

Expresión diferencial de los genes SERCA en células de cáncer de mama

Ángel Zarain-Herzberg,^{1*} Eduardo Izquierdo-Torres,¹ Andrés Hernández-Oliveras,² Gabriela Rodríguez¹ y Dalia Lozano-Arriaga¹

¹Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica, Ciudad de México; ²Universidad Veracruzana, Instituto de Investigaciones Biológicas, Veracruz. México

Resumen

Introducción: Las enzimas SERCA son esenciales para la homeostasis intracelular de Ca^{2+} . Los genes SERCA (ATP2A1-3) codifican para distintas isoformas funcionales de la proteína, cuya expresión o función se encuentra alterada en diversos tipos de cáncer, como el gástrico y el oral, así como de colon, mama, pulmón, tiroides, hígado y próstata, entre otros. Sin embargo, se desconoce el papel de las bombas SERCA en la carcinogénesis. **Métodos:** Se utilizaron estudios como reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, microscopía óptica, ensayos de proliferación y muerte celular, así como análisis bioinformáticos. **Objetivos:** Evaluar los niveles de expresión de los genes ATP2A2 y ATP2A3 en líneas celulares que representan diferentes subtipos de cáncer de mama. **Resultados:** La línea celular MDA-MB-231 expresa niveles más bajos del ARNm para el gen ATP2A3, en comparación con las células MCF-7. El uso del fitoestrógeno resveratrol induce la expresión de ATP2A3, disminuye la proliferación e induce apoptosis en ambos tipos de células. **Conclusiones:** La expresión de SERCA puede funcionar como una herramienta para diferenciar los subtipos de cáncer de mama, los cuales tienen distintas necesidades de tratamiento.

PALABRAS CLAVE: SERCA. Cáncer. Expresión génica. Calcio.

SERCA genes differential expression in breast cancer cells

Abstract

Introduction: SERCA enzymes are essential for intracellular Ca^{2+} homeostasis. SERCA genes (ATP2A1-3) encode for different functional isoforms of the protein, whose expression or function is altered in several types of cancer, such as gastric and oral, as well as colon, breast, lung, thyroid, liver, and prostate cancer, among others. However, the role played by SERCA pumps in carcinogenesis is unknown. **Methods:** Techniques such as real-time polymerase chain reaction, optical microscopy, proliferation and cell death assays, as well as bioinformatic analyses were used. **Objectives:** To evaluate the expression levels of the ATP2A2 and ATP2A3 genes in cell lines representative of different subtypes of breast cancer. **Results:** The MDA-MB-231 cell line expresses lower mRNA levels for the ATP2A3 gene in comparison with MCF-7 cells. The use of the phytoestrogen resveratrol induces ATP2A3 expression, decreases proliferation, and induces apoptosis in both cell types. **Conclusions:** SERCA expression might function as a tool to differentiate breast cancer subtypes, which have different treatment requirements.

KEY WORDS: SERCA. Cancer. Gene expression. Calcium.

Correspondencia:

*Ángel Zarain-Herzberg
E-mail: zarain@unam.mx

Fecha de recepción: 25-08-2020

Fecha de aceptación: 01-10-2020

DOI: 10.24875/GMM.20000614

Gac Med Mex. 2021;157:357-363

Disponible en PubMed

www.gacetamedicademexico.com

0016-3813/© 2020 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

El ion Ca^{2+} es un segundo mensajero que transmite señales para la regulación de procesos celulares como proliferación, muerte celular, transcripción y metabolismo de células malignas.¹⁻³ Las ATPasas de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (SERCA) son de las proteínas más importantes en el mantenimiento de la homeostasis y señalización por Ca^{2+} , ya que bombean Ca^{2+} citosólico hacia el lumen del retículo endoplásmico para restaurar el estado de reposo. Los genes *ATP2A1*, 2, y 3 codifican para diferentes isoformas de las enzimas SERCA1, 2 y 3, respectivamente.⁴ La expresión de estas bombas de Ca^{2+} es regulada por el tipo de tejido y estadio del desarrollo.⁵ Las alteraciones en la señalización por Ca^{2+} están involucradas en el desarrollo de patologías cardíacas, neurológicas y cáncer.⁶

El cáncer de mama (CaMa) es la neoplasia más frecuente en mujeres, tanto en México como a nivel mundial,^{7,8} y pese a las múltiples estrategias de tamizaje, su incidencia continúa en aumento.⁹ La primera evidencia de la alteración de la expresión de las bombas de Ca^{2+} SERCA en CaMa fue dada por el grupo de Brouland, que analizó la expresión de SERCA3 mediante inmunohistoquímica en muestras de pacientes y observó que su expresión correlacionaba inversamente con el grado histológico del tumor y que era abundante en tejido normal.¹⁰ Estos hallazgos llevaron a proponer a SERCA3 como marcador de diferenciación, ya que su expresión disminuye incluso en lesiones precancerosas.¹⁰

Sin embargo, el papel de las SERCA aún no está claro, ya que la expresión de SERCA3 se ha visto disminuida en ciertos linajes de cáncer, como el gástrico, de colon, mama, hígado y pulmón,¹⁰⁻¹⁴ pero también se ha observado que la sobreexpresión de SERCA2 promueve la proliferación en cáncer de colon y próstata.^{15,16}

En este trabajo cuantificamos y comparamos la expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* en las líneas celulares de CaMa MCF-7 y MDA-MB-231, que representan los subtipos luminal A y triple negativo, respectivamente, y reflejan distintos grados de diferenciación; MCF-7 es representativo de cáncer primario y MDA-MB-231, de cáncer metastásico. Adicionalmente, evaluamos el efecto de resveratrol (RSV), fitoestrógeno que modula la expresión de SERCA3 en la proliferación y muerte celular, procesos celulares cruciales del cáncer.²

Métodos

Cultivos celulares y tratamientos farmacológicos

Las líneas celulares del CaMa MCF-7 y MDA-MB-231 fueron adquiridas en ATCC® y su identidad la verificó el Laboratorio de Diagnóstico Genómico del Instituto Nacional de Medicina Genómica. Las células MCF-7 y MDA-MB-231 se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium con glucosa, 10 % de suero fetal bovino, 0.5 % de penicilina/estreptomicina y 70 mg/L de kanamicina. Se incubaron para cultivo a 37 °C, con 95 % de aire y 5 % de CO_2 . Las células no malignas MCF-10A fueron cultivadas con medio DMEM/F12, con 10 % de suero fetal bovino, insulina, hidrocortisona y factor de crecimiento epidérmico humano. Las células en fase de crecimiento exponencial se tripsinizaron y sembraron en diferentes placas de cultivo. Al alcanzar 60 % de confluencia, se agregaron concentraciones crecientes de RSV (0-200 μM) durante 72 horas y el medio de cultivo se reemplazó cada 24 horas.

Ensayos de proliferación celular

A las células listas para realizar el experimento se les retiró el medio de cultivo y se lavaron con PBS, se lisaron con amortiguador de lisis adicionado con el colorante CyQUANT en una relación 1:80 y se procedió a la medición de la fluorescencia (480 nm de excitación y 520 nm de emisión), directamente proporcional a la cantidad de ADN.

Ensayos de apoptosis

La muerte celular se determinó mediante un ensayo basado en la hidrólisis del péptido sustrato Ac-DEVD-pNA por diversas caspasas y en el que se libera la pNA. Los resultados se presentan como el índice de activación de caspasas comparado con el del control; las células control tratadas únicamente con el vehículo (etanol) fueron consideradas con un índice de activación de 1.

Extracción de ARN y PCR en tiempo real

La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría y su integridad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa con formaldehído a 1 %. La reacción de transcripción reversa se realizó

con 1 µg de ARN total con la transcriptasa reversa M-MLV. Las reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) se realizaron por triplicado con 25 ng de ADN complementario como molde, el cual fue obtenido en el paso anterior. La expresión de β -actina se utilizó para normalizar los resultados.

Análisis de datos públicos de secuenciación de ARN de una sola célula

Para analizar la expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* en diferentes subtipos de CaMa, se utilizó la base datos con número de acceso GSE75688, la cual proviene de un estudio donde se analizó el perfil de la expresión génica de 515 células derivadas de 11 pacientes con CaMa.¹⁷ Los resultados de la expresión de *ATP2A2* y *ATP2A3* fueron analizados y visualizados en el Single Cell Expression Atlas y para fines de este estudio, las 515 células de CaMa se dividieron en cuatro subtipos: ER+ y HER2+; HER2+; ER+; y PR-, ER- y HER2-.¹⁸

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados en el programa GraphPad Prism. Los resultados están expresados como la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. Las comparaciones entre grupos experimentales se realizaron mediante el método de Dunnett (Anova de un factor). Las diferencias fueron consideradas como significativas con un valor de $p < 0.05$.

Resultados

Las células MCF-7 y MDA-MB-231 expresan niveles distintos de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*

Mediante PCR cuantitativo en tiempo real, evaluamos la abundancia de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* en las líneas celulares CaMa MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-10A, esta última utilizada como modelo de epitelio mamario normal. En la Tabla 1 se observa que el valor del ciclo umbral para la amplificación del ARNm para ambos genes es similar entre las tres líneas celulares para el gen *ATP2A2*, por lo que se concluye que se expresa a niveles similares entre estos linajes. Sin embargo, el ciclo umbral del gen *ATP2A3* es menor (Ct1 6.43) en las células MCF-7

que en las células MDA-MB-231 (Ct 22.89), lo cual indica una menor expresión de este gen en las células MDA-MB-231 (Tabla 1). Sorprendentemente, la línea celular MCF-10A mostró un ciclo umbral para *ATP2A3* menor que las células MDA-MB-231 (Ct 27.25). La tabla también muestra que la expresión relativa de *ATP2A2* con respecto a β -actina fue similar en las tres líneas celulares. Sin embargo, la expresión relativa de *ATP2A3* fue diferente en las tres líneas celulares, siendo más baja en la línea MCF-10A, seguida de la línea triple negativa MDA-MB-231 y la más alta en la línea celular MCF-7.

RSV afecta la morfología y el número de células en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231

Con la finalidad de analizar el efecto del RSV sobre las distintas líneas celulares, se adicionaron diferentes concentraciones (10, 50, 100 y 200 µM) y se realizaron cultivos con 12, 24, 48 y 72 horas de tratamiento. En las Figuras 1A y 1B se puede observar que el etanol (vehículo) no tiene efecto alguno sobre las células MCF-7 y MDA-MB-231, respectivamente. Las células MCF-7 muestran disminución significativa en su número dependiendo de la dosis-tiempo de exposición, especialmente a altas concentraciones (> 50 µM RSV) a las 72 horas (Figura 1A). Las células MDA-MB-231 mostraron ser más resistentes que las células MCF-7 (Figura 1B). En el caso de la línea MCF-10A, se acentúa más con concentraciones altas de RSV (200 µM), incluso a tiempos cortos (24 horas), y muestra signos de senescencia o estrés¹⁹ (Figura 1C). Concentraciones bajas de RSV (entre 10 y 50 µM) parecen no impedir significativamente la proliferación, ya que se comportan en forma similar al control.

RSV disminuye la proliferación celular e induce apoptosis en las células malignas MCF-7 y MDA-MB-231, sin afectaciones en las células no malignas MCF-10A

Para cuantificar la proliferación celular utilizamos un colorante (CyQUANT), que al unirse al ADN incrementa su fluorescencia, permitiendo con ello cuantificar el ADN, medida directa del número de células y de su proliferación. En la Figura 2A se puede observar que el RSV disminuye la proliferación de las células MCF-7 y MDA-MB-231 después de 72 horas de forma dosis-dependiente. Las células MDA-MB-231

Tabla 1. Expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* en las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231

Línea celular	Ciclo umbral <i>ATP2A2</i>	Expresión <i>ATP2A2</i> normalizada	Ciclo umbral <i>ATP2A3</i>	Expresión <i>ATP2A3</i> normalizada	Ciclo umbral β -actina
MCF-10A	14.79 \pm 0.23	0.68 \pm 0.11	27.25 \pm 0.44	0.0013 \pm 0.0001	8.26 \pm 0.05
MCF-7	14.64 \pm 0.64	1.15 \pm 0.21	16.43 \pm 0.78	1.16 \pm 0.23	9.03 \pm 0.36
MDA-MB-231	13.46 \pm 0.14	1.06 \pm 0.0005	22.89 \pm 0.12	0.0015 \pm 0.0003	7.68 \pm 0.11

Se muestran los valores del ciclo umbral obtenidos por qRT-PCR para cada gen. También se muestra cuantitativamente, en las columnas resaltadas en verde, la comparación de la expresión de *ATP2A2* y *ATP2A3* entre las tres líneas celulares normalizada con la expresión de β -actina y tomando como base la abundancia en la expresión de estos genes en las células MCF-7. Los datos son expresados como el promedio de tres experimentos independientes (n = 3) \pm desviación estándar.

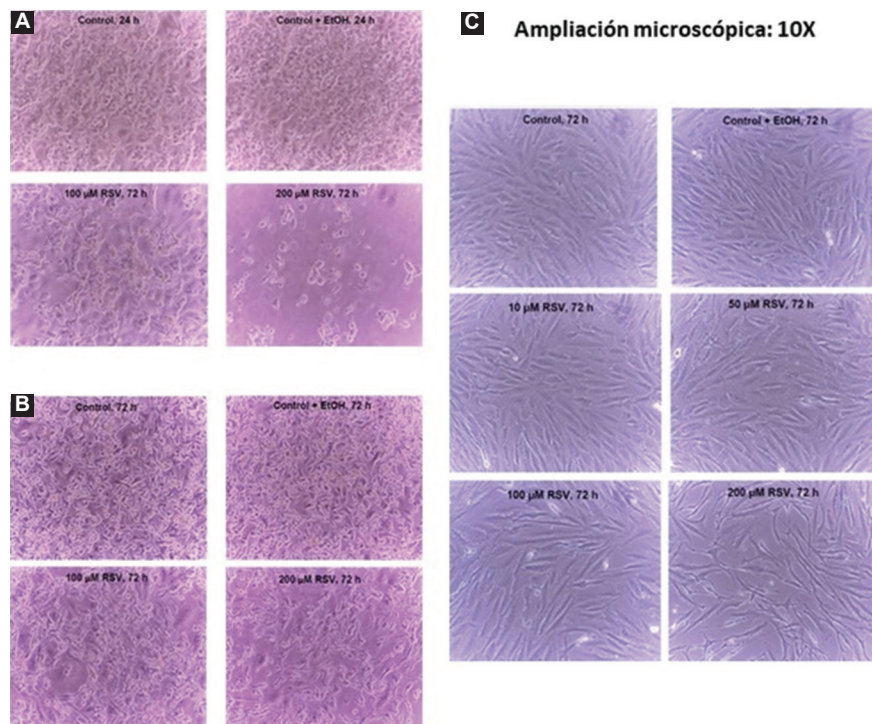


Figura 1. Efecto del RSV sobre las células MCF-7 (panel A), MDA-MB-231 (panel B) y MCF-10 (panel C). Al alcanzar 60 a 70 % de confluencia, las células se expusieron a concentraciones crecientes de RSV (10, 50, 100 y 200 μ M) por 12, 24, 48 y 72 horas de tratamiento, con cambio de medio cada 24 horas. Las microfotografías fueron tomadas con una ampliación de 10x.

son más resistentes a bajas dosis, pero al incrementar la concentración de RSV se comportan en forma similar a las células MCF-7. Se puede observar también que las células MCF-10A no muestran disminución, pero su tasa de proliferación es lenta. El etanol no tuvo efecto alguno en la proliferación de los tres linajes.

También se determinó la muerte celular por los cambios en la absorbancia del producto pNA. Se observó que, mientras que en las células no malignas MCF-10A no hay cambios significativos en la absorbancia de pNA, en las células malignas MCF-7 y MDA-MB-231 se detectan incrementos en la absorbancia desde las concentraciones más bajas, lo que

indica que el RSV afecta selectivamente a las células malignas (Figura 2B).

La expresión de *ATP2A2* y *ATP2A3* en los subtipos de cáncer de mama

En la Figura 3A se muestra la distribución de las células acorde a los cuatro subtipos: ER+ HER2+ (amarillo), ER+ (azul claro), HER2+ (azul) y PR-, ER- y HER2- (rojo). Los datos de secuenciación de ARN de una sola célula indican que la expresión de *ATP2A2* (azul) es homogénea en los cuatro subtipos de CaMa (Figura 3B), mientras que la expresión de *ATP2A3* es heterogénea (azul), lo que muestra los mayores

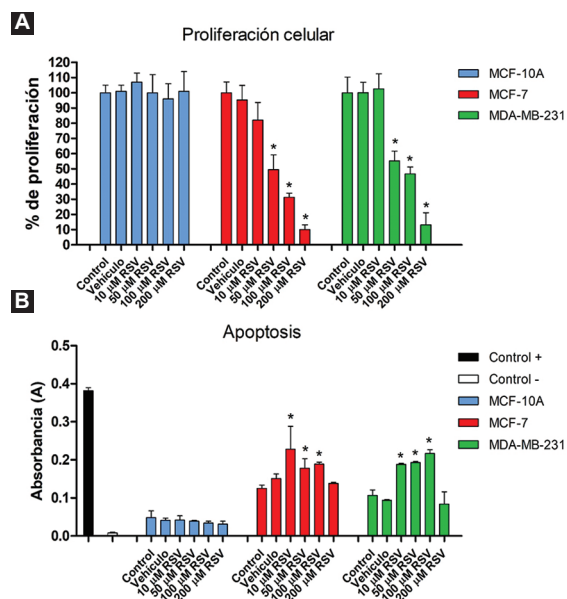


Figura 2. Disminución de la proliferación y aumento de apoptosis en células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con RSV. Las células fueron tratadas por 72 horas con concentraciones crecientes de RSV (0 a 200 µM), posteriormente fueron lisadas y se procedió a la cuantificación de ADN total para la determinación de la proliferación celular (panel A) y a la utilización de extractos totales para ser incubados con un sustrato hidrolizable por varias caspasas como indicativo de apoptosis (panel B). Los datos son expresados como el promedio de tres experimentos independientes ($n = 3$) \pm desviación estándar. Cada línea celular fue comparada contra su respectivo control: células en condiciones normales de cultivo. En el panel B se graficaron directamente los valores de absorción (A).

niveles de expresión en las células ubicadas en el subtipo ER+ HER2+, seguido del subtipo PR-, ER- y HER2- y, finalmente, los menores niveles se encontraron en los fenotipos ER+ y HER2+ (Figura 3C).

Discusión

La expresión o función de SERCA se encuentra alterada en patologías como cáncer,⁶ por lo que estudiar su rol en la carcinogénesis y mantenimiento del fenotipo tumoral es importante para entender su etiología y el posible desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y pronósticas. Papp y Brouland reportaron que lesiones precancerosas y cancerosas derivadas de pacientes con CaMa muestran niveles de expresión casi inexistentes de SERCA3 comparadas con tejido no neoplásico,¹⁰ lo que sugiere que la pérdida en la expresión de SERCA3 es un evento temprano dentro del proceso carcinogénico. Estos y otros datos obtenidos en cáncer gástrico, de colon y pulmón^{11,12,20} han llevado a proponer a SERCA3 como

un marcador de diferenciación, puesto que su expresión correlaciona proporcionalmente en forma inversa con el grado histológico del tumor.

En este trabajo utilizamos dos líneas celulares que representan distintos subtipos de CaMa, para cuantificar la expresión de ARNm de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*. Por un lado, la línea MCF-7 es representativa de CaMa tipo luminal, el cual conserva algunas características epiteliales, mientras las células MDA-MB-231 representan un tipo triple negativo, muy agresivo y menos diferenciado.²¹⁻²³

La señalización proliferativa sostenida y la resistencia a la apoptosis son características distintivas del cáncer,² por lo cual se evaluó el efecto del RSV (que modula selectivamente la expresión de *ATP2A3* sin alterar la expresión de *ATP2A2*)²⁴ en estos dos procesos celulares. Se observó cómo existe una disminución selectiva en el número de células en ambas líneas celulares malignas en forma dosis-tiempo dependiente (Figura 1). La Figura 2 muestra cuantitativamente que el RSV detiene la proliferación celular e induce apoptosis.

En el laboratorio hemos identificado mecanismos transcripcionales y epigenéticos que controlan la expresión de SERCA3 en cáncer. Por ejemplo, en cáncer gástrico y de colon, los factores de transcripción Sp1, Sp3 y KL4 son importantes para la transcripción basal del gen *ATP2A3*;¹² además, su expresión también se controla a nivel epigenético, puesto que la metilación del promotor disminuye conforme las células se diferencian por confluencia, lo que promueve cambios en la estructura de la cromatina a través de marcas de histonas.²⁰ Además, en líneas celulares de CaMa observamos que el RSV induce la expresión de *ATP2A3* a través de la remodelación de la estructura de cromatina²⁵ y que el silenciamiento de *ATP2A3* mediante ARNi previene parcialmente la muerte celular inducida por RSV,²⁴ por lo que SERCA3 podría ser un buen blanco para tratar tumores proliferativos con gran resistencia a la apoptosis.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio concuerdan con la evidencia disponible, ya que las células MDA-MB-231 mostraron una expresión de SERCA3 menor que las células MCF-7 (Tabla 1). Interesantemente, al observar la línea celular MCF-10A, la cuantificación de ARNm mostró que expresaba menos SERCA3 que las células MDA-MB-231. Sin embargo, las células MCF-10A son de tipo basal y se caracterizan por la ausencia en la expresión de los receptores ER α -, PR- y HER2-.²³ Lo anterior cuestiona la verdadera utilidad de las células

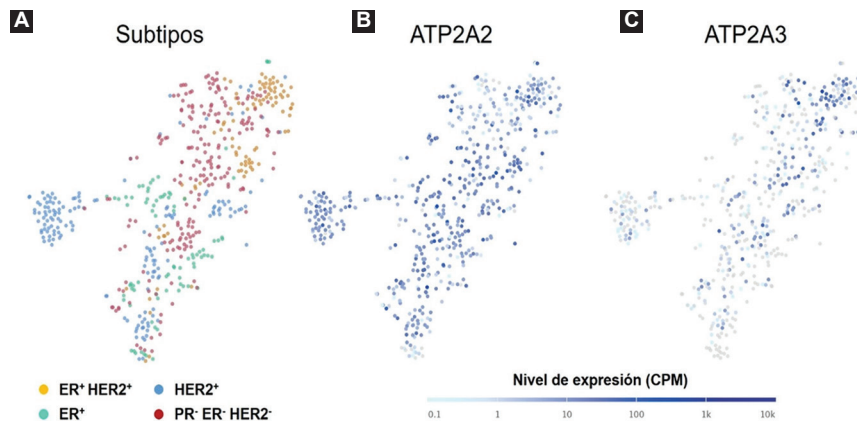


Figura 3. Expresión de ATP2A2 y ATP2A3 en cuatro subtipos de cáncer de mama analizados por secuenciación de ARN de una sola célula. En el panel A se muestra la distribución de las células acorde a los cuatro subtipos: ER+ HER2+ (amarillo), ER+ (verde), HER2+ (azul) y PR-, ER-, HER2- (rojo). Los paneles B y C muestran los resultados de los niveles de expresión (gradiente de azul) de ATP2A2 y ATP2A3, respectivamente. La expresión de ATP2A2 y ATP2A3 se analizó y visualizó en el Single Cell Expression Atlas (EMBL-EBI).

MCF-10A como modelo de tejido epitelial mamario normal.^{26,27} Interesantemente, encontramos que la expresión de ATP2A3 varía en los diferentes subtipos de CaMa (Figura 3C) y que sus mayores niveles de expresión se presentan en el subtipo ER+ HER2+, relacionado con las células MCF-7, seguido por el subtipo triple negativo (PR-, ER- y HER2-), relacionado con las células MDA-MB-231 y que los niveles más bajos se encontraron en el subtipo HER2+, el cual, junto con el triple negativo representan los subtipos de CaMa con peor pronóstico.

Todo esto es importante porque si bien se han mejorado las estrategias de tamizaje para detectar CaMa en etapas más tempranas, aún muchos casos son detectados en etapas avanzadas en las cuales la terapéutica es limitada y menos eficiente, desalentando el pronóstico de las pacientes.

Agradecimientos

Agradecemos a la doctora Martha Robles Flores por sus valiosos comentarios para mejorar este artículo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses alguno.

Financiamiento

La realización de este trabajo fue apoyada por los donativos PAPIIT-DGAPA-UNAM, con números IN219219 e IV20021 para Ángel Zarain-Herzberg.

Eduardo Izquierdo-Torres y Andrés Hernández Oliveras recibieron beca doctoral del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no realizaron experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Bibliografía

- Berridge MJ. Calcium signalling remodelling and disease. *Biochem Soc Trans.* 2012;40:297-309.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-674.
- Roberts-Thomson SJ, Chalmers SB, Monteith GR. The calcium-signaling toolkit in cancer: remodeling and targeting. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019;11:a035204.
- Chemaly ER, Troncone L, Lebeche D. SERCA control of cell death and survival. *Cell Calcium.* 2018;69:46-61.
- Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve.* 2007;35:430-442.
- Brini M, Carafoli E. Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev.* 2009;89:1341-1378.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68:394-424.
- DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD, Goding-Sauer A, et al. Breast cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69:438-451.
- Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5:66.
- Papp B, Brouland JP. Altered endoplasmic reticulum calcium pump expression during breast tumorigenesis. *Breast Cancer (Auckl).* 2011; 5:163-174.

11. Arbabian A, Brouland JP, Apati A, Paszty K, Hegedus L, Enyedi A, et al. Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during lung cancer cell differentiation. *FEBS J.* 2013;280:5408-5418.
12. Flores-Peredo L, Rodríguez G, Zarain-Herzberg A. Induction of cell differentiation activates transcription of the Sarco/Endoplasmic Reticulum calcium-ATPase 3 gene (ATP2A3) in gastric and colon cancer cells. *Mol Carcinog.* 2017;56:735-750.
13. Gélébart P, Kovács T, Brouland JP, van Gorp R, Grossmann J, Rivard N, et al. Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation. *J Biol Chem.* 2002;277:26310-26320.
14. Hernández-Oliveras A, Izquierdo-Torres E, Meneses-Morales I, Rodríguez G, Zarain-Herzberg A, Santiago-García J. Histone deacetylase inhibitors promote ATP2A3 gene expression in hepatocellular carcinoma cells: p300 as a transcriptional regulator. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019;113:8-16.
15. Crépin A, Bidaux G, Vanden-Abeeel F, Dewailly E, Goffin V, Prevarskaya N, et al. Prolactin stimulates prostate cell proliferation by increasing endoplasmic reticulum content due to SERCA 2b over-expression. *Biochem J.* 2007;401:49-55.
16. Fan L, Li A, Li W, Cai P, Yang B, Zhang M, et al. Novel role of Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 in development of colorectal cancer and its regulation by F36, a curcumin analog. *Biomed Pharmacother.* 2014;68:1141-1148.
17. Chung W, Eum HH, Lee HO, Lee KM, Lee HB, Kim KT, et al. Single-cell RNA-seq enables comprehensive tumour and immune cell profiling in primary breast cancer. *Nat Commun.* 2017;8:15081.
18. Papatheodorou I, Moreno P, Manning J, Fuentes AM, George N, Fexova S, et al. Expression Atlas update: from tissues to single cells. *Nucleic Acids Res.* 2020;48:D77-D83.
19. Ben-Porath I, Weinberg RA. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest.* 2004;113:8-13.
20. Meneses-Morales I, Izquierdo-Torres E, Flores-Peredo L, Rodríguez G, Hernández-Oliveras A, Zarain-Herzberg A. Epigenetic regulation of the human ATP2A3 gene promoter in gastric and colon cancer cell lines. *Mol Carcinog.* 2019;58:887-897.
21. Hon JD, Singh B, Sahin A, Du G, Wang J, Wang VY, et al. Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. *Am J Cancer Res.* 2016;6:1864-1872.
22. Moldovan L, Mitroi A, Petrescu CM, Aschie M. Classification of breast carcinomas according to gene expression profiles. *J Med Life.* 2013;6:14-17.
23. Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, et al. The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer (Auckl).* 2010;4:35-41.
24. Izquierdo-Torres E, Rodríguez G, Meneses-Morales I, Zarain-Herzberg A. ATP2A3 gene as an important player for resveratrol anticancer activity in breast cancer cells. *Mol Carcinog.* 2017;56:1703-1711.
25. Izquierdo-Torres E, Hernández-Oliveras A, Meneses-Morales I, Rodríguez G, Fuentes-García G, Zarain-Herzberg A. Resveratrol up-regulates ATP2A3 gene expression in breast cancer cell lines through epigenetic mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019;113:37-47.
26. Qu Y, Han B, Yu Y, Yao W, Bose S, Karlan BY, et al. Evaluation of MCF10A as a reliable model for normal human mammary epithelial cells. *PLoS One.* 2015;10:e0131285.
27. Varga K, Hollosi A, Paszty K, Hegedus L, Szakacs G, Timar J, et al. Expression of calcium pumps is differentially regulated by histone deacetylase inhibitors and estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2018;18:1029.