inhibitor trichostatin A sensitizes estrogen receptor alpha-negative breast cancer cells to tamoxifen. *Oncogene*; 23:1724-1736.

James, P., Inui, M., Tada, M., Chiesi, M., & Carafoli, E. (1989). Nature and site of phospholamban regulation of the Ca^{2+} pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature*, 342: 90-92.

Jonh, L.M., Lechleiter, J.D. & Camacho, P. (1998). Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *J Cell Biol*, 142: 963-973.

Key, T.J., Verkasalo, P.K., Banks, E., et al. (2001). Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol*, 2: 133-140.

Kohl, R.M., & Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502(7472): 472–479.

Kondo, Y., Shen, L., Yan, P.S. Huang, T.H.M., & Issa, J.P.J. (2004). Chromatin immunoprecipitation microarrays for identification of genes silenced by histone H3 lysine 9 methylation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 101:7398-7403.

Korczak, B., Zarain-Herzberg, A., Brandl, C.J., Ingles, C.J., Green, N.M., & MacLennan D.H. (1988). Structure of the rabbit fast-twitch skeletal muscle Ca²⁺-ATPase gene. *J Biol Chem*, 263, 4813-4819

Korosec, B., Glavac, D., Volavsek, M., & Ravnik-Glavac, M. (2009). ATP2A3 gene is involved in cancer susceptibility. *Cancer Genet Cytogenet*, 188:88-94.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*; 128; 693-705.

Kusdistani, S.K., & Grunstein, M. (2003). Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature Rev Mol Cell Biol*; 4:276-284.

Lachner, M., & Jenuwein, T. (2002) The many faces of histone lysine methylation. *Current Opinion Cell Biol*; 14:286-298.

Lee W.J., Roberts-Thomson, S.J., Hotman, N.A., et al. (2002). Expression of plasma membrane calcium pump isoform mRNAs in breast cancer cell lines. *Cell Signal*, 14:1015-1022.

Lee, W.J., Robinson, J.A., Hofman, N.A., McCall, M.N., Roberts-Thomson, S.J., & Monteith, G.R. (2005). Antisense-mediated inhibition of the Plasma Membrane Calcium-ATPase suppresses proliferation of MCF-7 cells. *J Biol Chem*, 280:27076-27084.

Li, Y., Yuan, Y.Y., Meeran, S.M., & Tollefsbol, T.O. (2010). Synergistic epigenetic reactivation of estrogen receptor- α (ER- α) by combined green tea polyphenol and histone deacetylase inhibitor in ER α -negative. *Mol Cancer*, 9:274.

Lipskaia, L., & Lompré, A.M. (2004). Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signaling and control of growth and proliferation. *Biol Cell*, 96:55-68

Lipskaia, L., Hulot, J.S., & Lompré, A.M. (2007). Role of sarco/endoplasmic reticulum calcium content and calcium ATPase activity in the control of cell growth and proliferation. *Pflugers Arch-Eur J Physiol*, 457: 673-85.

Liu, L.H., Boivin, G.P., Prasad, V., Periasamy, M. & Shull, G.E. (2001). Squamous cell tumors in mice heterozygous for a null allele of *Atp2a2*, encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 2 Ca²⁺ pump. *J Biol Chem*, 276:26737– 40.

Litt, M.D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C.D., & Felsenfeld, G. (2001). Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science*, 293:2453-2455.

Lytton, J., Westlin, M., Burk, S.E., Shull, G.E., & MacLennan, D.H. (1992). Functional comparison between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem*, 267:14483-14489.

Lytton, J., & MacLennan, D.H. (1988). Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca²⁺-ATPase gene. *J Biol Chem*, 263: 15024-15031.

MacLennan, D.H., Rice, W.J., & Green, N.M. (1997). The Mechanism of Ca²⁺ Transport by Sarco(Endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPases. *J Biol Chem*, 272:28815-28818.

MacLennan, D.H., Brandl, C.J., Korczak, B., & Green, N.M. (1985). Amino-acid sequence of a Ca²⁺ + Mg²⁺-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature*; 316:696-700.

Malinen, M., Saramäki, A., Ropponen, A., Degenhardt, T., Väisänen, S., & Carlberg, C (2008). Distinct HDACs regulate the transcriptional response of human cyclin-dependent kinase inhibitor genes to Trichostatin A and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3. *Nucleic Acids Res*, 36:121-132.

Malhotra, J.K., Zhao, X., Band, H., & Band, V. (2015). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*, 10:10:955-960

Martin, V., Bredoux, R., Corvazier, E., van Gorp, R., Kovács, T., Gélébart, P., & Enouf, J. (2002). Three novel Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ATPase (SERCA) 3 isoforms: Expression, regulation and function of the members of the SERCA3 family. *J Biol Chem*, 277:24442-24452.

Marzo-Castillo, M., Vela-Vallespín, C., Bellas-Beceiro, B., et al. (2018). Recomendaciones de prevención del cáncer. Actualización PAPPS 2018. *Aten Primaria*, 50(Supl 1):41-65.

McQuown, S.C., & Wood, M.A. (2010). Epigenetic regulation in substance use disorders. *Curr Psychiatry Rep*, 12:145-153.

Monteith, G.R., McAndrew, D., Faddy, H.M., & Roberts-Thomson S.J. (2007). Calcium and cancer:targeting Ca²⁺ transport. *Nature Reviews Cancer*, 7:519:530.

Mountian, I., Manolopoulos, V.G., & De Smedt, H. (1999). Expression patterns of sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms in vascular endothelial cells. *Cell Calcium*, 25:371-380.

Nightingale, K.P., Gendreizig, S., White, D.A., Bradbury, C., Hollfelder, F., & Turner, B.M. (2007). Cross-talk between histone modifications in response to histone deacetylase inhibitors: MLL4 links histone H3 acetylation and histone H3K4 methylation. *J Biol Chem*, 282:4408-4416.

Odermatt, A., Taschner, P.E.M., & Khanna, V.K. (1996). Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, are associated with Brody disease. *Nature Genet*, 14: 191-194.

Papp, B., & Brouland, J.P. (2011). Altered endoplasmic reticulum calcium pump expression during breast tumorigenesis. *Breast Cancer (Auckl)*, 5:163–174.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29:e45.

Pinton, P., & Rizzuto, R. (2006). Bcl-2 and Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ*, 13:1409–1418.

Poch, E., Leach, S., Snape, S., Cacic, T., MacLennan D.H., & Lytton, J. (1998). Functional characterization of alternatively spliced human SERCA3 transcripts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 275:1449-1458.

Roderick, H.L., Lechleiter, J.D., & Camacho, P. (2000). Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca(2+) oscillations via an interaction with SERCA2b. *J Cell Biol*, 149:1235-1247.

Roderick, H.L., & Cook, S.J. (2008). Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nature*, 8:361-375.

Sagara, Y., Fernández-Belda, F., de Meis, L., & Inesi, G. (1992). Characterization of the inhibition of intracellular Ca²⁺ transport ATPases by thapsigargin. *J Biol Chem*, 267: 12606-13.

Sharma, D., Saxena, N.K., Davidson, N.E. & Vertino, P.M. (2006). Restoration of tamoxifen sensitivity in estrogen receptor-negative breast cancer cells: Tamoxifen-bound reactivated ER recruits distinctive corepressor complex. *Cancer Res*, 66:6370-6378.

Sutliff, R.L., Hoying, J.B., Kadami, V.J., Kranias, E.G., & Paul, R.J. (1999). Phospholamban is present in endothelial cells and modulates endothelium-dependent relaxation. Evidence from phospholamban gene-ablated mice. *Circ Res*, 84:360-364.

Tan, P. H. & Ellis, I. O. (2013). Myoepithelial and epithelial-myoepithelial, mesenchymal and fibroepithelial breast lesions: updates from the WHO Classification of Tumours of the Breast 2012. *J. Clin. Pathol.*, 66:465–470

Torrades, S. (2003). El origen genético del cáncer de mama. *OFFARM*, 22:108-112.

Tsubaki, J., Choi, W.K., Ingermann, A.R., et al (2001). Effects of sodium butyrate on expression of members of the IGF-binding protein superfamily in human mammary epithelial cells. *J Endocrinol*, 169:97-110.

Van de Vijver, M.J., He, Y.D. van't Veer, L.J. et al. (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*, 347:1999-2009.

Verboomen, H., Wuytack, F., Van Den Bosch, L., Mertens, L., & Casteels, R. (1994). The functional importance of the extreme C-terminal tail in the gene 2 organellar Ca(2+)-transport ATPase (SERCA2a/b). *Biochem*, 303:979-984.

Vigushin, D.M., Ali, S., Pace, P.E., Mirsaidi, N. Ito, K., Adcock, I., & Coombes, R.C. (2001). Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. *Clin Cancer Res*, 7:971-6.

Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2004). *Molecular Biology of the Gene*. 5ta. ed. San Francisco: Pearson Education.

Weinberg, R.A., (2007). *The biology of cancer*. New York: Garland Science.

Wu, Y., Alvarez, M., Slamon, D.J., Koeffler, P., & Vadgama, J.V. (2010). Caspase 8 and maspin are downregulated in breast cancer cells due to CpG site promoter methylation. *BMC Cancer*,10:32.

Wuytack, F., Raeymaekers, L., & Missiaen, L. (2002). Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium*, 32:279-305.

Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., & Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *Journal of Biological Chemistry*, 265:17174–17179.

Zardavas, D. et al. (2015). Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2015:1-14.

Zhang, Y., & Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*,15: 2343-2360.

Zhou, Q., Atadja, P., & Davidson, N.E. (2007). Histone deacetylase inhibitor LBH589 reactivates silenced estrogen receptor alpha (ER) gene expression without loss of DNA hypermethylation. *Cancer Biol Ther*, 6:64-69.

ANEXOS

Anexo I

Análisis de expresión de SERCA3a y SERCA2b en muestras de cáncer de mama de pacientes

Se analizaron 3 muestras de tejido mamario tumoral y tejido adyacente control. Las muestras de cáncer de mama y tejido mamario control se obtuvieron a partir de material de cirugía y fueron proporcionados por el personal médico de la clínica del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) de la ciudad de Xalapa, con previa autorización del comité de investigación y ética de dicha institución. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y de inmediato se transportaron al laboratorio para realizar la extracción de ARN.

Las muestras de tejido mamario (aproximadamente 100 mg) se homogeneizaron en 1 mL de Trizol (Invitrogen, EUA). El homogeneizado se incubó 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se adicionaron 200 µl de cloroformo y se prosiguió con el proceso de extracción de ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Thermo Scientific). Posteriormente se analizó la expresión de los mensajeros de SERCA2b o SERCA3 por medio de PCR-tiempo real.

Los datos sugieren que las isoformas SERCA3b y 3c no se expresan en tejido mamario (Figura A1). Se ha comprobado por medio de RT-PCR que en algunos tejidos no se expresan todas las isoformas para SERCA3; en plaquetas, pulmón y páncreas se expresan 5 isoformas, mientras que corazón, cerebro, placenta y riñón expresan 3 o 4 variantes (Martin et al., 2002).

Los resultados obtenidos con tejido mamario tumoral muestran una marcada reducción en la expresión de SERCA2b y SERCA3a en comparación con tejido adyacente control. SERCA3a presentó una reducción mucho mayor que SERCA2b en las tres muestras analizadas (Figura A2).

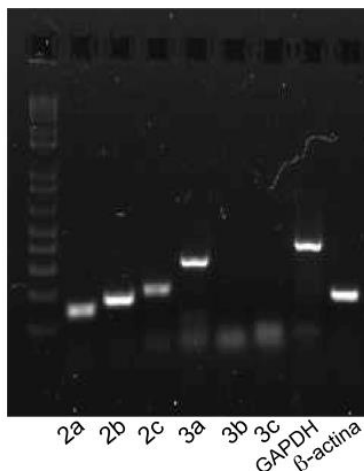


Figura A1. Detección de los mensajeros para las isoformas de SERCA2 y SERCA3 en tejido mamario normal. En el tejido mamario normal se expresan las isoformas SERCA2a (151 pb), 2b (181 pb) y 2c (205 pb) y la isoforma 3a (319 pb); no así las isoformas SERCA3b (407 pb) y 3c (420 pb), GAPDH (400 pb), β-actina (194 pb).

Desafortunadamente, debido a la baja frecuencia de las cirugías en esta institución, no se tuvo acceso a un mayor número de muestras de cáncer de mama, para realizar un análisis estadístico, pese a esto la tendencia que se observa es consistente con el reporte publicado por Papp y Brouland (2011), quienes demostraron que la expresión de la proteína SERCA3 está disminuida o ausente en carcinomas provenientes de los ductos y los acinos de la mama, en comparación con epitelio normal. Estos resultados indican que la expresión del ARNm de SERCA3 se encuentra disminuida en cáncer de mama, lo que correlaciona con la reducción en la proteína SERCA3 reportada en cáncer de mamá (Papp y Brouland, 2011).

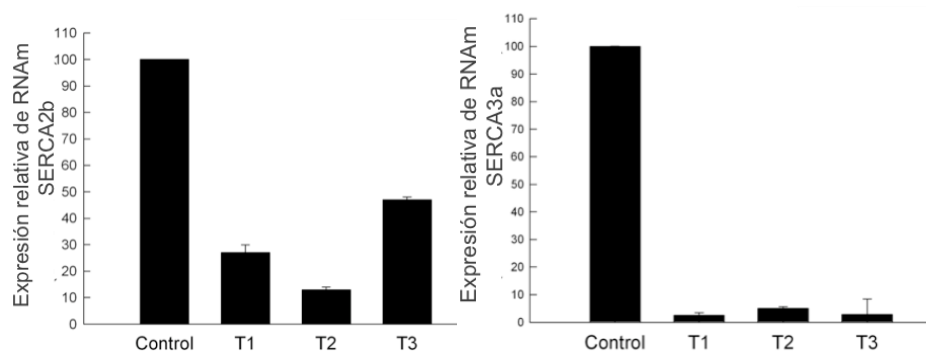


Figura A2. La expresión de SERCA2b y SERCA3a está considerablemente reducida en tejido mamario tumoral en comparación del tejido mamario normal o control. T1, T2 y T3 corresponden a tejido mamario tumoral 1, 2 y 3 respectivamente. Los resultados se muestran como la media de los triplicados de cada una de las muestras \pm SD.

Anexo II

Artículo científico original

Histone Deacetylase Inhibitors Promote the Expression of *ATP2A3* Gene in Breast Cancer Cell Lines

Erika Contreras-Leal,^{1,2} Andrés Hernández-Oliveras,² Lucía Flores-Peredo,³ Ángel Zarain-Herzberg,³ and Juan Santiago-García^{2*}

¹Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Veracruzana, Veracruz, México

²Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México

Recent studies have shown that expression of Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase 2 (SERCA2) is decreased in oral cancer; whereas expression of SERCA3 is considerably decreased or absent in human colon, gastric, breast, and lung cancers. The *ATP2A2* and *ATP2A3* genes encode SERCA2 and SERCA3 isoforms, respectively. Promoter methylation on CpG islands was responsible for the repression of *ATP2A2* gene in human oral cancer samples. On the other hand, histone deacetylase inhibitors (HDACi) up-regulate *ATP2A3* expression in gastric, colon, and lung cancer cells in culture, however, the molecular mechanism is unknown. In this study, we investigate whether HDACi and DNA methylation regulate *ATP2A2* and *ATP2A3* expression in human breast cancer cell lines. Results show a marked induction of SERCA3a and pan-SERCA3 mRNA expression in human MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated with sodium butyrate (NaB) or trichostatin A (TSA); whereas SERCA2b mRNA expression did not change significantly. ChIP assays show that NaB or TSA treatment of MDA-MB-231 cells increases H3K9 acetylation on *ATP2A3* promoter. NaB also decreases H3K9 trimethylation; suggesting that these modifications stimulate *ATP2A3* gene expression, through a chromatin remodeling mechanism. In contrast, NaB or TSA do not increase H3K9-acetylation of *ATP2A2* proximal promoter. In addition, treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine did not affect SERCA2b and SERCA3a expression, suggesting that promoter methylation status does not alter their expression in these cell lines. We propose that alteration of SERCA2b/SERCA3a isoform expression ratio could affect calcium management within the cell, and thus, the cellular pathways regulated by calcium could be compromised, such as cellular proliferation or apoptosis. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: SERCA mRNA expression; breast cancer cells; HDAC inhibitors; ChIP assay; DNA methylation

INTRODUCTION

Calcium ion (Ca^{2+}) is a second messenger that controls a broad range of cellular functions, such as muscular contraction, gene expression, growth, and differentiation [1–4]. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases (SERCA) are enzymes that transport calcium from the cytoplasm to the lumen of the endoplasmic reticulum (ER), and play a key role in calcium homeostasis. In humans, alternative splicing of pre-mRNAs from *ATP2A1*, 2 and 3 genes encode 11 different SERCA protein isoforms (SERCA1a, b, SERCA2a-c, and SERCA3a-f, respectively) [5–11]. Thapsigargin, a potent, specific, and irreversible SERCA inhibitor, causes cell growth arrest, suggesting that intracellular Ca^{2+} pool content and SERCA activity are likely to control cell growth [12].

Alterations in SERCA isozymes expression and activity have been associated with several types of cancer [13–20]. It was shown that SERCA2 expression decreases or was lost in human oral cancer and in oral cancer derived cell lines, but is abundant in normal oral epithelial cells [14]. No mutations, explaining this lower expression were found in the coding sequence of *ATP2A2* gene [14]. However, treatment of oral cancer-derived cell lines with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-2'-dC) restored or induced SERCA2

protein expression, suggesting that SERCA2 loss of expression is regulated by promoter methylation in these cells [14]. In addition, SERCA2b expression and activity were also decreased in transformed rat thyroid cells, compared to normal thyroid tissue [15].

Abbreviations: SERCA, Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; *ATP2A2*, gene encoding SERCA2 isoenzymes; *ATP2A3*, gene encoding SERCA3 isoenzymes; cDNA, complementary deoxy ribonucleic acid; ChIP, chromatin Immunoprecipitation; DNMT, DNA-methyl transferase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; H3K9Ac, acetylated form of lysine 9 of histone H3; H3K9me1, H3K9me2, and H3K9me3, mono-, di- and tri-methylated forms of H3K9; H3K4me1, monomethylated form of lysine 4 of H3; H4, histone H4; HDAC, histone deacetylase; HDACi, HDAC inhibitors; mRNA, messenger ribonucleic acid; NaB, sodium butyrate; TSA, trichostatin A; PCR, polymerase chain reaction; qRT-PCR, real-time-polymerase chain reaction; 5-aza-2'-C, 5-aza-2'-deoxycytidine; SD, standard deviation.

Grant sponsor: CONACyT; Grant number: 223272; Grant sponsor: PROMEP; Grant number: PTC-270; Grant sponsor: PAPIIT-DGAPA-UNAM; Grant number: IN213613

*Correspondence to: Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Veracruzana, Luis Castelazo Ayala S/N, Xalapa, Ver. 91190, México.

Received 20 April 2015; Revised 26 July 2015; Accepted 17 August 2015

DOI 10.1002/mc.22402

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

On the other hand, it has been shown that SERCA3 expression is considerably reduced or absent in colon, gastric, breast, choroid plexus, and lung cancers compared to normal epithelial cells of these tissues that express this enzyme at high levels [16–20]. The loss of SERCA3 expression in several types of cancer suggests that abnormal expression of this enzyme is an early event during carcinogenesis [16–21]. The degree of loss in SERCA3 protein expression is proportional to the loss of differentiation in benign and malignant tumors [16–20]. SERCA3 expression has been shown to decrease at early stages of dysplasia in adenomas, and remains low, or becomes absent in advanced stages of cancer [16–21]. In addition, SERCA3 protein expression gradually increases in spontaneously differentiating colon cancer Caco-2 cells after reaching confluence [17]. A different set of experiments showed that treatment of gastric, colon, and lung cancer cells with HDACi, such as sodium butyrate induced a marked expression of SERCA3 protein, whereas SERCA2 protein expression did not change significantly or was reduced [17,19].

It has been shown that SERCA3 protein expression is strongly decreased in early non-malignant breast epithelial lesions and remains at low levels in lobular carcinomas; compared to normal epithelial cells comprising the acini of the mammary gland, that expresses SERCA3 abundantly [18]. These data suggest that differentiation of the normal acinar epithelium is associated with high SERCA3 expression [18]. SERCA3 expression was also observed at low level in luminal ductal cells and its expression is reduced in benign ductal lesions, as well as in ductal adenocarcinomas [18].

The molecular mechanisms responsible for decreased SERCA3 expression in breast cancer have not been investigated. Therefore, the aim of the present study was to investigate whether HDAC inhibition with NaB or TSA, or a DNA methylation inhibitor regulate the expression of SERCA2 and SERCA3 mRNAs in two human breast cancer cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Treatments

MCF-7 (estrogen-receptor positive) and MDA-MB-231 (estrogen-receptor negative) breast carcinoma cell lines were kindly provided by Dr. Nora A. Gutiérrez-Nájera (INMEGEN, México). The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose, supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.5% penicillin-streptomycin, and 70 mg/l kanamycin. Cells were grown at 37°C in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere. Exponentially growing cells were trypsinized and seeded in 6-well plates; when cells reached ~70% confluence by microscopic examination (day 2 or 3 post-plating), the medium was changed and NaB 1, 2 or 3 mM, TSA 50, 75 or

100 nM, or 5-aza-2'-dC 1, 2 or 5 μM; concentrations within the range previously used [17,22–24]. Cells were treated during 72 h with these reagents, replacing the medium every 24 h.

RNA Isolation, Reverse Transcription, and Real-Time PCR (qRT-PCR) Reactions

MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated, as described above during 72 h, were washed twice with 1× PBS, then 1 ml of Trizol reagent was added to each well to isolate total cellular RNA, according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen, Carlsbad, CA). RNA concentration was determined with a NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA), and RNA integrity was determined by agarose gel electrophoresis.

Total RNA (1.5 μg) was reverse-transcribed using 200 U of M-MLV reverse transcriptase, and 75 pmoles of random hexamers in a final volume of 30 μl, according to the instructions provided by the manufacturer (Invitrogen, Carlsbad CA, USA).

Real-time PCR reactions were performed in triplicate, containing 6 μl of 2× SYBRGreen qPCR reaction mix (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 μl of cDNA from each sample, 5 pmoles of each specific pair of primers for SERCA2b or SERCA3a mRNAs (Table 1), in a final volume of 12 μl, using the following program: 2 min at 50°C, 8.5 min at 95°C, 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min; with a final dissociation analysis, in a 7500 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reactions with primers for GAPDH or β-actin were used as internal controls to normalize the data (see Table I). The efficiency of the qRT-PCR reactions was determined with the LinReg program [25], and changes of mRNA expression were calculated according to Pfaffl 2001 [26].

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assays

ChIP assays were conducted, as previously described [27], with few exceptions. After cross-linking, cell lysates were sonicated with 12 pulses of 10 s each on ice, with 1 min pause between each pulse to prevent overheating of the samples. Soluble chromatin (equivalent to 50 μg of DNA) was pre-cleared with protein A/G plus-agarose beads (Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX, USA) and then incubated overnight at 4°C on a Nutator platform with 2 μg of antibodies to H3 modifications (Abcam, Cambridge, MA). Immunoprecipitates were recovered by incubation with protein A/G plus-agarose beads and washed sequentially for 5 min with low-salt wash buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100); high-salt wash buffer (similar to low salt, except that NaCl was 500 mM); LiCl wash buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.25 M LiCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate); and twice with TE buffer. Immunoprecipitated DNA was eluted with 200 μl of elution buffer (0.1 M NaHCO₃, 1% SDS), then incubated for 30 min at 37°C with RNase A, followed by overnight

Table 1. Sequence of Primers Employed for Real-Time PCR and for *ATP2A2* and *ATP2A3* Genes Promoter Analysis

Primers	Forward (5'– 3')	Reverse (5'– 3')	PCR product
SERCA2b	CGAACCCCTTGCCACTCATCTTC	TGCCGAGAACGAGCAGGATTTG	181 bp
SERCA3a	GAGTCACGCTCCCCACCACC*	GGCTCATTTCTTCGTGCATGTGGTTC*	319 bp
pan-SERCA3	CAGGGGACATTGTAGAAGTGCC	TGGTCACGGACACAGATTCACC	125 bp
GAPDH	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	TGAGGAGGGGAGATTTCAGTG	399 bp
β -Actin	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	200 bp
<i>ATP2A2</i> p	CCTCGATCCGGGTTCTTA	GGCTGCTCTAATAGCATTTATCG	213 bp
<i>ATP2A3</i> p	GCGGTCTCAGTTCCCTCTGC	TGTCCGTGCTGGGACCTTACCC	174 bp

*From Gélébart et al, 2002.

incubation at 55°C with proteinase K. Reverse cross-linking of DNA was performed by incubating the samples with 8 μ l of 5 M NaCl at 65°C for 6 h. DNA was extracted with phenol, phenol-chloroform, and chloroform-isoamyl alcohol, then precipitated with ethanol and resuspended in 20 μ l of ddH₂O. Input samples (equivalent to 5 μ g of DNA) were resuspended in 20 μ l of ddH₂O after reversal cross-linking and ethanol precipitation.

PCR was conducted with 1 μ l of immunoprecipitated or input DNA samples, 10 μ l of 2x PCR reaction mix (Promega, Madison, WI), 5 pmoles of each primer for the *ATP2A2* or *ATP2A3* promoters (*ATP2A2*p and *ATP2A3*p, Table 1), 1 μ l of DMSO, and water up to 20 μ l; with the following program: 3 min at 95°C, 30 or 35 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C, 1 min at 72°C, and a final extension of 7 min at 72°C. PCR products were separated on 2% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining with an XR 170-8170 photo documentation station (BioRad, Hercules, CA).

Real time PCR for ChIP samples was conducted with 1 μ l of immunoprecipitated DNA or 1 μ l of 1:100 dilution of input, conditions were as described before, except that 5% DMSO was added to the reactions. Data were normalized as percent of input signal.

Statistical Analysis

qRT-PCR data were analyzed for normality using a Shapiro-Wilk test. Since our data did not fit a normal distribution, they were analyzed with the Kruskal-Wallis test, using Statistica 7 software. Comparisons between pan-SERCA3 and SERCA3a expression were done by t-test or by Mann-Whitney U-test, depending on the distribution of the data. A *P*-value <0.01 was considered significant. Results are reported as mean \pm S.D.

RESULTS

SERCA3a mRNA Expression but not SERCA2b is Increased in MCF-7 and MDA-MB-231 Cells Treated with HDACi

To determine whether NaB stimulates SERCA2 and SERCA3 mRNA expression, MCF-7 breast cancer cells were treated with 1, 2 or 3 mM NaB for 72 h. Under these conditions SERCA3a mRNA expression shows a dose-dependent induction (Figure 1B). Compared to

control cells, significant changes were found in cells treated with 2 and 3 mM NaB (3.95 ± 0.93 , and 5.1 ± 0.069 fold higher, respectively; *P* < 0.01). Experiments conducted with primers to amplify mRNA for all SERCA3 isoforms (pan-SERCA3) in MCF-7 cells treated with 3 mM NaB show significant differences compared to control cells, 6.92 ± 1.4 , *P* < 0.01; but no difference was found between SERCA3a and pan-SERCA3 mRNAs (5.1 ± 0.069 vs 6.92 ± 1.4 , *P* = 0.07). Similarly, treatment of MCF-7 cells with 100 nM TSA induces SERCA3a mRNA expression (3.96 ± 0.301 fold higher than control cells; *P* < 0.01) (Figure 1D) and pan-SERCA3 mRNA expression (4.397 ± 0.584 ; *P* < 0.01). However, no significant difference was found between SERCA3a and pan-SERCA3 mRNA expression (3.96 ± 0.301 vs 4.397 ± 0.584 ; *P* = 0.45). We did not find significant changes in SERCA2b mRNA expression under the same conditions in MCF-7 cells (Figure 1A, C).

To show that the effect on SERCA2b and SERCA3 expression observed in MCF-7 cells was not only restricted to this cell line, SERCA2b and SERCA3a mRNA expression was also analyzed in MDA-MB-231 cells, a cell line of mesenchymal and basal type characteristics. The results show that treatment with NaB has a marked induction of SERCA3a mRNA expression, with significant changes compared to control cells at 2 and 3 mM, 7.56 ± 1.33 and 14.12 ± 3.15 fold higher, respectively (*P* < 0.01) (Figure 2B). Significant changes were also observed between cells treated with 2 and 3 mM NaB (*P* < 0.01). Pan-SERCA3 mRNA expression was 27.72 ± 1.12 fold higher than control cells at 3 mM NaB (*P* < 0.001), which was higher to SERCA3a expression (27.72 ± 1.12 vs 14.12 ± 3.15 ; *P* < 0.01).

Treatment of MDA-MB-231 cells with 75 and 100 nM TSA also showed significant differences in SERCA3a mRNA expression, 2.5 ± 0.36 and 8.5 ± 0.68 fold higher than not treated cells, respectively (*P* < 0.01) (Figure 2D). Pan-SERCA3 mRNA expression at 100 nM TSA was 6.44 ± 1.17 fold higher than control cells (*P* < 0.01); however, no significant difference was found between SERCA3a and pan-SERCA3 mRNAs at 100 nM TSA (8.5 ± 0.68 vs 6.44 ± 1.17 ; *P* = 0.071). SERCA2b mRNA expression

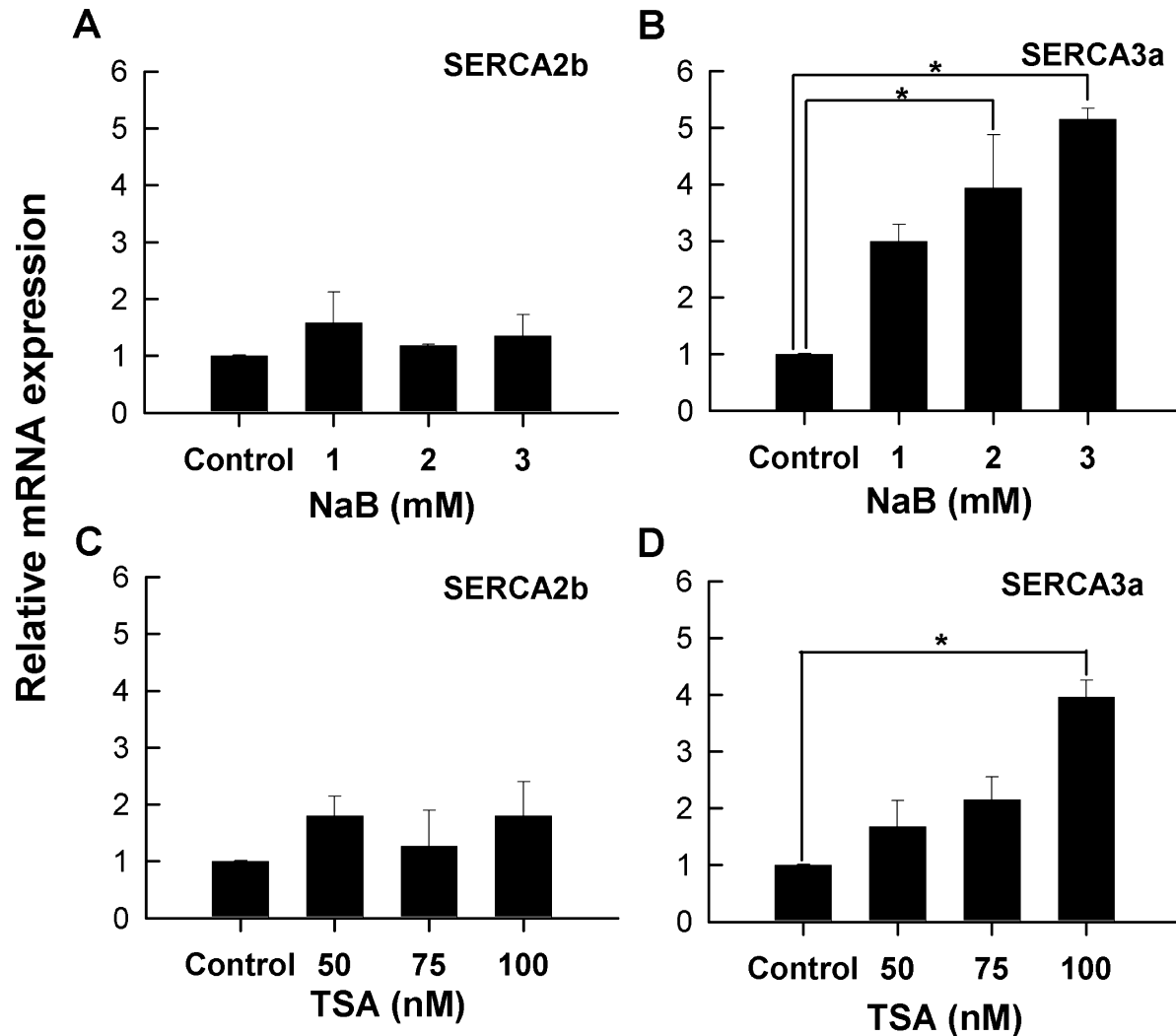


Figure 1. NaB or TSA treatment promote the expression of SERCA3a in MCF-7 cells, whereas SERCA2b expression does not change. MCF-7 cells were exposed to the indicated concentrations of NaB (A, B) or TSA (C, D) during 72 h, then SERCA2b and SERCA3a mRNA expression was determined by qRT-PCR analysis. Data are expressed as means \pm S.D. of three independent experiments performed in triplicate, * $P < 0.01$.

did not show changes in MDA-MB-231 cells treated with NaB or TSA (Figure 2A, C).

NaB and TSA Increase H3K9 Acetylation on ATP2A3 Promoter in MDA-MB-231 Cells

Since MDA-MB-231 cells showed a higher SERCA3a expression in response to NaB or TSA, we conducted ChIP assays with this cell line to explore changes in histone modifications as a result of NaB or TSA treatment. Both NaB and TSA increase H3K9-acetylation on the proximal promoter of ATP2A3 gene, with no apparent changes in H3K4me1. NaB also decreases H3K9me3 (Figure 3A and B). In addition, NaB and TSA treatment does not increase H3K9-acetylation on the ATP2A2 gene promoter. NaB even seems to increase H3K9me3 and H3K4me1 (Figure 3C and D).

5-aza-2'-Deoxycytidine does not Alter SERCA2b and SERCA3a mRNA Expression on MCF-7 and MDA-MB-231 Cells

To explore if methylation status of CpG islands present in the *ATP2A2* and *ATP2A3* promoter regions could contribute to SERCA2b or SERCA3a mRNA expression, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with different concentrations of 5-aza-2'-dC, a DNA methyltransferase inhibitor, followed by qRT-PCR. SERCA2b and SERCA3a mRNA expression did not change in both breast cancer cell lines treated with 1, 2 or 5 μ M of 5-aza-2'-dC (Figure 4).

DISCUSSION

The role of SERCA2 and SERCA3 isoforms in the control of calcium-regulated cell pathways, and the

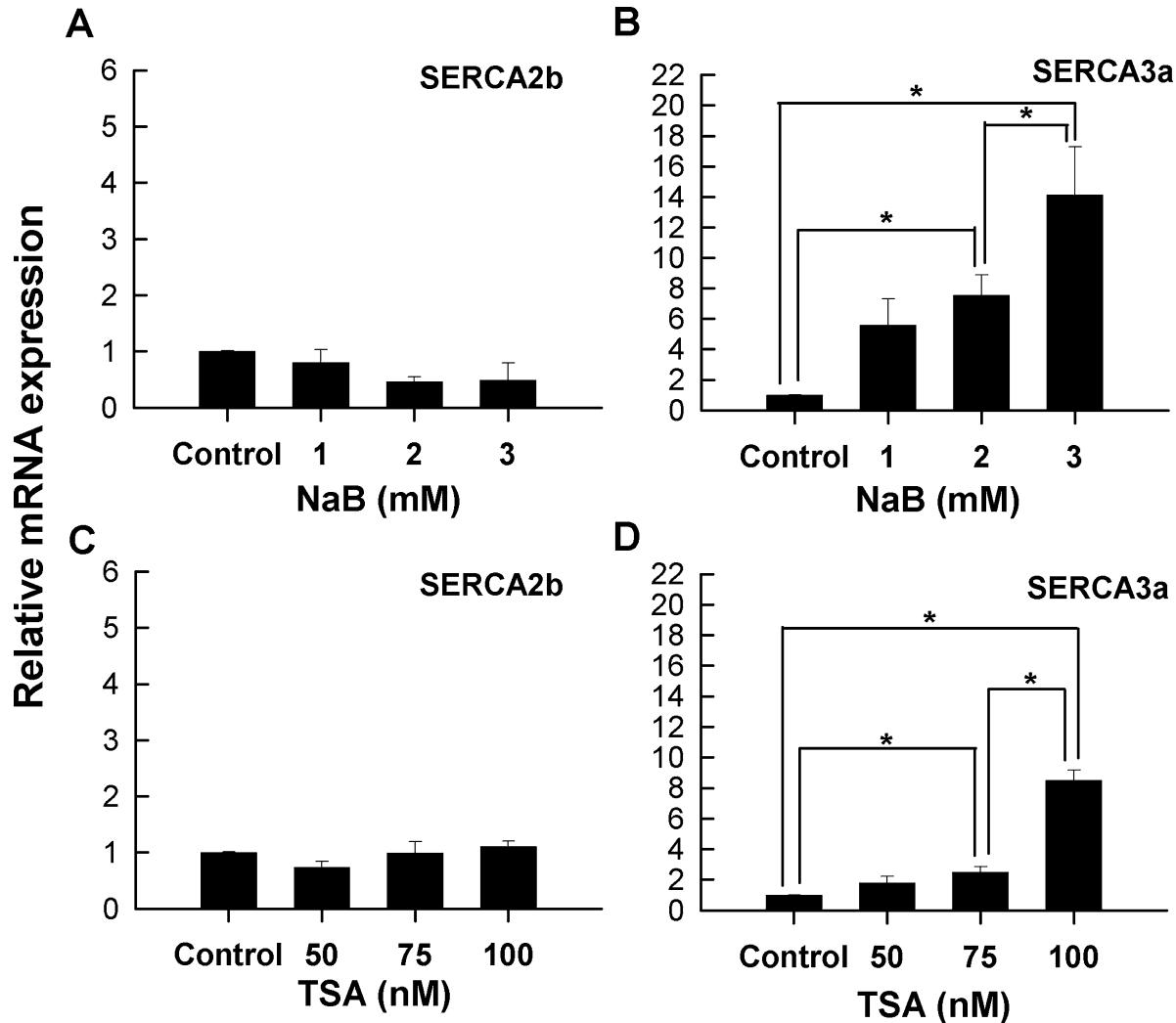


Figure 2. NaB or TSA induce the expression of SERCA3a in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were exposed to the indicated concentrations of NaB (A, B) or TSA (C, D) during 72 h, and SERCA2b or SERCA3a mRNA expression was determined by qRT-PCR analysis. Data are expressed as means \pm S.D. of three independent experiments performed in triplicate, * $P < 0.01$.

significance of the expression of multiple SERCA isoforms in cancer cells is not well understood. It has been shown that promoter methylation regulate the expression of the *ATP2A2* gene in oral cancer; whereas HDAC inhibitors increase SERCA3 protein expression in colon, gastric, and lung cancer cell lines, but until now it remains unknown whether these mechanisms might regulate the expression of SERCA2 and SERCA3 in breast cancer cells. Breast cancer is one of the most common types of cancer that affect women worldwide. In order to understand the role of HDAC inhibition and DNA methylation inhibition on the expression of the *ATP2A2* and *ATP2A3* genes, in this work we treated two human breast cancer cell lines (MCF-7 that is estrogen-receptor positive and MDA-MB-231 that is estrogen-receptor negative) with different concentrations of two HDACi (NaB or TSA) or 5-aza-2'-dC, a DNMT inhibitor.

We found that SERCA3 mRNA expression was markedly increased in both human breast cancer cell lines treated with NaB or TSA, in a dose-dependent manner; although, a higher stimulation was observed in MDA-MB-231 than in MCF-7 cells. We also observe, that NaB induced higher levels of SERCA3 mRNA expression than TSA in both cell lines. No significant difference was found between SERCA3a and pan-SERCA3 expression in MCF-7 cells treated with NaB or TSA, and MDA-MB-231 cells treated with TSA, suggesting that the main isoform expressed under these conditions was SERCA3a. Differences between SERCA3a and pan-SERCA expression were only found in MDA-MB-231 cells treated with 3 mM NaB; suggesting that under this condition other SERCA3 isoforms are also expressed. We did not find significant changes on SERCA2b mRNA expression at any concentration of NaB or TSA employed.

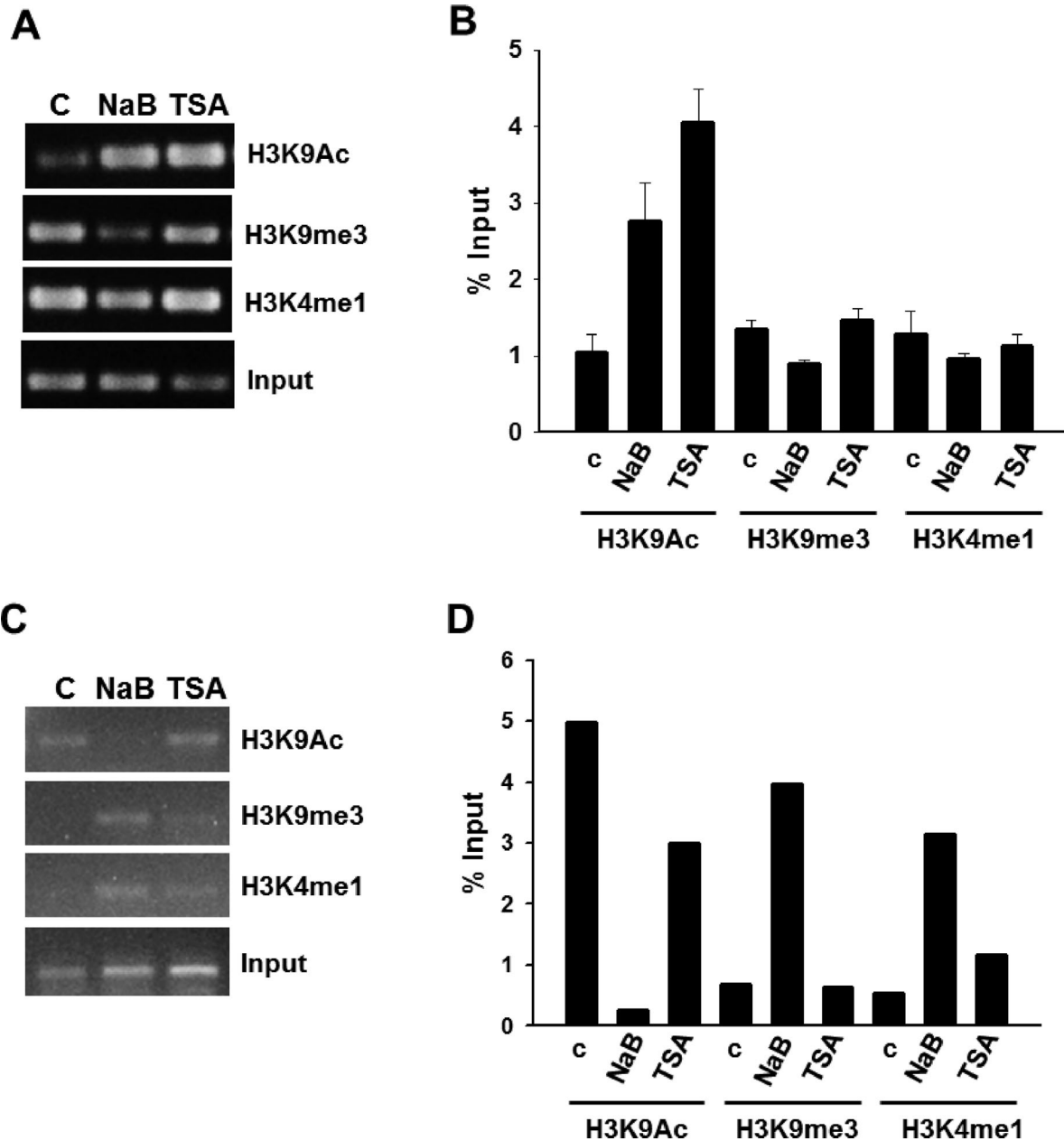


Figure 3. Chromatin immunoprecipitation assays show that NaB and TSA promote an increase of H3K9-acetylation on the ATP2A3 promoter but not on the ATP2A2 promoter. Chromatin from MDA-MB-231 cells treated with 2 mM NaB or 100 nM TSA was immunoprecipitated with the indicated antibodies for H3 modifications. A. Agarose gel (2%) of PCR products amplified with primers to the proximal region of ATP2A3 promoter (−137 to +37). Chromatin-DNA samples before immunoprecipitation (input) were included to show similar loading. B. Real-time PCR data obtained with the same

immunoprecipitated DNA samples as in A, reported as percent of input (means \pm S.D. of triplicates). Data are representative of two independent experiments. C. PCR products amplified with primers to the proximal region of ATP2A2 promoter (−181 to +32) separated in a 2% agarose gel. D. Densitometric analysis of the gel shown in C using the Image J software version 1.36b <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. H3K9Ac, H3K9-Acetyl; H3K9me3, H3K9-trimethyl; H3K4me1, H3K4-monomethyl; C, control; NaB, sodium butyrate; TSA, trichostatin A.

Our results are in agreement with previous studies, where gastric, colon, and lung cancer cells treated with butyrate and other short chain fatty acids showed a marked increase in SERCA3 protein expression, while SERCA2 protein expression did not change or was slightly decreased [17–20]. Decreased

or absent SERCA3 expression during tumorigenesis could result in abnormal calcium recapture within the ER and consequently, altered Ca^{2+} levels in the cell, which could be involved in loss of a differentiated phenotype and the acquisition of a cancerous phenotype [16–21].

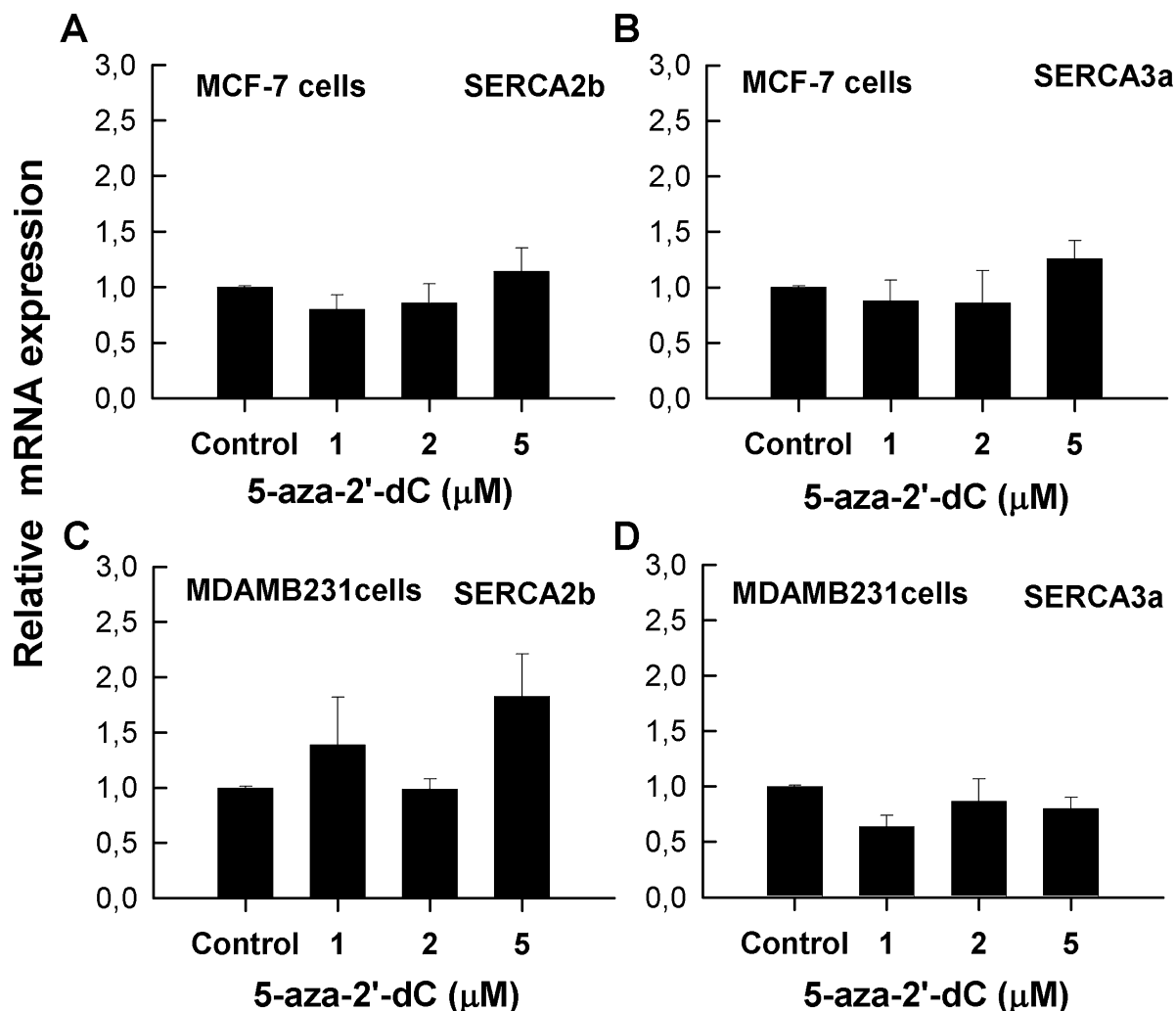


Figure 4. Treatment with 5-aza-2'-dC does not change SERCA2b and SERCA3a expression in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. MCF-7 (A, B) or MDA-MB-231 (C, D) were treated with 1, 2 or 5 μ M of 5-aza-2'-dC during 72 h, and SERCA2b or SERCA3a mRNA expression level was determined by qRT-PCR analysis. Data are expressed as means \pm S.D. of three independent experiments performed in triplicate.

It has been reported that HDACi modulate specific genes in human breast cancer cells. Insulin growth factors-binding proteins (IGFBP) and p21^(Waf1/Cip1) were significantly up-regulated by NaB in MCF-7 and Hs578T breast cancer cells [28]; whereas TSA induced the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p18 and p19 genes in MCF-7 and MDA-MB-231 [29]. In addition, another HDACi, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) up-regulates the expression of transforming growth factor- β receptor I in MCF-7L and ZR75 breast cancer cells, a signaling pathway involved in growth suppression of various cancer cells [30]. HDAC inhibitors alone or in combination with 5-aza-2'-dC restore estrogen receptor α (ER α) mRNA, and protein expression, and promote tamoxifen sensitivity in ER α negative breast cancer cells [23,27,31,32]. ER α expression was also reactivated by a combination of green tea polyphenol and HDACi, as well as by 5-aza-2'-dC, alone or combined

with green tea polyphenol in MDA-MB-231 breast cancer cells [23].

To understand the mechanism responsible for the up-regulation of SERCA3 by NaB and TSA, we conducted ChIP experiments. Our results show that NaB or TSA treatment of MDA-MB-231 cells increases H3K9-acetylation on the *ATP2A3* promoter. NaB but not TSA decreases H3K9-trimethylation. A correlation between histone acetylation and histone methylation has been observed in cells treated with NaB and other HDACi [33,34]. As the degree of H3 acetylation augments from un-, mono- to penta-acetylated forms of H3 in response to NaB, H3K4 and H3K79 methylation increase, while H3K9 methylation decreases and H3K9 acetylation increases [33,34]. H3K4 methylation was mediated by MLL4 methyl transferase [34]; whereas Zhang et al hypothesized that H3K9 acetyltransferase (HAT), H3K4 methyl transferase (Set 1) and K3K79 methyl

transferase (Dot 1) work synergistically in response to NaB [31]. In addition, NaB induces H4K8 and H4K12 acetylation [34,35]; however, NaB increases the acetylation of all four histone isoforms (H2A, H2B, H3, and H4) [34].

Increased acetylation and decreased methylation of H3K9 are epigenetic markers of transcriptional activation [36–38]. Together, increased levels of H3K9-acetylation and H3K4-methylation are markers of euchromatin while H3K9-trimethylation is associated with heterochromatin and transcriptional repression [36–38]. Therefore, our results suggest that NaB and TSA promote transcriptional activation of *ATP2A3* gene through a chromatin remodeling mechanism, from heterochromatin to euchromatin. Our data also suggest that higher levels of SERCA3 mRNA expression, induced by NaB than TSA, could be explained by a decrease of H3K9-trimethylation in combination with increased H3K9-acetylation.

Our ChIP results also indicate that NaB or TSA treatment does not increase H3K9Ac of the *ATP2A2* promoter; NaB even seems to increase H3K9me3. This probably explains, why we did not see stimulation of SERCA2b mRNA expression in response to NaB or TSA.

On the other hand, we did not find changes on SERCA2b or SERCA3a mRNA expression as a result of 5-aza-2'-dC treatment, suggesting that DNA methylation status does not play a role on the expression of both genes in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. According to these results, it has been reported that methylation status of *ATP2A3* promoter did not show any changes in head and neck carcinomas, colon, lung, and CNS tumors compared to their corresponding noncancerous tissue; no correlation between low expression and methylation status of the promoter region of *ATP2A3* gene was found [39,40]. These findings suggest that the *ATP2A3* promoter is not methylated in these types of cancer.

In conclusion, the results presented in this paper demonstrate that inhibition of HDACs with NaB or TSA promotes SERCA3 mRNA expression in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells in culture, through a chromatin remodeling mechanism. SERCA2b mRNA expression was not affected by NaB or TSA. Treatment with 5-aza-2'-dC did not change SERCA2b or SERCA3a mRNA expression, suggesting that DNA methylation does not regulate the expression of both genes in these two breast cancer cell lines. Therefore, we propose that alteration of SERCA2b/SERCA3a isoform expression ratio could affect Ca^{2+} management within the cell, and thus, the cellular pathways regulated by this cation could be compromised, such as cellular proliferation or apoptosis. Further experiments will be necessary to address these issues. Targeting *ATP2A3* expression with HDAC inhibitors, may enhance the effectiveness of therapies that act promoting calcium-regulated cell death pathways in cancer cells.

ACKNOWLEDGMENTS

E.C.-L. was supported by CONACyT scholarship 223272. This work was supported by grants PROMEP PTC-270 to J.S.-G., and PAPIIT-DGAPA-UNAM IN213613 to A.Z.-H. We thank Biol. Gabriela Rodríguez for technical assistance.

REFERENCES

- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2000;1:11–21.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2003;4:517–529.
- McConkey DJ, Orrenius S. Signal transduction pathways in apoptosis. *Stem Cells* 1996;14:619–631.
- Trump BF, Berezesky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 1995;9:219–228.
- MacLennan DH, Rice WJ, Green NM. The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo) plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *J Biol Chem* 1997;272:28815–28818.
- Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* 2002;32:279–305.
- Lytton J, MacLennan DH. Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca^{2+} -ATPase gene. *J Biol Chem* 1988;263:15024–15031.
- Dode L, Wuytack F, Kools PF, et al. cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 3 gene. *Biochem J* 1996;318:689–699.
- Brandl CJ, deLeon S, Martin DR, MacLennan DH. Adult forms of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem* 1987;262:3768–3774.
- Gélébart P, Martin V, Enouf J, Papp B. Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:676–684.
- Anger M, Samuel J-L, Marotte F, Wuytack F, Rappaport L, Lompré A-M. The sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase mRNA isoform, SERCA 3, is expressed in endothelial and epithelial cells in various organs. *FEBS Lett* 1993;334:45–48.
- Short AD, Bian J, Ghosh TK, Waldron RT, Rybak SL, Gill DL. Intracellular Ca^{2+} pool content is linked to control of cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4986–4990.
- Brini M, Carafoli E. Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev* 2009;89:1341–1378.
- Endo Y, Uzawa K, Mochida Y, et al. Sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase type 2 downregulated in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004;110:225–231.
- Pacifico F, Ulianich L, De Micheli S, et al. The expression of the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in thyroid and its down regulation following neoplastic transformation. *J Mol Endocrinol* 2003;30:399–409.
- Brouland J-P, Gélébart P, Kovács T, Enouf J, Grossmann J, Papp B. The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. *American J Pathol* 2005;167:233–242.
- Gélébart P, Kovács T, Brouland J-P, et al. Expression of endomembrane calcium pump in colon and gastric cancer cells: Induction of SERCA3 expression during differentiation. *J Biol Chem* 2002;277:26310–26320.
- Papp B, Brouland J-P. Altered endoplasmic reticulum calcium pump expression during breast tumorigenesis. *Breast Cancer (Auckl)* 2011;5:163–174.
- Arbabian A, Brouland J-P, Apáti Á, et al. Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during lung cancer cell differentiation. *FEBS J* 2013;280:5408–5418.

20. Ait-Ghezali L, Arbabian A, Jeibmann A, et al. Loss of endoplasmic reticulum calcium pump expression in choroid plexus tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014;40:726–735.
21. Papp B, Brouland J-P, Arbabian A, et al. Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer cell differentiation. *Biomolecules* 2012;2:165–186.
22. Wei M, Xu J, Dignam J, et al. Estrogen receptor alpha, BRCA1, and FANCF promoter methylation occur in distinct subsets of sporadic breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2008;111:113–120.
23. Li Y, Yuan YY, Meeran SM, Tollefsbol TO. Synergistic epigenetic reactivation of estrogen receptor- α (ER α) by combined green tea polyphenol and histone deacetylase inhibitor in ER α -negative breast cancer cells. *Mol Cancer* 2010;9:274.
24. Wozniak RJ, Klimecki WT, Lau SS, Feinstein Y, Futscher BW. 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. *Oncogene* 2007;26:77–90.
25. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 2003;339:62–66.
26. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
27. Zhou Q, Atadja P, Davidson NE. Histone deacetylase inhibitor LBH589 reactivates silenced estrogen receptor alpha (ER) gene expression without loss of DNA hypermethylation. *Cancer Biol Ther* 2007;6:64–69.
28. Tsubaki J, Choi WK, Ingermann AR, et al. Effects of sodium butyrate on expression of members of the IGF-binding protein superfamily in human mammary epithelial cells. *J Endocrinol* 2001;169:97–110.
29. Malinen M, Saramäki A, Ropponen A, Degenhardt T, Väisänen S, Carlberg C. Distinct HDACs regulate the transcriptional response of human cyclin-dependent kinase inhibitor genes to Trichostatin A and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3. *Nucleic Acids Res* 2008;36:121–132.
30. Ammanamanchi S, Brattain MG. Restoration of transforming growth factor- β signaling through receptor RI induction by histone deacetylase activity inhibition in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2004;279:32620–32625.
31. Jang ER, Lim SJ, Lee ES, et al. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A sensitizes estrogen receptor alpha-negative breast cancer cells to tamoxifen. *Oncogene* 2004;23:1724–1736.
32. Sharma D, Saxena NK, Davidson NE, Vertino PM. Restoration of tamoxifen sensitivity in estrogen receptor-negative breast cancer cells: Tamoxifen-bound reactivated ER recruits distinctive corepressor complexes. *Cancer Res* 2006;66:6370–6378.
33. Zhang K, Siino JS, Jones PR, Yau PM, Bradbury EM. A mass spectrometric “Western blot” to evaluate the correlations between histone methylation and histone acetylation. *Proteomics* 2004;4:3765–3775.
34. Nightingale KP, Gendreizig S, White DA, Bradbury C, Hollfelder F, Turner BM. Cross-talk between histone modifications in response to histone deacetylase inhibitors: MLL4 links histone H3 acetylation and histone H3K4 methylation. *J Biol Chem* 2007;282:4408–4416.
35. Kumar P, Periyasamy R, Das S, Neerukonda S, Mani I, Pandey KN. All-trans retinoic acid and sodium butyrate enhance natriuretic peptide receptor a gene transcription: Role of histone modification. *Mol Pharmacol* 2014;85:946–957.
36. Litt MD, Simpson M, Gaszner M, Allis CD, Felsenfeld G. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science* 2001;293:2453–2455.
37. Lachner M, Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Current Opinion Cell Biol* 2002;14:286–298.
38. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007;128:693–705.
39. Glavač D, Volavšek M, Ravnik-Glavač M. Alterations in genes encoding sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca(2+) pumps in association with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;181:112–118.
40. Korošec B, Glavač D, Volavšek M, Ravnik-Glavač M. ATP2A3 gene is involved in cancer susceptibility. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;188:88–94.

Anexo III

Artículo de revisión



Enfermedades asociadas con mutaciones y cambios en la expresión de las ATPasas-Ca²⁺ del retículo sarco(endo)plásmico

Diseases associated with mutations and changes in expression of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases

Erika Contreras-Leal^{1,2}, Ángel Zarain-Herzberg³, Juan Santiago-García²

Recibido: 14/06/2010 - Aceptado: 22/07/2010

RESUMEN

En este artículo de revisión se describe la estructura y función de las ATPasas de Ca²⁺ del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA, por sus siglas en inglés: Sarco(Endo)plasmic Reticulum Calcium ATPases) y se analiza el efecto de algunas mutaciones y alteraciones de su expresión en diversas patologías. Las enzimas SERCA catalizan el transporte activo de iones Ca²⁺ del citoplasma al lumen del retículo sarco(endo)plásmico, en contra de su gradiente de concentración. Estas enzimas tienen un papel importante en la regulación de los procesos celulares activados por calcio, como contracción muscular, liberación de neurotransmisores, expresión genética, apoptosis y proliferación celular, entre otros. En vertebrados superiores existen tres genes que codifican para las enzimas SERCA (SERCA1 a 3), pero la edición alterna de sus mensajeros da origen a una gran diversidad de isoformas, un proceso regulado de manera específica durante el desarrollo. La correcta expresión y actividad de estas enzimas es muy importante para el buen funcionamiento celular. Las mutaciones en el gen SERCA1 se han asociado con la enfermedad de Brody, una miopatía hereditaria; y mutaciones en el gen SERCA2, con la enfermedad de Darier, una enfermedad de la piel. También se han encontrado alteraciones en la expresión y/o actividad de las enzimas SERCA en enfermedades cardíacas y recientemente en varios tipos de cáncer. Por lo anterior, resulta importante comprender el papel que desempeñan estas enzimas en la fisiología celular para poder entender qué ocurre en procesos patológicos.

Palabras clave: calcio, enzimas SERCA, cáncer, expresión génica.

ABSTRACT

This review describes the structure and function of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases (SERCA), and analyzes the effects of mutations and alterations in their expression in some pathologies. SERCA enzymes catalyze the active transport of Ca²⁺ from the cytoplasm to the sarco(endo)plasmic reticulum against a concentration gradient. These enzymes play an important role in cellular processes activated by calcium, such as: muscular contraction, gene expression, apoptosis, cell proliferation, among others. In higher vertebrates, there are three genes encoding SERCA enzymes (SERCA1-3), but multiple isoforms are generated by alternative splicing of the mRNA from these genes, a tissue-specific process and regulated during development. The correct activity and expression of these enzymes is essential for cell metabolism. Mutations on SERCA1 gene have been associated with Brody's disease, a recessive myopathy; whereas mutations on SERCA2 gene have been associated with Darier's disease, a skin disorder. Alterations on expression and activity of SERCA enzymes have been also found in heart failure, and recently in several types of cancer. Therefore, it is important to understand the role of these enzymes in normal physiology of the cell, in order to understand what occurs in some pathologies.

Key words: calcium, SERCA enzymes, cancer, gene expression.

¹Doctorado en Ciencias Biomédicas.

²Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Veracruzana.

³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Correspondencia:

Dr. Juan Santiago-García

Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Veracruzana

Dr. Luis Castelazo Ayala S/N, Xalapa, Ver., CP 91190, México

jusantiago@uv.mx

Tel: 228-841-8900 ext. 13105

Fax: (228) 841-8911

INTRODUCCIÓN

El ión calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero que tiene gran importancia en el metabolismo celular. En respuesta a señales extra e intracelulares se liberan iones Ca^{2+} del lumen del retículo endoplásmico al citosol y hay una entrada masiva de Ca^{2+} del espacio extracelular hacia el citoplasma. Ambos procesos son mediados por canales de Ca^{2+} , quienes transportan este catión a favor de su gradiente de concentración. El aumento en la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma de las células constituye una parte integral en la activación de diversos componentes de las vías intracelulares de señalización, tales como la calpaína o isoenzimas de la proteína cinasa C, o por los complejos Ca^{2+} -calmodulina, como las cinasas dependientes de calmodulina, calcineurina, entre otros¹. Estas vías regulan varios procesos celulares tan importantes como la contracción muscular, la actividad neuronal, la proliferación celular y la apoptosis, entre otros¹.

La concentración intracelular de Ca^{2+} en una célula en estado de reposo es aproximadamente 20-100 nM, mientras que en el espacio extracelular es más de mil veces mayor, aproximadamente de 2 mM. Por su parte, en el lumen del retículo endoplásmico es del orden de 100-500 μM , varias veces mayor que en el citoplasma^{2,3}. Estos gradientes de concentración de Ca^{2+} se mantienen por la actividad de las ATPasas de Ca^{2+} del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA), que transportan el Ca^{2+} del citoplasma al interior de este organelo y las ATPasas de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA, por Plasma Membrane Calcium ATPases), que transportan el Ca^{2+} al exterior de la célula (Figura 1). Estas enzimas utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para transportar el Ca^{2+} en contra de su gradiente de concentración. La actividad de las enzimas SERCA contribuye a remover aproximadamente el 90% del Ca^{2+} citosólico libre, mientras que las PMCA transportan cerca del 10% del Ca^{2+} citoplásmico⁴.

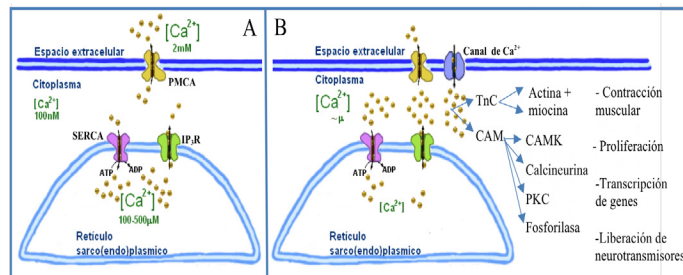


Figura 1. Mecanismos que regulan la concentración intracelular de Ca^{2+} . En el panel A se muestran las concentraciones intracelulares y extracelulares de Ca^{2+} y tres de las proteínas que participan en la homeostasis de este catión: la ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA), la enzima SERCA y el canal de liberación de calcio activado por IP3 (IP3R). Panel B, en respuesta a señales celulares y extracelulares hay liberación de Ca^{2+} del lumen del RE y entrada masiva de Ca^{2+} del espacio extracelular. El aumento en la concentración citoplásmica de Ca^{2+} activa varias proteínas involucradas en procesos celulares importantes, como la proliferación celular, contracción muscular y expresión génica, entre otros.

Las enzimas SERCA se encargan de mantener los gradientes intracelulares de Ca^{2+} al participar activamente en la recaptura de este catión y con ello regulan la activación de las vías de señalización dependientes de Ca^{2+} . Los círculos pequeños representan los iones Ca^{2+} .

Algunas células, como musculares y las neuronas, que utilizan de forma intensa la señalización de Ca^{2+} , disponen también de un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ en su membrana plasmática, quienes transportan el Ca^{2+} al espacio extracelular. Estos intercambiadores tienen una afinidad relativamente baja por el Ca^{2+} , por lo cual sólo actúan de forma eficiente cuando los niveles de Ca^{2+} citosólico aumentan 10 veces por arriba de sus valores en estado de reposo, como ocurre después de la estimulación repentina de una célula nerviosa o muscular⁵.

La función y expresión correcta de las enzimas SERCA es importante para el buen funcionamiento celular, ya que las alteraciones en los gradientes de concentración de Ca^{2+} citoplásmico y del retículo endoplásmico (RE) pueden activar mecanismos de señalización, alterar la expresión de genes, la proliferación celular, causar toxicidad celular e inducir carcinogénesis o muerte celular⁶⁻⁹. Estas enzimas tienen una participación importante en el proceso de contracción-relajación del músculo cardíaco, razón por la cual su actividad y expresión se ha estudiado extensamente en cardiopatías, como la hipertrofia e insuficiencia cardíaca, y se ha encontrado que la expresión y la actividad de la enzima SERCA están disminuidas¹⁰⁻¹³.

Por otro lado, se ha observado que la actividad de la enzima SERCA1 está reducida en músculo esquelético de contracción rápida en pacientes con la enfermedad de Brody^{14,15}. Estas observaciones apuntaron a una posible participación del gen SERCA1 en esta enfermedad y la secuenciación de este gen en familias afectadas con la enfermedad de Brody lo confirmó^{16,17}. A su vez, el mapeo genético realizado con familias afectadas por la enfermedad de Darier demostró que mutaciones en el gen SERCA2 dan origen o se asocian con el desarrollo de esta enfermedad¹⁸.

El desarrollo de ratones transgénicos de los genes SERCA ha permitido una mejor comprensión del papel de estas enzimas en la fisiología celular, cardiopatías y otros padecimientos. De manera sorprendente se encontró que los ratones mutantes que expresan una sola copia funcional del gen SERCA2, desarrollan cáncer en las células epiteliales de la cavidad oral y del tracto digestivo, sugiriendo la participación de esta enzima en el desarrollo del cáncer¹⁹. Este hallazgo ha llevado a varios grupos de investigación a estudiar la expresión de los genes SERCA en diversos tipos de cáncer en humanos, y se ha encontrado que la expresión del gen SERCA2 está disminuida en cáncer oral, mientras que la expresión de SERCA3 está disminuida o ausente en cáncer de colon y gástrico^{20,21}. Por lo anterior, el objetivo

de esta revisión es analizar la evidencia actual sobre el papel que tienen las mutaciones y los cambios en la expresión de las enzimas SERCA en el desarrollo de diversas patologías, como las enfermedades de Darier y Brody, cardiopatías y cáncer.

Estructura y función de las enzimas SERCA

Estudios de biología molecular y cristalografía de rayos X han permitido determinar que las enzimas SERCA están formadas por una sola cadena polipeptídica de unos 1000 aminoácidos, con una masa molecular aproximada de 110 kDa^{22,23}. Estas enzimas constan de 4 dominios principales: un dominio M formado por 10 hélices- α transmembranales y 3 dominios citosólicos que conforman la cabeza globular de la enzima: el dominio de unión al nucleótido (N), el dominio de fosforilación (P), que en conjunto forman el dominio catalítico y el dominio accionador (A) (Figura 2). El dominio A y el dominio P están conectados al dominio M, que rodean el sitio de unión al ión Ca^{2+} ^{23,24}. Estudios de mutagénesis dirigida y expresión *in vitro*, demostraron que los sitios de unión al Ca^{2+} se localizan principalmente en grupos carboxilo de los residuos de ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu) en las hélices M4, M5 y M6²⁴. Estos sitios de unión al Ca^{2+} pueden existir en un estado de alta afinidad, permitiendo el acceso de los iones Ca^{2+} del citosol, o en un estado de baja afinidad, orientado hacia el lumen del RE^{23,24}.

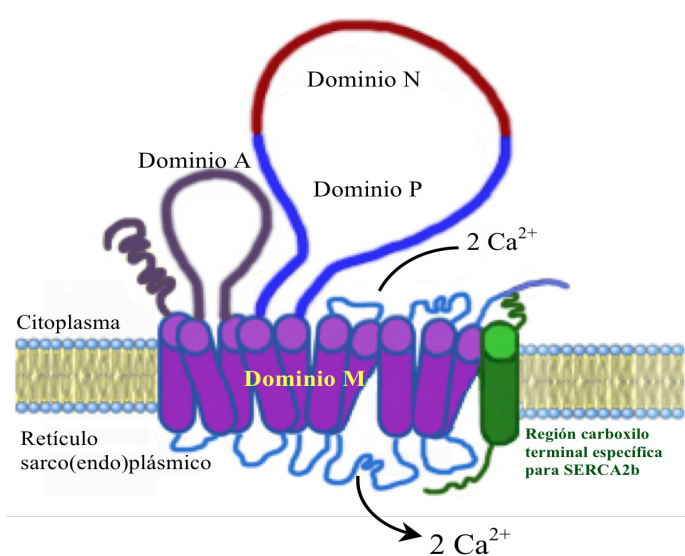


Figura 2. Estructura de las enzimas SERCA. En la cara citoplásmica se encuentran tres dominios globulares: el dominio N (unión al nucleótido), en donde se une el ATP; el dominio P (fosforilación) contiene el residuo Asp351 que sufre fosforilaciones reversibles; y el dominio A (accionador) que se supone está involucrado en la exposición del Ca^{2+} al citosol o al lumen del retículo endoplásmico. Se observan las 10 hélices transmembranales que constituyen el dominio M de las enzimas SERCA, las cuales participan en la translocación de los iones Ca^{2+} . También se muestra la hélice transmembranal número 11, exclusiva de la isoforma SERCA2b.

Las enzimas SERCA tienen grandes cambios conformacionales durante el proceso de transporte de los iones Ca^{2+} . En la primera etapa del ciclo catalítico de la enzima, dos iones Ca^{2+} se unen al dominio M en su conformación de alta afinidad por Ca^{2+} (E1); casi de inmediato el ATP se une al residuo de lisina (Lys515), localizado en el dominio N. La enzima tiene un cambio conformacional que favorece el acercamiento del ATP, del dominio N al dominio P, para fosforilar un residuo de aspártico, lo que genera un intermediario fosforilado (E1P). La energía liberada de la hidrólisis del ATP permite a la enzima cambiar su conformación, de E1P a E2P, que muestra baja afinidad por el Ca^{2+} . Con este cambio conformacional, el Ca^{2+} queda expuesto hacia el interior del lumen del retículo sarco(endo)plásmico; se produce la liberación del Ca^{2+} y la hidrólisis del intermediario fosforilado. Tras la disociación del intermediario fosforilado y liberación de P_i , la enzima SERCA vuelve a su conformación E1 para iniciar otro ciclo catalítico²⁴⁻²⁶.

Genética de las enzimas SERCA

En vertebrados superiores existen tres genes homólogos que codifican para las enzimas SERCA: SERCA1, SERCA2 y SERCA3, también referidos como ATP2A1, ATP2A2 y ATP2A3²⁷⁻²⁹. El gen SERCA1 da origen a dos isoformas por la edición alterna del ARN mensajero (ARNm); SERCA1a se expresa en músculo de contracción rápida de adulto y SERCA1b se expresa en el mismo tejido en etapa neonatal (Figura 3a). La secuencia de ambas isoformas es idéntica hasta el aminoácido 993; sin embargo, la edición alterna provoca un ligero cambio en la región carboxilo terminal. SERCA1a consta de 994 aminoácidos, mientras que SERCA1b consta de 1001 aminoácidos^{30,31}.

Por su parte, el gen SERCA2 codifica para tres isoformas, producidas por la edición alterna del ARNm, denominadas SERCA2a, SERCA2b y SERCA2c (Figura 3b). La isoforma SERCA2a se expresa predominantemente en el músculo cardíaco y, en menor cantidad, en el músculo esquelético de contracción lenta, aunque también se expresa en niveles más bajos en el músculo liso y en tejidos no musculares. La isoforma SERCA2b se expresa en la mayoría de los tipos celulares, principalmente en músculo liso y en tejidos no musculares, aunque algunos autores consideran que se expresa de forma ubicua en el organismo^{27,32-34}. La isoforma SERCA2c se expresa durante la diferenciación monocítica y en varios tipos de células no musculares³⁵. La secuencia de las tres isoformas es idéntica hasta el aminoácido 993; sin embargo, la edición alterna del mensajero provoca un ligero cambio en la región carboxilo terminal. De esta manera, SERCA2a consta de 997 aminoácidos; SERCA2b, de 1042; y SERCA2c, de 999 (Figura 3b).

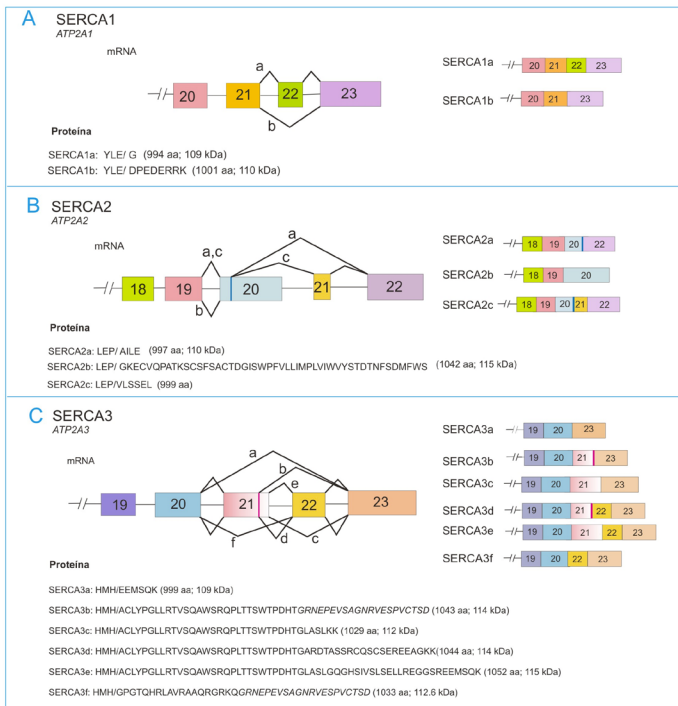


Figura 3. Edición alternativa de los mensajeros que codifican para las enzimas SERCA1, 2 y 3. Los transcritos primarios de los tres genes SERCA sufren edición alternativa, evento que genera diversas isoformas. A) La edición alternativa del ARN mensajero de SERCA1 genera dos isoformas; una que carece del exón 22 (isoforma a) y la otra que lo incluye (isoforma b). B) El ARNm de SERCA2 da origen a tres variantes, SERCA2a incluye parte del exón 20 que empalma con el exón 22; SERCA2b incluye el exón 20 completo y excluye los exones 21 y 22; SERCA2c incluye parte del exón 20 que empalma con el exón 21 y éste a su vez con el exón 22. C) El procesamiento del transcrito primario de SERCA3 es más complejo y genera seis variantes. El ARNm de SERCA3a excluye al exón 21 y 22, mientras que SERCA3b y SERCA3c insertan parcial o totalmente el exón 21, mientras que SERCA3d y SERCA3e incluyen parcial o totalmente el exón 21, e incluyen el exón 22. El ARNm de SERCAf carece del exón 21 pero incluye el exón 22. Debajo de los tres esquemas que representan la edición de los mensajeros se encuentra la secuencia de aminoácidos carboxilo terminal de las proteínas SERCA, para mostrar la diferencia que existe en esta región entre las diversas isoformas (Modificado de Wuytack y col, 2002).

La edición alternativa del mensajero del gen SERCA3 es más compleja; da origen a seis isoformas denominadas SERCA3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f^{24,36,37}. Estas isoformas difieren entre sí únicamente en la región carboxilo terminal (Figura 3c). Este gen se expresa en una gran variedad de tejidos no musculares, principalmente en células endoteliales, células de origen hematopoyético, células β -del páncreas y células de Purkinje. SERCA3 casi siempre co-expresa con SERCA2b³⁸. Aunque todas las enzimas SERCA bombean Ca^{2+} del citoplasma al lumen del retículo sarco(endo)plásmico, las características bioquímicas de las isoformas difieren sustancialmente³⁹. La diferencia principal radica en su afinidad y capacidad de transporte de Ca^{2+} . Al expresarlas en células COS en cultivo, la isoforma SERCA2b tiene mayor afinidad por Ca^{2+} , pero menor velocidad catalítica que SERCA2a. En el caso de las isoformas de la enzima SERCA3 todas manifiestan una afinidad

por Ca^{2+} similar, pero regulan las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} y del RE de manera diferente; las isoformas SERCA3a, 3b, 3d y 3e tienen una mayor actividad de transporte de Ca^{2+} , en comparación con la isoforma SERCA3c⁴⁰.

Por otra parte, SERCA3 tiene una menor afinidad por Ca^{2+} ($K_{ca} = 1.2 \mu M$) que la enzima SERCA2b ($K_{ca} = 0.2 \mu M$), y tanto las enzimas SERCA3 como SERCA1 poseen una mayor velocidad catalítica que las enzimas SERCA2³⁹, además de un menor pH óptimo de actividad⁴¹. La menor afinidad de la enzima SERCA3 por el Ca^{2+} podría sugerir que únicamente se activa cuando el Ca^{2+} alcanza concentraciones micromolares en el citoplasma, por ejemplo después de una estimulación masiva o durante el pico de oscilaciones citosólicas de Ca^{2+} ⁴². La actividad de las enzimas SERCA se regula por la interacción con dos proteínas que actúan como inhibidores endógenos reversibles, fosfolamban y sarcolipina, las cuales se encuentran en la membrana del retículo endoplásmico⁴³⁻⁴⁵. Fosfolamban en su estado desfosforilado se asocia con las enzimas SERCA1a, SERCA2a y SERCA2b, inhibiéndolas. La inhibición se manifiesta por una disminución aparente de la afinidad por Ca^{2+} y en su capacidad para transportar Ca^{2+} . Mientras que la fosforilación de fosfolamban, por la proteína cinasa dependiente de AMPc (en respuesta a la estimulación de los receptores β -adrenérgicos), impide la asociación con SERCA, resultando en un incremento considerable en la actividad de la enzima^{10,46}. Fosfolamban no interacciona con la enzima SERCA3, debido a que ésta no posee una secuencia de reconocimiento de seis aminoácidos en el dominio N, que sí se encuentra en las enzimas SERCA1 y SERCA2⁴⁰. La actividad de SERCA2b también se regula por las proteínas calreticulina y calnexina, presentes en el retículo endoplásmico, que al unirse a la enzima incrementan su afinidad por Ca^{2+} y disminuyen su velocidad catalítica^{47,48}.

Recientemente se demostró que la proteína anti-apoptótica Bcl-2 puede afectar la actividad de la enzima SERCA2⁴⁹. Los datos recabados hasta la fecha sugieren que Bcl-2 ejerce un efecto anti-apoptótico al mantener la concentración de Ca^{2+} en el lumen del retículo endoplásmico por debajo del umbral de los niveles de Ca^{2+} requerido para activar las redes de señalización que conducen a la apoptosis dependiente de Ca^{2+} ⁴⁹. Aunque la forma de interacción de estas dos proteínas no es del todo clara, se sabe que Bcl-2 disminuye la actividad de SERCA2 y con ello la concentración de Ca^{2+} en el lumen del RE⁴⁹. El inhibidor más específico de todas las enzimas SERCA y que no afecta a otras bombas de Ca^{2+} , es la tapsigargina, una lactona sesquiterpénica que se extrae de las raíces de *Thapsia garganica*. Este inhibidor se une a SERCA en la conformación E2 y la inhibe de manera irreversible⁵⁰.

Enfermedades asociadas con mutaciones y cambios en la expresión de los genes SERCA

Enfermedad de Brody. Ésta es una enfermedad muscular rara que se puede transmitir de forma autosómica dominante o recesiva, descrita por primera vez por el Dr. Irwin A. Brody⁵¹. Esta miopatía congénita se caracteriza por un aumento perjudicial en el tiempo de relajación del músculo esquelético, calambres sin dolor y rigidez durante el ejercicio¹⁶. Al estudiar dos familias afectadas por la enfermedad de Brody se identificaron tres mutaciones en el gen SERCA1; una ocurre en el sitio donador del intrón 3 (cambio de GT por CT), y las otras dos dan origen a codones de paro prematuros (C592T, C2025A), lo que resulta en una proteína truncada no funcional¹⁶ (Cuadro 1). Otras tres mutaciones identificadas en seis familias codifican para codones de término prematuros y una mutación sin sentido que inactiva a la proteína¹⁷ (Cuadro 1). Las mutaciones en el gen SERCA1 únicamente se han asociado con la forma autosómica recesiva de la enfermedad¹⁶.

En condiciones normales, la contracción de las fibras musculares es inducida por la liberación de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico, mientras que la relajación de estas fibras ocurre por la disminución de las concentraciones de Ca²⁺ citosólico, proceso llevado a cabo principalmente por la enzima SERCA1. Debido a que las mutaciones antes mencionadas ocasionan la pérdida de la función de la enzima SERCA1, el transporte de Ca²⁺ hacia el retículo sarcoplásmico se ve afectado y con ello la relajación de las fibras musculares se vuelve más lenta¹⁵.

Cuadro 1. Enfermedades asociadas con mutaciones en los genes SERCA1 y SERCA2

Gen	Mutación	Consecuencia	Enfermedad asociada	Referencia
SERCA1	C592T C2025A Cambio de GT a CT, sitio donador intrón 3	Codones de paro prematuros, proteína truncada no funcional.	Enfermedad de Brody	[16]
SERCA2	N39D ΔP42 Q790X S920Y T357K	Afectan la actividad de la enzima, algunas son mutaciones sin sentido, deleciones, corrimiento del marco de lectura, entre otras.	Enfermedad de Darier y en algunos casos anomalías neuropsiquiátricas como esquizofrenia, epilepsia y otras.	[18, 52, 53]

Enfermedad de Darier. Ésta es una alteración autosómica dominante de la piel que provoca queratinización anormal (disqueratosis) y pérdida de adhesión entre las células epidérmicas (acantolisis)¹⁸. La enfermedad se caracteriza por la aparición de pápulas hiperqueratósicas en áreas seboreicas de la piel (tronco y cara: arriba del pecho, a los lados del cuello, en la frente, etc.) y en los flexores, en donde pueden formar, por confluencia, placas mal olientes que pueden desprenderse. Las

primeras lesiones aparecen con frecuencia durante la pubertad y los síntomas se pueden exacerbar por exposición a los rayos solares, radiación ultravioleta, calor, fricción e infecciones⁵⁴.

En pacientes con la enfermedad de Darier se han reportado más de 130 mutaciones en el gen SERCA2 distribuidas en toda la molécula; no hay evidencia de que ocurran en regiones específicas del gen^{15,18}; algunas de ellas se mencionan en el Cuadro 1. La mayoría de las mutaciones identificadas son: cambio de un amino ácido por otro en el 50% de los casos, deleciones o inserciones 8% de los casos, mutaciones sin sentido (12%) y corrimiento del marco de lectura (23%), que dan origen a codones de paro prematuro¹⁵. Dentro de las consecuencias funcionales derivadas de estas mutaciones se han reportado alteración o pérdida de la capacidad de la enzima SERCA2 para transportar el Ca²⁺ y en la homeostasis de Ca²⁺ del retículo sarco(endo)plásmico^{52,53,55}. También se encontró que algunas de estas mutaciones correlacionan con enfermedades neuropsiquiátricas, entre las que se encuentran retraso mental, esquizofrenia, trastorno bipolar y epilepsia⁵⁶ (Cuadro 1).

Enfermedades cardiacas. Diversos padecimientos o condiciones pueden afectar la función del corazón: la diabetes, la obesidad, hipertensión, isquemia, entre otros. Estas condiciones nocivas pueden propiciar mayor esfuerzo o sobrecarga cardiaca; para compensar estas demandas y aumentar el bombeo de sangre al organismo, el corazón puede sufrir modificaciones como la dilatación de las cavidades (cardiopatía dilatada), o aumento en el grosor de las paredes y tamaño del corazón (hipertrofia cardíaca). Sin embargo, con el tiempo estas cardiopatías debilitan la capacidad de bombeo del corazón y desembocan en un padecimiento más serio: la insuficiencia cardiaca, condición patológica que se caracteriza por una disminución en la capacidad de bombeo del corazón, situación que lleva a un desbalance entre el suministro y la demanda de sangre de los órganos y tejidos¹¹. Este padecimiento constituye una de las principales causas de morbi-mortalidad en las sociedades contemporáneas. En la hipertrofia e insuficiencia cardiaca hay un marcado cambio en la contractilidad del miocardio; tanto la contracción como la relajación se hacen más lentas^{12,57}. Estos cambios van acompañados de alteraciones en los movimientos intracelulares de Ca²⁺; la liberación y recaptura de Ca²⁺ son más lentas^{12,58,59}.

Las enzimas SERCA desempeñan un papel clave en el control de la contracción del músculo cardiaco durante el acoplamiento del mecanismo de contracción-relajación. La contracción muscular ocurre por el aumento en las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ en respuesta a potenciales de acción; mientras que la relajación ocurre por la rápida recaptura de este catión al RS, proceso mediado por las

enzimas SERCA. Por esta razón, diversos grupos de investigación han estudiado la actividad y expresión de la enzima SERCA2 en cardiopatías, tanto en modelos animales como en biopsias y tejido *postmortem* de humanos. Se ha encontrado que la actividad de la enzima SERCA2 está disminuida en casi todos los modelos animales de insuficiencia cardiaca, lo que resulta en disminución del transporte de Ca²⁺ hacia el lumen del RE^{10,12,13}. En paralelo, se ha encontrado que la expresión genética de esta enzima está disminuida en el miocardio en modelos animales de insuficiencia cardiaca y en muestras de pacientes con hipertrofia e insuficiencia cardiaca¹⁰⁻¹³. La reducción en la expresión y actividad de la enzima SERCA juega un papel importante en el desarrollo de esta condición.

A partir de estos hallazgos, se han desarrollado estrategias para incrementar la expresión de la enzima SERCA2 en el miocardio de animales experimentales con hipertrofia e insuficiencia cardiaca, encontrándose que al sobre-expresar SERCA2 en el miocardio de estos animales, por medio de adenovirus, hay un aumento en la actividad ATPasa-Ca²⁺, mayor liberación de Ca²⁺ del RS y disminución en el tiempo de relajación⁶⁰⁻⁶². Resultados similares se han encontrado al sobre-expresar el gen SERCA2 en cardiocitos de pacientes con insuficiencia cardiaca en cultivo⁶⁰. Estos resultados alentadores han permitido la aprobación del primer protocolo de terapia génica para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca; los pacientes recibirán copias del gen SERCA2 en el miocardio, con el fin de aumentar la expresión de esta enzima⁶².

Por otro lado, se ha investigado la presencia de mutaciones en el gen SERCA2 en pacientes con hipertrofia e insuficiencia cardiaca; hasta la fecha no se han encontrado mutaciones que afecten la función de este gen, pero algunas mutaciones en el gen regulador fosfolamban se han asociado con disminución de la actividad de SERCA2a, desarrollo de cardiomiopatías e insuficiencia cardiaca. Una de estas mutaciones (R9C), encontrada en una familia norteamericana con cardiomiopatía dilatada de tipo hereditario, favorece que fosfolamban permanezca en estado no fosforilado (unido a la enzima SERCA), afectando con ello la afinidad de SERCA2a por Ca²⁺ y disminuyendo su actividad⁶³. Al sobre-expresar la proteína fosfolamban de humano con esta mutación en ratones transgénicos, se observó disminución en la fosforilación de fosfolamban, cardiomiopatía dilatada y muerte a edad temprana⁵⁹. Otra mutación en el gen de fosfolamban genera un codón de paro prematuro en el aminoácido 39 (L39stop), lo que resulta en la formación de una proteína truncada no funcional. Los individuos homocigotos para esta mutación desarrollaron cardiomiopatía dilatada severa y requirieron de un trasplante a edad temprana⁶⁴, sugiriendo que es fundamental la regulación de la actividad de SERCA2a por fosfolamban para mantener las

concentraciones de calcio normales en el corazón de humano.

Las enzimas SERCA y cáncer. En años recientes se ha sugerido que la alteración de la homeostasis de Ca²⁺ pudiera estar involucrada en la proliferación celular anormal y la adquisición del fenotipo tumoral. La primera evidencia en este sentido se encontró en ratones transgénicos con una mutación nula en una de las copias del gen SERCA2, por lo tanto sólo expresan una copia funcional del gen. Estos ratones desarrollan tumores espontáneos en las células escamosas de la piel, tracto digestivo y cavidad oral^{19,65}.

Con esta evidencia se iniciaron estudios en muestras de cáncer y células tumorales de humano en cultivo, encontrándose que la expresión del gen SERCA3 está considerablemente reducida o ausente en cáncer de colon y en cáncer gástrico, en comparación con las células de epitelio normal de colon y estómago, que expresan esta enzima en niveles altos^{21,66} (Cuadro 2). La disminución en los niveles de expresión del gen SERCA3 en células de cáncer de colon sugiere que la expresión anómala de esta enzima es un evento temprano durante el desarrollo del tumor. Además, sugiere que el grado de pérdida de expresión del gen SERCA3 correlaciona con el grado de pérdida de la diferenciación celular de tumores benignos y malignos²¹. En condiciones normales, la expresión de SERCA3 aumenta a medida que las células de las criptas del colon maduran⁶⁶. A partir de estas observaciones se sugiere que la expresión de SERCA3 se puede comportar como un marcador de diferenciación en varios tipos celulares, incluyendo las células cancerosas⁶⁶.

Cuadro 2. Cambios en la expresión de las enzimas SERCA2 y SERCA3 en tumores y líneas celulares de cáncer de humano

Enzima	Tipo de cáncer	Cambio			Referencia
		RNAm	Proteína	Actividad	
SERCA2	Cáncer oral: carcinoma de las células escamosas, muestras de tejido de pacientes y líneas celulares.	↓	↓	ND	[20]
	Cáncer de colon y de pulmón: muestras de tejido de pacientes.	↓	ND	ND	[67]
	Cáncer colorectal: muestras de tejido de pacientes.	↑	ND	ND	[68]
SERCA3	Cáncer de colon: muestras de tejido de pacientes y líneas celulares.	↓	↓	ND	[21,66]

*ND no determinada, ↑↓ aumento y disminución de la expresión de la enzima, respectivamente.

En un estudio realizado por Endo y colaboradores (2004) se analizó la expresión del gen SERCA2 en células de cáncer oral en humanos (OSCCs, por oral squamous cell carcinoma), así como en líneas celulares derivadas de OSCC y células normales del epitelio oral²⁰. Encontraron que la expresión del gen SERCA2

disminuye o está ausente en 42% de las muestras de OSCCs y en las líneas celulares derivadas de OSCC, contrario a lo observado en células normales del epitelio oral (Cuadro 2). Esta alteración no se debió a mutaciones en la región codificante del gen SERCA2, sino a cambios en la metilación de su sitio promotor. La metilación aberrante del promotor fue responsable de suprimir la expresión del gen SERCA2 en la tercera parte de los casos de OSCC analizados²⁰. La expresión de este gen se restauró al tratar las líneas celulares derivadas de OSCC con un agente desmetilante del ADN (5-aza-2-deoxidina)²⁰. Estos datos sugieren que la metilación de los promotores tiene una influencia importante en la expresión del gen SERCA2 en células de cáncer oral en humanos, pero no es el único mecanismo implicado en la represión de la expresión génica.

La metilación del ADN es un mecanismo epigenético que regula la expresión génica. En los humanos y otros mamíferos la metilación corre a cargo de una ADN metiltransferasa (o metilasa); la reacción opuesta se dice que la realiza la enzima demetilasa; no obstante, aún no se ha descubierto. Esta modificación se lleva a cabo en citosinas que preceden a una guanina en los dinucleótidos CpG, cuando están agrupadas en las llamadas islas CpG⁶⁹, algunas de las cuales se encuentran en las regiones promotoras de varios genes. La metilación de dichas secuencias se asocia con la represión de la expresión génica^{70,71}.

Otro mecanismo de regulación epigenética que puede afectar la expresión de los genes SERCA2 y SERCA3 es la acetilación de las histonas. La modificación de las histonas por acetilación se lleva a cabo por las enzimas acetiltransferasas de histonas (HAT) o acetilasas, y está asociada con la activación de la expresión de un gen⁷²⁻⁷⁴. El proceso inverso lo llevan a cabo las desacetilasas de histonas (HDACs) y está asociado con el silenciamiento de genes. Por lo tanto, la inhibición de las desacetilasas de histonas se asocia con activación de la transcripción de varios genes. Al tratar líneas celulares derivadas de cáncer gástrico con butirato de sodio, un inhibidor de desacetilasas de histonas, se encontró que la expresión del gen SERCA3, que antes del tratamiento estaba disminuida o ausente, mostró un marcado incremento⁶⁶.

Con base en la información recién descrita, se ha sugerido que las enzimas SERCA podrían servir como blanco terapéutico y SERCA3 podría utilizarse como marcador para el estudio de fenotipos de cáncer de colon y gástrico. Se propone también, que la sobre-expresión de SERCA3 en cáncer de colon pudiera mantener los niveles de Ca²⁺ del retículo endoplásmico normales y con ello tener un valor terapéutico⁷⁵. Una estrategia diferente a la anterior que se planteó para el tratamiento del cáncer de próstata consistió en inhibir específicamente a las enzimas SERCA en células cancerosas, para lo cual se empleó la tapsigargina, que se acopló a un péptido para producir un fármaco inactivo que solamente se activaría en presencia de

proteasas específicas de cáncer de próstata, como el antígeno prostático específico. Con este estudio se demostró que la tapsigargina es capaz de inducir apoptosis específicamente en células de cáncer de próstata⁷⁶. Sin embargo, también se ha demostrado que la administración crónica de tapsigargina puede promover la proliferación celular y la formación de tumores *in vivo* e *in vitro*^{77,78}.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las enzimas SERCA desempeñan un papel fundamental en la fisiología celular al participar en la homeostasis del calcio, un catión que regula diversos procesos celulares. Las mutaciones o modificaciones en los genes que codifican para las enzimas SERCA resultan en cambios en su expresión y/o actividad, que pueden favorecer el desarrollo de patologías como las cardiopatías, el cáncer, la enfermedad de Darier y la enfermedad de Brody, pero aún faltan estudios para esclarecer en mayor detalle los mecanismos involucrados en el desarrollo de estas patologías. Los avances en biología molecular y el uso de ratones transgénicos con mutaciones en los genes SERCA han permitido una mejor comprensión de la función de estas enzimas y de su participación en procesos malignos.

En el futuro se podrían diseñar terapias génicas para expresar copias normales de los genes SERCA y con ello tratar de corregir los defectos que ocasionan las mutaciones en estos genes. Para el caso de cardiopatías la estrategia consiste en sobre-expresar el gen SERCA2 en el miocardio afectado, o inhibir la expresión de su proteína reguladora fosfolamban, con la finalidad de buscar mayor actividad de la enzima y una mejora en la función del músculo cardíaco. Por otro lado, se ha sugerido el uso de ácidos grasos de cadena corta para activar la expresión de las enzimas SERCA en condiciones de cáncer; sin embargo, éste es un mecanismo general que activa la expresión de diversos genes, por lo tanto será necesario desarrollar estrategias selectivas para activar la expresión de estas enzimas en las células tumorales.

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada a E. Contreras (223272) para estudios de doctorado en Ciencias Biomédicas y a SEP-PROMEP por el apoyo a JSG (PTC-270).

BIBLIOGRAFÍA

1. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 11-21.
2. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 395-433.

3. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 517-29.
4. MacLennan DH, Brandl CJ, Korczak B, Green NM. Amino-acid sequence of a Ca²⁺ + Mg²⁺-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* 1985; 316: 696-700.
5. Hilgemann DW, Yaradanakul A, Wang Y, Fuster D. Molecular control of cardiac sodium homeostasis in health and disease. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006; 17: S47-S56.
6. Papp B, Brouland JP, Gélébart P, Kovacs T, Chomienne C. Endoplasmic reticulum calcium transport ATPase expression during differentiation of colon cancer and leukaemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 1223-36.
7. McConkey DJ, Orrenius S. Signal transduction pathways in apoptosis. *Stem Cells* 1996; 14: 619-31.
8. Trump BF, Berezkeski IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 1995; 9: 219-28.
9. Legrand G, y cols. Ca²⁺ pools and cell growth. Evidence for Sarcoendoplasmic Ca²⁺ -ATPases 2b involvement in human prostate cancer cell growth control. *J Biol Chem* 2001; 276: 47608-14.
10. Arai M, Matsui H, Periasamy M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ res* 1994; 74: 555-64.
11. Mittmann C, Eschenhagen T, Schols H. Cellular and molecular aspects of contractile dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 267-275.
12. Frank KF, Bölc B, Erdmann E, Schwinger RH. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovasc Res* 2003; 57: 20-27.
13. Hasenfuss G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res* 1998; 279-89.
14. Benders AA, Veerkamp JH, Oosterhof A, Jongen PJ, Bindels RJ, Smit LM et al. Ca²⁺ homeostasis in Brody's disease. A study in skeletal muscle and cultured muscle cells and the effects of dantrolene and verapamil. *J Clin Invest* 1994; 94: 741-48.
15. Hovnanian A. SERCA pumps and human disease. En: Brini M y Carafoli E, Ed. *Calcium Signaling and Disease*. New York: Springer; 2007. P. 337-61.
16. Odermatt A, Taschner PEM, Khanna VK. Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, are associated with Brody disease. *Nature Genet* 1996; 14: 191-4.
17. Odermatt A y cols. The mutation of Pro789 to Leu reduces the activity of the fast-twitch skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA1) and is associated with Brody disease. *Hum Genet* 2000; 106: 482-91.
18. Sakuntabhai A, Burge S, Monk S, Hovnanian H. Spectrum of novel ATP2A2 mutations in patients with Darier's disease. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1611-9.
19. Liu LH y cols. Squamous cell tumors in mice heterozygous for a null allele of Atp2a2, encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 2 Ca²⁺ pump. *J Biol Chem* 2001; 276: 26737-40.
20. Endo Y y cols. Sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase type 2 downregulated in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 110: 225-31.
21. Brouland JP y cols. The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. *American J Pathol* 2005; 167: 233-42.
22. MacLennan DH. Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1970; 245: 4508-4518.
23. Toyoshima C. How Ca²⁺-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793: 941-6.
24. MacLennan DH, Rice WJ, Green NM. The Mechanism of Ca²⁺ Transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *J Biol Chem* 1997; 272: 28815-8.
25. Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* 2002; 32: 279-305.
26. Lee AG, East JM. What the structure of a calcium pump tells us about its mechanism. *Biochem J* 2001; 356: 665-83.
27. Lytton J, MacLennan DH. Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca²⁺-ATPase gene. *J Biol Chem* 1988; 263: 15024-31.
28. Zhang Y y cols. Characterization of cDNA and genomic DNA encoding SERCA1, the Ca(2+)-ATPase of human fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, and its elimination as a candidate gene for Brody disease. *Genomics* 1995; 30: 415-24.
29. Dode L y cols. cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene. *Biochem J* 1996; 318: 689-99.
30. Brandl CJ, DeLeon S, Martin D, MacLennan DH. Adult forms of the Ca²⁺ ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem* 1987; 262: 3768-74.
31. Korczak B y cols. Structure of the rabbit fast-twitch skeletal muscle Ca²⁺-ATPase gene. *J Biol Chem* 1988; 263: 4813-19.
32. De la Bastie D, Wisnewski C, Schwartz K, Lomprie AM. (Ca²⁺ + Mg²⁺)-dependent ATPase mRNA from smooth muscle sarcoplasmic reticulum differs from that in cardiac and fast skeletal muscles. *FEBS Lett* 1988; 229: 45-8.
33. Gunteski-Hamblin A, Greeb J, Shull GE. A novel Ca²⁺ pump expressed in brain, kidney and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene. Identification of cDNAs encoding Ca²⁺ and other cation-transporting ATPases using an oligonucleotide probe derived from the ATP-binding site. *J Biol Chem* 1988; 263: 15032-40.
34. Eggermont J, Wuytack F, Casteels R. Characterization of the mRNAs encoding the gene 2 sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum Ca²⁺ pump in pig smooth muscle. *Biochem J* 1990; 266: 901-7.
35. Gélébart P, Martin V, Enouf J, Papp B. Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303: 676-84.
36. Anger M J-L y cols. The sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase mRNA isoform, SERCA 3, is expressed in endothelial and epithelial cells in various organs. *FEBS Lett* 1993; 334: 45-48.
37. Bobe R y cols. The rat platelet 97-kDa Ca²⁺ATPase isoform is the sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase 3 protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 14117-24.
38. Mountian I, Manolopoulos VG, De Smedt H. Expression patterns of sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms in vascular endothelial cells. *Cell Calcium* 1999; 25: 371-80.
39. Lytton J y cols. Functional comparison between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem* 1992; 267: 14483-9.
40. Martin V y cols. Three novel Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ATPase (SERCA) 3 isoforms: Expression, regulation and function of the members of the SERCA3 family. *J Biol Chem* 2002; 277: 24442-52.
41. Poch E y cols. Functional characterization of alternatively spliced human SERCA3 transcripts. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998; 275: 1449-58.
42. Arredouani A y cols. SERCA3 ablation does not impair insulin secretion but suggests distinct roles of different sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺ pumps for Ca²⁺ homeostasis in pancreatic β -cells. *Diabetes* 2002; 51: 3245-53.
43. Sutliff RL y cols. Phospholamban is present in endothelial cells and modulates endothelium-dependent relaxation. Evidence from

- phospholamban gene-ablated mice. *Circ Res* 1999; 84: 360-4.
44. James P y cols. Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 1989; 342: 90-92.
 45. Odermatt A y cols. Sarcolipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem* 1998; 273: 12360-9.
 46. Lindemann JP y cols. β -Adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca²⁺ ATPase activity in guinea pig ventricles. *J Biol Chem* 1983; 258: 464-71.
 47. Jonh LM, Lechleiter JD, Camacho P. Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *J Cell Biol* 1998; 142: 963-73.
 48. Roderick HL, Lechleiter JD, Camacho P. Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca(2+) oscillations via an interaction with SERCA2b. *J Cell Biol* 2000; 149: 1235-47.
 49. Dremina ES y cols. Anti-apoptotic protein Bcl-2 interacts with and destabilizes the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA). *Biochem J* 2004; 383: 361-70.
 50. Sagara Y, Fernández-Belda F, de Meis L, Inesi G. Characterization of the inhibition of intracellular Ca²⁺ transport ATPases by thapsigargin. *J Biol Chem* 1992; 267: 12606-13.
 51. Brody IA. Muscle contracture induced by exercise. A syndrome attributable to decreased relaxing factor. *N Engl J Med* 1969; 281: 187-92.
 52. Ahn W, Goo Lee M, Hwan Kim, Muallem S. Multiple effects of SERCA2b mutations associated with Darier's disease. *J Biol Chem* 2003; 278: 20795-801.
 53. Miyauchi Y y cols. Comprehensive analysis of expression and function of 51 sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase mutants associated with Darier disease. *J Biol Chem* 2006; 281: 22882-95.
 54. Brini M, Carafoli E. Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev* 2009; 89: 1341-78.
 55. Dode L y cols. Dissection of the functional differences between Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 1 and 2 isoforms and characterization of darier disease (SERCA2) mutants by Steady-state and transient kinetic analyses. *J Biol Chem* 2003; 278: 47877-89.
 56. Burge SM, Wilkinson JD. Darier-White disease: a review of the clinical features in 163 patients. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27:40-5.
 57. Balke CW, Shorofsky SR. Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 1998; 37: 290-9.
 58. Smith G. Matters of the heart: the physiology of cardiac function and failure. *Exp Physiol* 2007; 6: 973-86.
 59. Kranias EG, Bers DM. Calcium and cardiomyopathies. En: Brini M y Carafoli E, Ed. *Calcium Signaling and Disease*. New York: Springer; 2007. P. 523-37.
 60. Del Monte F, Hajjar RJ. Targeting calcium cycling proteins in heart failure through gene transfer. *J Physiol* 2003; 546: 49-61.
 61. Baartscheer A. Adenovirus gene transfer of SERCA in heart failure. A promising therapeutic approach?. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 249-52.
 62. Vinge LE, Raake PW, Koch WJ. Gene Therapy in Heart Failure. *Circ Res* 2008; 102: 1458-70.
 63. Schmitt JP y cols. Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science* 2003; 299: 1410-3.
 64. Franz WM, Muller OJ, Katus HA. Cardiomyopathies: from genetics to the prospect of treatment. *Lancet* 2001; 358: 1627-37.
 65. Prasad V y cols. Haploinsufficiency of Atp2a2, encoding the SERCA2 Ca²⁺ pump, predisposes mice to squamous cell tumors via a novel mode of cancer susceptibility. *Cancer Res* 2005; 65: 8655-61.
 66. Gélébart P y cols. Expression of endomembrane calcium pump in colon and gastric cancer cells: Induction of SERCA3 expression during differentiation. *J Biol Chem* 2002; 277: 26310-20.
 67. Korosec B, Glavac D, Rott T, Ravnik-Glavac M. Alterations in the ATP2A2 gene in correlation with colon and lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 171: 105-11.
 68. Chung FY y cols. Sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase 2 expression as a tumor marker in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 969-74.
 69. Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6538-47.
 70. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. *Molecular Biology of the Gene*. 5ta. ed. San Francisco: Pearson Education; 2004. p. 556-60.
 71. Boyes J, Bird A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J* 1992; 11: 327-33.
 72. Sun ZW, Allis CD. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 2002; 418: 104-8.
 73. Marks PA, Miller T, Richon VM. Histone deacetylases. *Curr Opin Pharm* 2003; 3: 344-51.
 74. Ng HH, Xu R, Zhang Y, Strhl K. Ubiquitination of histone H2B by Rad6 is required for efficient dot1-mediated methylation of histone H3 Lysine 79. *J Biol Chem* 2002; 277: 34655-7.
 75. Lipskaia L, Hulot JS, Lompré AM. Role of sarco/endoplasmic reticulum calcium content and calcium ATPase activity in the control of cell growth and proliferation. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* 2007; 457: 673-85.
 76. Denmeade, S. R. & Isaacs, J. T. The SERCA pump as a therapeutic target: making a 'smart bomb' for prostate cancer. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 14-22.
 77. Bergner A, Huber RM. Regulation of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-store in cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8: 705-9.
 78. Hakii H, Fujiki H, Sukanuma M, Nakayasu M, Tahira T, Sugimura T, et al. Thapsigargin, a histamine secretagogue, is a non-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1986; 111: 177-81.