

FABIO HENRIQUE GUIMARÃES BRAGA

ESTUDO COMPARATIVO DO PERFIL PROTEÔMICO DE
LINHAGENS CELULARES EM DIFERENTES ESTÁGIOS
DO PROCESSO DE TUMOROGÊNESE DO CÂNCER DE
MAMA.

Belo Horizonte,
Minas Gerais-Brasil
2021

FABIO HENRIQUE GUIMARÃES BRAGA

ESTUDO COMPARATIVO DO PERFIL PROTEÔMICO DE
LINHAGENS CELULARES EM DIFERENTES ESTÁGIOS
DO PROCESSO DE TUMOROGÊNESE DO CÂNCER DE
MAMA.

Orientador: Prof.º Dr. Thiago Verano Braga
Co-orientador: Prof.º Dr. Jader dos Santos Cruz

Tese submetida ao Departamento de Bioquímica e
Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Doutor em
Bioquímica e Imunologia

Belo Horizonte,
Minas Gerais-Brasil
2021

- 043 Braga, Fabio Henrique Guimarães.
Estudo comparativo do perfil proteômico de linhagens celulares em diferentes estágios do processo de tumorigênese do câncer de mama [manuscrito] / Fabio Henrique Guimarães Braga. - 2021.
138 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof.º Dr. Thiago Verano Braga. Co-orientador: Prof.º Dr. Jader dos Santos Cruz.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.
1. Bioquímica e imunologia. 2. Neoplasias da Mama. 3. Carcinogênese. 4. Proteoma. 5. Metástase Neoplásica. I. Braga, Thiago Verano. II. Cruz, Jader dos Santos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.
- CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE FABIO HENRIQUE GUIMARÃES BRAGA. Ao um dia do mês de abril de 2021 às 13:30 horas, reuniu-se na forma “on line” na plataforma “us02web.zoom.us” no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Estudo comparativo do perfil proteômico de linhagens celulares em diferentes estágios do processo de tumorigênese do câncer de mama", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Thiago Verano Braga, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Helen Lima Del Puerto (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Fábio Cesar Sousa Nogueira (Universidade Federal do Rio de Janeiro), aprovado; Dra. Juliana Silva Cassoli (Universidade Federal de Pará), aprovado; Dr. Jader dos Santos Cruz - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Thiago Verano Braga - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

APROVADO

REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 01 de abril de 2021.

Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães (UFMG)

Dra. Helen Lima Del Puerto (UFMG)

Dr. Fábio Cesar Sousa Nogueira (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Dra. Juliana Silva Cassoli (Universidade Federal de Pará)

Dr. Jader dos Santos Cruz - Coorientador (UFMG)

Dr. Thiago Verano Braga - Orientador (UFMG)

AGRADECIMENTOS

E assim chega o final de mais um ciclo. Um ciclo de tentativas, superações e algumas conquistas. Um ciclo que em, num dado momento, se tornou um furacão que quase me lançou para longe. Mas hoje, mesmo com tudo que aconteceu, não posso deixar de agradecer a todos que me possibilitaram chegar aqui, a todos que não deixaram que eu desmoronasse, mesmo com a tempestade lá fora. Preciso agradecer a todos que acreditaram em mim!

Primeiramente agradeço a Deus e a Nossa Senhora da Medalha Milagrosa, que me trouxeram até aqui, me guiando e me protegendo em todos os caminhos tortuosos da nossa missão terrena. Agradeço todos os dias pelas oportunidades que me foram dadas!

A minha família, que em um dos momentos mais difíceis e tristes da minha vida, com a partida da minha amada mãezinha, me deram suporte físico, emocional e espiritual indispensáveis para que eu continuasse a caminhar. Em especial a minha irmã Izabel que é meu ponto de sensatez e de realidade, a quem eu prometi cuidar, mas acabo muito mais sendo cuidado por ela. Te amo incomensuravelmente com todas as minhas forças! Ao meu pai que, mesmo com todos os problemas, me ensinou valores importantíssimo, que me inspira a buscar o que eu quero com trabalho e força e que me ensina tanto sobre a vida. A tia Tina, escolhida por Deus para ser minha guia aqui na Terra! Não sei o que seria de mim sem você! Muito obrigado por tudo e por tanto! E a todos os meus familiares que estão a minha volta, me ensinando tudo o que eu preciso para evoluir no caminhar da vida.

Também não posso deixar de agradecer a todos os meus amigos, irmãos de alma que eu ganhei nessa vida e que me ensinam tanta coisa que não conseguiria aprender sozinho. Em especial ao Bruno, que em alguns anos de amizade me fez evoluir décadas, que meu emprestou o dinheiro da inscrição do doutorado, na época, e que torce e vibra por mim. Em especial também ao Saile, que é meu outro ponto de equilíbrio, que me proporciona os melhores encontros e momentos e que me dá segurança para ir além, porque sei que estará comigo sempre! A todos vocês muito obrigado!

Não posso deixar de agradecer a todas as pessoas com as quais eu tive a oportunidade de conviver, aprender e me tornar amigo durante esses anos de doutorado. Aos amigos da disciplina de Bases, dos quais ainda trago alguns comigo como companheiros profissionais e pessoais. A todos os professores que se disponibilizaram a dividir um pouco do que dominam com a minha formação. Ao pessoal sempre gentil e acolhedor da secretaria da Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia, que não medem esforços para nos ajudar em todos os momentos. Em especial ao saudoso Orlando, por sua disponibilidade de ouvir meus desabafos, minhas histórias e minhas angustias, mas também pela sua capacidade de me ensinar tanto com poucos gestos. A todos vocês muito obrigado!

Aos amigos do Laboratório LAMEX, que me acolheram tão bem e me proporcionaram tanto aprendizado e momentos incríveis. Não posso deixar de citar aqui a Tatiane, uma das melhores pessoas que já conheci na vida, extremamente disponível a tudo que precisava sempre; A Dayane, uma pessoa mais que especial, que estava sempre por perto para me socorrer nos mais incríveis problemas; A Verônica, uma das minhas melhores alunas até hoje, com quem tive a oportunidade de crescer e aprender ainda mais; Ao Narciso, nosso braço direito e esquerdo em

todos os momentos, além de ser nosso psicólogo particular no laboratório; e a todos os alunos e professores que contribuíram para minha formação e crescimento profissional e pessoal. Também aos amigos do Laboratório de Hipertensão, em especial aos amigos do Núcleo de Proteômica Funcional. Vocês me acolheram nos momentos mais delicados da minha vida e só por isso eu já seria eternamente grato. Mas além de me receberem tão bem, todos não mediram esforços para me ajudar em tudo que eu precisasse. A competência e garra de vocês me trouxeram vontade de fazer, vontade de aprender e paz, muita paz! Obrigado por todos os momentos impagáveis e por sempre lembrarem de mim. Em especial da Diana, Rafael e Lucas, que estavam comigo em todos os momentos e me ajudaram a chegar em lugares que nunca imaginei chegar. A vocês, muito obrigado de todo o meu coração!

E aos meus orientadores, não conseguiria explicar com palavras tudo o que vocês me proporcionaram em todos esses anos! Um livro de mil páginas seria pequeno para escrever e agradecer por tudo que vocês fizeram por mim durante essa caminhada.

A Prof.^a Andreia Laura, que me incentivou tanto a entrar no doutorado, que me conduziu, me ensinou, me moldou e me fez ser muito melhor do que eu poderia ser. Uma pessoa que além de inspiradora me deu a oportunidade de ser seu amigo e que me fez mais feliz e realizado pessoalmente e profissionalmente. Nunca conseguirei ser tanto para você quanto foi para mim! Mas vou me esforçar muito para estar no mínimo próximo ao que é! Muito obrigado por todas as oportunidades que me proporciona. Minha vida é mais feliz porque você existe!

Ao Prof.^o Jader Cruz, que abriu as portas do LAMEX para que eu pudesse realizar esse sonho, que me ensinou em todos os detalhes, a ser uma pessoa melhor, a ser um professor melhor, a ter responsabilidade e ética com o fazer ciência e a transformar todos os meus fracassos em alavancas para a minha vitória. Seus exemplos, seus ensinamentos e sua paixão pela ciência vão me inspirar pela vida toda! Muito obrigado por tudo! E muito obrigado pela paciência e pelo carinho em relação a mim no pior momento da minha vida. Serei eternamente grato!

E ao Prof.^o Thiago Verano-Braga, que foi reiteradamente minha possibilidade de seguir nos momentos em que acreditava ser meu ponto final. Eu não conseguiria te agradecer nessa vida e nem nas próximas por tudo que você foi e é para mim. Não só pelo exemplo de pesquisador fantástico, mas por ser uma pessoa extraordinária. Obrigado por acreditar em mim até nos momentos que nem eu mesmo acreditava. Obrigado por não ter desistido de mim. Obrigado por ter ido além de você para me buscar onde nem eu mesmo sabia que estava. O que aprendi com você nesses últimos anos, em todos os aspectos da minha vida, me transformou radicalmente da pessoa que eu era antes para a pessoa que sou hoje. Obrigado pela paciência e pela calma ao tratar comigo! Serei eternamente grato e espero que tudo que recebi de você volte triplicado em coisas boas na sua vida. Muito obrigado!

~V~

CARTA À MINHA MÃE!

Oi mãe! Tudo bem com você?

Pois é! Chegou o dia da minha defesa de Doutorado. E nesse momento tão marcante da minha vida meu coração se desfaz todo porque mesmo te sentindo plenamente dentro de mim, não consigo te ver, te tocar, correr para você e te abraçar. A gente pensou esse dia tão diferente, não é? Poucas semanas da sua partida você ainda comentou comigo sobre essa defesa. Me lembro claramente de você me pedido pra te avisar com antecedência do dia que seria a defesa para você compra uma roupa bem bonita pra você vir novamente na UFMG assistir à arguição. E eu queria muito que isso realmente se concretiza-se, mas infelizmente os planos de Deus eram outro

É tão difícil seguir sem você aqui com a gente! Às vezes acho quase impossível. A saudade é dilacerante. Ouvir sua voz me faz tanta falta, mas tanta falta que as vezes queria sumir. E suas ligações que aconteciam do nada e que ao invés de você falar “Alô” você já começava com “O que está acontecendo meu filho”, mesmo sem saber que realmente estava acontecendo algo. Filho! Que saudade de ouvir você me chamando assim!

Infelizmente a vida continua né?! E você nos preparou exaustivamente para isso. Você só se esqueceu de me preparar pra viver sem você!

A Bel está bem, está até namorando! A roça também está bem! Está precisando de arrumar algumas coisas mais isso eu já estou conseguindo resolver e já já ela vai estar tão linda igual há quando você cuidava!

Todos também estão bem! Vó Arlene, seus irmãos, sobrinhos, afilhados e todo mundo da família. Claro que sempre tem um probleminha né, você sabe como todo mundo é! Mas no geral tá todo indo. Os amigos também estão bem! O pessoal da escola, da Barra, todo mundo. A única coisa que ainda aperta em todos é a saudade de você, porque a gente te amava de mais!

Espero que Deus tenha te dado tudo que eu pedi para ele: Uma casinha bem linda pra você ficar com um jardim cheio de flores coloridas e lindas como você! Espero que a emoção do encontro com Nossa Senhora tenha sido do tamanho da sua devoção por ela. Espero que o encontro com o Vô Antônio também tenha sido mágico! Não só com ele, mas com todas as pessoas que amamos e já estavam nessa outra fase da nossa evolução.

Eu, por enquanto, continuo aqui, morrendo de saudade de você, do seu abraço, do seu beijo, do seu carinho e do seu amor! Eu espero, do fundo da minha alma, que você esteja recebendo todo amor que eu mando para você todos os dias. Não sei o que a vida espera de mim nem tão pouco o que Deus pretende que eu faça, mesmo estando pronto para agir e ficar aqui o tempo que Ele precisar. Mas não posso negar que eu espero ansiosamente o dia que vou te abraçar de novo! Vou fazer de tudo pra te dar muito orgulho, pode ter certeza. E por favor, não esquece de mim, não esquece de olhar por mim, e mesmo de longe não me deixa sozinho tá! Eu sei que não vai! Não mesmo!

~VI~

E pra finalizar, quero te dizer que te amo muito, mas muito mesmo. Te disse em vida e te digo depois dela. Cada vez mais e mais. Quem é a morte para separar a gente, não é? A gente tem Deus, tem Nossa senhora e tem AMOR! Vou cuidar de tudo tá, não se preocupe com isso! Também preciso te dizer muito obrigado tudo! Por tudo que eu já sabia e por tudo que eu não sabia que tinha mas que você deixou preparado. Não esquece de aparecer nos meus sonhos de vez em quando. Fico muito feliz quando isso acontece!

Um grande beijo, um abraço bem forte e muito amor para você Mãe!

Te amo! Te amo! Te amo!

Do seu menino.....Fabinho!

~VII~

*“Todos estamos matriculados na escola da vida
onde o maior mestre é o tempo”*

Cora Coralina

RESUMO

ESTUDO COMPARATIVO DO PERFIL PROTEÔMICO DE LINHAGENS CELULARES EM DIFERENTES ESTÁGIOS DO PROCESSO DE TUMOROGÊNESE DO CÂNCER DE MAMA.

O câncer de mama é a principal causa de morte em mulheres no mundo e sua incidência aumenta a cada ano. Condições genéticas e ambientais dão suporte para o surgimento de carcinomas com graus de agressividade e processos tumorigênicos distintos. Apesar de ser o câncer mais estudado no mundo, protocolos terapêuticos ainda não são eficientes para conter o número de mortes atuais. A heterogeneidade de tumores sólidos e o estudo *in vitro* entre linhagens normais e metastáticas dificultam a compreensão do processo carcinogênico e tumorigênico por não conseguirem responder por completo os circuitos celulares que sustentam o surgimento e a evolução tumorigênicas das células tumorais. A avaliação de contextos comuns e distintos entre as várias fase da evolução do tumor pode trazer luz a esse processo e subsidiar a construção de medidas diagnósticas e terapêuticas mais eficientes. Utilizando o estudo de linhagens celulares em diferentes estágios tumorigênicos (MCF-10A: origem não tumoral; MGSO-3 e MACL-1: origem de tumor primário; MDA-231-MD: origem metastática), o objetivo desse trabalho foi caracterizar condições que demonstrassem diferenças e semelhanças nos estágios de evolução tumoral através da análise proteômica. Foram identificadas e quantificadas 3.008 proteínas, das quais, após análise estatística com $P < 0,05$ e *fold-change* de 1,3, caracterizamos 1.709 proteínas em todas as linhagens celulares. As análises dos gráficos de PCA e do *heat map* evidenciaram a distinção das linhagens com relação ao seu estágio tumorigênico. Na análise de ontologia gênica, várias vias de sinalização se mostraram alteradas, com enfoque, nesse trabalho, para vias de metabolismo energético, alterações do citoesqueleto e do ciclo celular. Com relação ao metabolismo celular, linhagens tumorais de sítios primários e metastático possuem perfil de regulação distinto, com o catabolismo aeróbico ativo nas células MGSO-3 e MACL-1 e anaeróbico na célula MDA-231-MD. Em conjunto, células tumorais não possuem vias lipolíticas para produção energética, principalmente via β oxidação. Além da via anaeróbica, a linhagem metastática utiliza vias não canônicas para obtenção de energia, como *turnover* do citoesqueleto de actina. Vias metabólicas correlacionam-se com vias apoptóticas dependentes de mitocôndrias, com vias de BAX e Bcl ativas nas linhagens tumorais de origem primária e inativadas pela ação da proteína 14-3-3 ϵ nas linhagens tumorais de origem metastática. Além disso, a densidade de mitocôndrias também está diminuída nas células MGSO-3 e MACL-1 e aumentada na célula MDA-231-MD em comparação a célula MCF-10A. Com relação ao ciclo celular, as linhagens de sítio primário tem suas vias controladas ação do proteassoma 26s, o que não ocorre com a linhagem de sítio metastático. Já a arquitetura do citoesqueleto nas células MGSO-3 e MACL-1 apresentam uma desregulação das suas vias de controle, o que não acontece na célula MDA-231-MD, com processos biológicos de regulação semelhante à célula MCF-10A. Todos os resultados apresentados corroboram para a importância da questão tumorigênica como base da compreensão dos circuitos proteicos que determinam o estabelecimento, sobrevivência e maturação de células tumorais e podem subsidiar estudos sobre alvos diagnósticos e terapêuticos mais eficientes.

~IX~

Palavra chave: Câncer de mama; tumorigenese, proteoma tumoral; tumor primário e metastático

~X~

ABSTRACT

COMPARATIVE PROTEOMIC STUDY OF CELL LINES AT DIFFERENT STAGES OF THE BREAST CANCER TUMOROGENESIS PROCESS.

Breast cancer is the leading cause of deaths in women worldwide. Genetic and environmental conditions support the outbreak of carcinomas with varying degrees of aggressiveness and tumorogenesis, leading to the cell transformation to primary cancer cells. Such factors can also give rise to metastasis. Even though breast cancer is one of the most studied type of cancer, yet pharmacological and therapeutic treatments are not efficient to reduce death rate. The ways to study breast cancer are through fragments of solid tumors removed in surgical procedures or *in vitro* studies using cell lines, though both strategies have limitations. For example, fragment of solid tumor is composed by several cell populations, which leads to high heterogeneity. On the other hand, *in vitro* studies usually are based on metastatic tumor lines, reflecting only the end of the tumor development process. The main objective of this work was to evaluate the proteome profile of breast cancer cell lines at different tumorigenic stages to better understand the molecular mechanisms underlying the tumorigenic process. Through the comparative analysis of the proteomes of MCF-10A (non-tumor origin), MGSO-3 and MACL-1 (primary tumor origin), and MDA-231-MD (metastatic origin) cell lines, we evaluated the functional state of each cell profile. In total, we identified and quantified 3,008 proteins and 1,709 regulated proteins ($P < 0.05$ and fold-change = 1.3). The PCA analysis and heat map showed a correlation between tumorigenic profile and proteome profile. Besides, the Venn diagrams demonstrated that similar tumorigenic profiles also shared higher number of proteins. Through gene ontology analysis, several positive and negative regulated biological processes were found across the cell lines. Similar biological processes were grouped into large clusters. In this work, we focused our analyses in terms related to energy metabolism, alterations in the cell cycle, and alterations in the cytoskeleton. Concerning energy metabolism, the tumor cell lines showed downregulation of lipid biosynthesis and the metastatic cell (MDA-231-MD) was the only one showing upregulation of β -oxidation. On the other hand, proteins related with the carbohydrate metabolism were mainly upregulated in the primary cells (MGSO-3 and MACL-1) and downregulated in the metastatic cell, mainly the proteins associated with the aerobic phase. These results are in line with an aerobic metabolism for the primary tumor lines and anaerobic metabolism for the metastatic one. This metabolic dichotomy seems to reflect on mitochondrial activity, as the primary tumor cells had lower mitochondrial density compared with the normal and metastatic cell lines. Furthermore, regulation profile of proteins associated with the mitochondrial BAX-dependent apoptotic pathways suggest that the primary cells are more prone for apoptosis compared with metastatic and normal cells. Regarding the cell cycle, the tumor cell lines have the highest number of upregulated processes. Besides, primary tumor cells seem to have upregulated biological processes related to the 26s proteasome, which is responsible for controlling oxidative processes and signaling pathways, mainly on the MACL-1. Regarding the cytoskeleton, the MDA-231-MD was the only tumor cell line to show upregulated biological processes, mainly related to cell adhesion mechanisms. Moreover, some upregulated proteins associated with cytoskeleton were also related with the glycolytic pathway, demonstrating that the role of cytoskeleton proteins are not only structural and for

~XI~

defense, but also for the survival of the metastatic tumor cell. All the results presented here are important for the better understanding of the molecular grounds of breast cancer tumorigenesis.

Key words: Breast cancer; tumorigenesis, cancer proteome; primary and metastatic tumor

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Taxa estimada de novos casos de Câncer de Mama no Brasil no ano de 2019.	7
Figura 2 – Representação esquemática das duas teorias aceitas para o surgimento do câncer de mama (Célula tronco tumoral e origem estocástica).	9
Figura 3 – Representação esquemática dos principais componentes do microambiente tumoral e seus papéis no estabelecimento e progressão do câncer de mama.	12
Figura 4 – Representação esquemática da hierarquia epitelial mamária e a seu potencial relacionamento com os principais subtipos de câncer de mama.	14
Figura 5 - Representação esquemática da complexidade e de moléculas/eventos de interesse durante a transição da genômica e transcriptômica para estudos baseados em proteômica.	20
Figura 6 – Concentração de algumas proteínas encontradas no plasma humano.	22
Figura 7. Figura esquemática da utilização do TMT10plex.	24
Figura 8 – Representação esquemática do fluxograma de trabalho da etapa de preparação das amostra para análise proteômica via LC-MS/MS.	33
Figura 9 – Gráfico de PCA (Análise de Componentes Principais), em duas dimensões, apresentando a disposição espacial das amostras experimentais utilizadas.	37
Figura 10 - Histograma da distribuição das proteínas quantificadas nos datasets dos Pools.	39
Figura 11 – Histograma da distribuição das proteínas quantificadas nos datasets da linhagem MCF-10A.	40
Figura 12 – Histograma da distribuição das proteínas quantificadas nos datasets da linhagem MGSO-3.	41
Figura 13 – Histograma da distribuição das proteínas quantificadas nos datasets da linhagem MACL-1.	42
Figura 14 – Histograma da distribuição das proteínas quantificadas nos datasets da linhagem MDA-231-MD.	43

Figura 15 – Gráfico de box-plot das quatro linhagens celulares experimentais utilizadas (MC: MCF-10A; MG: MGSO-3; MA: MACL-1; MD: MDA-231-MD).	44
Figura 16 – Gráfico de box-plot grupos experimentais de referência (POOLs).	45
Figura 17 – Gráfico de calor (heatmap) das quatro linhagens celulares experimentais avaliadas.	46
Figura 18 – Gráfico de Volcano plot evidenciando a quantidade de proteínas mais abundantes (up) e menos abundantes (down) das amostras experimentais utilizadas para $p < 0,05$ e fold-change $> 1,3$.	48
Figura 19: Diagrama de Venn das proteínas menos abundantes ($P < 0,05$ e fold-change $< -0,38$ (log2)) nas quatro linhagens celulares analisadas.	49
Figura 20: Diagrama de Venn das proteínas mais abundantes ($P < 0,05$ e fold-change $> 0,38$ (log2)) nas quatro linhagens celulares analisadas.	50
Figura 21: Perfil dos processos biológicos encontrados, por ontologia gênica (GO), nas linhagens celulares não tumorais e tumorais, agrupados em oito categorias distintas.	54
Figura 22 – Gráfico de calor (heatmap) das quatro linhagens celulares experimentais avaliadas. Somente as proteínas associadas ao metabolismo energético estão representadas.	55
Figura 23 – Gráfico dos processos biológicos relacionados ao metabolismo energético na síntese e degradação de lipídeos para cada linhagem celular.	56
Figura 24 – Avaliação do processo de β oxidação nas linhagens celulares estudados.	58
Figura 25 – Gráfico dos processos biológicos relacionados ao metabolismo energético no controle da glicose e glicólise para cada linhagem celular analisada.	60
Figura 26 – Mapa de calor (heatmap) das proteínas identificadas neste estudo e associadas ao processo de metabolismo do piruvato.	60
Figura 27 - Representação esquemática das vias envolvidas no metabolismo de glicose, evidenciando as proteínas associadas ao metabolismo de piruvato que foram encontradas na análise do proteoma das linhagens celulares estudadas.	62
Figura 28 – Quantificação da abundância da proteína GAPDH.	63
Figura 29 – Percentual de proteínas reguladas e associadas ao Ciclo de Krebs e a Fosforilação Oxidativa para cada linhagem celular analisada.	64

Figura 30 – Mapa de calor (<i>heatmap</i>) das proteínas reguladas e associadas ao Ciclo de Krebs e a Fosforilação Oxidativa nas quatro linhagens celulares experimentais.	65
Figura 31 – Rede de interação de proteínas presente nas quatro linhagens celulares estudadas. A espessura da linha de ligação entre as proteínas indica a força de interação entre elas.	66
Figura 32 – Representação esquemática do ciclo do ácido cítrico. As proteínas reguladas nesse processo estão descritas nos quadros ao lado de cada enzima (em azul). A regulação de cada linhagem é determinada por padrão de cores.	67
Figura 33 – Representação esquemática da fosforilação oxidativa.	68
Figura 34 – Percentual de proteínas reguladas e associadas a processos mitocondriais para cada linhagem celular analisada.	70
Figura 35 – Gráfico de calor (<i>heatmap</i>) das proteínas relacionadas à processos apoptóticos mitocondriais nas quatro linhagens celulares experimentais avaliadas.	71
Figura 36 – Representação esquemática da via de ativação apoptótica mitocondrial através das proteínas Bax e 14-3-3.	73
Figura 37 – Análise em citometria de fluxo das quatro linhagens celulares estudadas após marcação com MITOTRACKER.	74
Figura 38 – Mapa de calor (<i>heatmap</i>) das proteínas reguladas e associadas à regulação do Ciclo Celular nas quatro linhagens celulares experimentais avaliadas.	75
Figura 39 – Percentual de proteínas reguladas e associadas ao ciclo celular para cada linhagem celular analisada.	77
Figura 40 – Regulação de proteínas do proteassoma 26S.	78
Figura 41 - Percentual de proteínas reguladas e associadas ao citoesqueleto para cada linhagem celular analisada.	79
Figura 42: Mapa de calor (<i>heatmap</i>) das proteínas relacionadas à adesão celular nas quatro linhagens celulares experimentais avaliadas.	81
Figura 43: Rede de interação de proteínas de uma região específica do gráfico de calor da figura	83

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Características dos subtipos moleculares de CM	16
Tabela 2 – Origem das células tumorais de CM	18
Tabela 3 – Origem e composição dos POOLs gerados para ser um <i>dataset</i> de referência	32
Tabela 4 – Anticorpos utilizados na avaliação de expressão de proteínas por Western Blot	35
Tabela 5 – Número de proteínas identificadas significativamente reguladas utilizando os diferentes filtros estatísticos ($P < 0,05$ ou <i>fold-change</i> = 1,3 e $P < 0,05$)	47
Tabela 6 – Processos biológicos mais relevantes das proteínas menos abundantes e exclusivas de cada linhagem celular	52
Tabela 7 – Processos biológicos mais relevantes das proteínas mais abundantes e exclusivas de cada linhagem celular	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APAF1	<i>Apoptotic protease activating fator 1</i>
ATP	Adenosina Tri Fosfato
Basal-like	Tumor do tipo Basal
BRCA 1	Gene de Supressão TumoralBreast Cancer 1
BRCA 2	Gene de Supressão TumoralBreast Cancer 2
CAF	Fibroblastos Associados ao Câncer
Cav-1	Caveolina 1
CCL	Quimiocina Ligante
CDH1	Caderina 1
CHEK2	Gene Supressor de Tumor CHK2
CM	Câncer de Mama
CNVs	Varição do Número de Cópias
COLVI	Colágeno VI
COMT	Catecol O-Metiltransferase
CSF-1	Fator Estimulador de Colônia 1
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E2	Estrona E-2
EASY NI	Cromatografia Líquida de Nanofluxo
EDTA	Ácido Etilenodiaminico Tetra-acético
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
ER	Estrógeno
ESI	Ionização por Eletrospray
FAP	Proteína Ativadora de Colágeno
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FSP1	Proteína Específica de Fibroblasto
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i>
GAPDH	Gliceraldeido 3 Fosfato Desidrogenase
GO	Ontologia Gênica
GTP	Guanosina Tri-fosfato
HCD	Dissociação por Colisão de Alta Energia
HEATMAP	Mapa de Calor
HER2	Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performace
hTERT	Transcriptase Reversa da Telomerase
IL	Interleucina
LC	Cromatografia Líquida
LC-MS	Cromatografia Líquida seguida de Espectrometria de Massa
Luminal A	Tumor do tipo Luminal A
Luminal B	Tumor do tipo Luminal B
M	Molar
MALDI	Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz
MMP	Metaloproteinase de Matriz

MOMP	<i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>
MS	Espectrometria de Massa
MUC1	Mucina Associada a Membrana 1
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NAF	Fibroblastos Não Associados ao Câncer
NF-κB	Fator Nuclear κ B
NKs	Células Natural Killer
NPI	Índice Prognóstico Nottingham
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI 1	Ativador de Plasminogênio 1
PCA	Análise de Componente Principal
PDGRF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PR	Progesterona
RANKL	Ligante do Fator Nuclear K β
RNAm	Ácido Ribonucleico Mensageiro
RNAs	Ácidos Ribonucleicos
SDF	Fator Derivado do Estroma
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture</i>
TAM	Macrófagos Associados ao Tumor
TEAB	Bicarbonato de Trietilamônio
TECEP	Cloridrato de Tris(2-Tarboxietil)Tosfina
TFA	Ácido Trifluoroacético
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador β
TMT	<i>Tandem Mass Tags</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
TP53	Fator de Trascrição 53
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	III
CARTA À MINHA MÃE	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XVI
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Epidemiologia do Câncer de Mama	5
2.2 Fisiopatologia do Câncer de Mama	8
2.3 Tipos de Câncer de Mama	13
2.4 Formas de se estudar o CM	16
2.5 Proteômica	20
2.6 Proteômica e o CM	25
3 JUSTIFICATIVA	28
4 OBJETIVOS	29
4.1 Objetivos específicos	29
5 METODOLOGIA	30
5.1 Cultura Celular	30
5.2 Extração das proteínas celulares para proteômica	30
5.3 Preparação do “POOL” de referência	31
5.4 Marcação das proteínas pelo kit <i>TMT10plexTM Isobaric Labe Reagent Set</i>	32
5.5 Pré-fracionamento “offline”	34
5.6 Análise proteômica: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução	34
5.7 Análise de Bioinformática	35
5.8 Quantificação de proteínas por Western Blot	35
5.9 Determinação da densidade de mitocôndrias através da marcação com MITOTRACKER TM Green	36
5.10 Análise Estatística	36
6 RESULTADOS	37
6.1 Visão geral do perfil proteômico das linhagens analisadas	37
6.2 Metabolismo energético nas linhagens celulares em estudo	54
6.2.1 Síntese e degradação de lipídeos	56
6.2.2 Glicólise e metabolismo do piruvato	59
6.2.3 Ciclo de Krebs e Fosforilação Oxidativa	63
6.2.4 Processos biológicos relacionados a alterações mitocondriais	68

6.3	Alterações relacionadas ao Ciclo Celular	74
6.4	Alterações relacionadas ao Citoesqueleto	79
7	DISCUSSÃO	84
7.1	Alterações relacionadas ao metabolismo energético	86
7.2	Alterações relacionadas ao ciclo celular	92
7.3	Alterações relacionadas ao citoesqueleto	93
8	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
	ANEXO I – Manuscrito trabalho para publicação	110

1 - INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é uma doença complexa com diversos desencadeadores do processo patogênico e diferentes fatores envolvidos na história natural da doença. Apesar da diminuição do número de novos casos em todo mundo (HASHIN, 2016), o CM é um dos principais tumores malignos responsáveis por mortes na população feminina (BRAY, 2012). O CM é considerado uma patologia multifatorial com sua gênese no balanço entre fatores genéticos e ambientais do indivíduo. Estudos de coorte em gêmeos univitelinos descrevem que a carga genética tem impacto de 20 a 40% e fatores ambientais possuem impacto entre 60 a 80% no desenvolvimento do CM (LICHTENSTEIN, 2000).

No contexto genético, vários marcadores moleculares já estão bem descritos na literatura e, na sua grande maioria, estão relacionados ao reparo de dano ao DNA e controle do ciclo celular. A presença de polimorfismos relacionados a esses genes correlaciona-se com a maior susceptibilidade de desenvolvimento do CM, e sua identificação, em muitos casos, é utilizada como valor prognóstico para o desenvolvimento da doença (MELCHOR, 2013). Os genes de supressão tumoral BRCA 1 e 2, que participam de vários processos celulares, desde o controle transcricional até o controle de proliferação e diferenciação celular, foram caracterizados na década de 1990 (MIKI et al e WOOSTER et al citados por AMENDOLA, 2005) e apresentam valor prognóstico importante para os vários tipos de câncer como o de pâncreas, próstata, ovários, colorretal e mama (LEÃO, 2017). Estima-se que os portadores de polimorfismos nos genes BRCA1/2 apresentem uma probabilidade de 70% para o surgimento do CM em algum estágio da vida (AMENDOLA, 2005; LEWIS, 2018). Testes moleculares para sua identificação são utilizados para o desenho de estratégias terapêuticas e tomada de decisão cirúrgica, como para preservação da mama, mastectomia uni ou bilateral e previsão de risco do surgimento de novo tumor primário (TRAINER, 2010).

Outro polimorfismo avaliado em conjunto com o BRCA1/2 é o gene TP53, que também é considerado um gene de supressão tumoral. Alterações na expressão desse gene correlacionam-se com o surgimento de câncer mais precocemente, geralmente antes dos 30 anos, inclusive o CM. Outros genes também podem ser avaliados, como CDH1, STK11, CHEK2, mas ainda não foram estabelecidos os reais valores diagnósticos desses com o CM (LEWIS, 2018).

No contexto ambiental, vários fatores estão ligados a morbi-mortalidade do CM. Hábitos de vida, dieta, obesidade, práticas de exercícios físicos e uso de tabaco são bem descritos pela literatura (CEDOLINI, 2014, PIERCE, 2018). Bérubé e colaboradores (2014) demonstraram que o uso do tabaco estava ligado com surgimento do CM mais precocemente, após os 50 anos, e a um aumento da mortalidade das pacientes entre 30 a 60%.

Fatores socioeconômicos também estão correlacionados com a morbi-mortalidade do CM. Estudos demonstram uma estreita relação entre o acesso a modernas formas de diagnóstico e tratamento com a diminuição da mortalidade pelo CM em países desenvolvidos (TORRES, 2015). Essa correlação também é visualizada no Brasil, porém ocorre de forma desigual entre as regiões do país, tangendo os níveis socioeconômicos de cada região (GIRIANELLI, 2014).

Outras características importantes para o desenvolvimento do câncer de mama são as condições clínicas do paciente, como idade, utilização de medicamentos estrogênicos, trabalhos noturnos e menopausa. Em geral, mulheres acima de 50 anos são mais susceptíveis ao desenvolvimento de CM, com maiores taxas de mortalidade em idades mais avançadas (LIN, 2015; MEIRA, 2015). Co-morbidades também possuem importância clínica, já que podem diminuir a taxa de sobrevivência dos pacientes com CM, como no caso das anemias pré-operatórias e doenças cardíacas (JORDAN, 2014; ZANG, 2014; GARCIA, 2015).

O CM, possivelmente, é o tipo de câncer mais estudado no mundo, fato que provavelmente está ligado à sua grande prevalência. Estimativas da Organização Mundial da Saúde indicam que mais de 600 mil mulheres morreram em 2018 em decorrência do CM, que é 15% do total de mortes associadas aos vários tipos de câncer (OMS, 2020). No Brasil, são esperados mais de 66 mil novos casos de CM, com uma mortalidade de aproximadamente 17 mil mulheres para o ano de 2020 (INCA, 2020). Essa dicotomia entre a vasta densidade de dados sobre o assunto e a permanência e/ou aumento da perda de vidas para a doença sugere que novos vieses de forma de estudo sejam pensados e utilizados, a fim de trazer luz a complexidade do CM.

A própria característica da doença, dada a alta heterogeneidade de padrões celulares tumorais e a dificuldade de avaliação da história natural da doença, entre o processo carcinogênico até o processo tumorigênico, dificultam a compreensão dos gatilhos que

desencadeiam o surgimento desse tipo de câncer e conseqüentemente as medidas diagnósticas e terapêuticas (TERP, 2012; JUNTILA, 2013).

Mais do que identificar gatilhos de transformação tumoral, o monitoramento de processos tumorigênicos, que moldam as características funcionais das células alteradas, podem determinar características de malignidade de cada perfil tumoral e possibilitar um desenho personalizado do tipo de tumor de cada paciente (NOWSHEEN, 2012; AFZALI, 2019). Para tanto, a utilização de avaliações genômicas e proteômicas, que possibilitam essa caracterização tumorigênica, podem subsidiar decisões clínicas assertivas em relações a alvos ou tratamentos específicos, inclusive com mensuração do desenvolvimento de resistência aos alvos escolhidos (DEY, 2017).

Análise de características genômica já é utilizada na determinação de vários marcadores clínicos importantes, mas não necessariamente refletem o estado funcional da célula tumoral. Isso porque características genômicas intrínsecas depende da conclusão do processo de tradução com produção de proteínas funcionais que direcionam o percurso da atividade celular. Taynova e colaboradores (2016), avaliando subtipos de CM, evidenciaram que algumas proteínas importantes na caracterização da heterogeneidade tumoral não se correlacionavam com padrões moleculares da célula. Desta forma, não só a avaliação genômica, mas a avaliação proteômica, que possibilita definir o perfil de proteínas do tipo celular em estudo, poderiam elucidar as similaridades e especificidades das células em diferentes estágios tumorigênicos.

Por isso, estudos acerca da caracterização de padrões proteômicos em distintas condições tumorigênicas são fundamentais para que se possa entender a pato-fisiologia tumoral do CM e possibilitar o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas mais eficientes.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia do Câncer de Mama

O CM é o principal tipo de tumor maligno que acomete mulheres no mundo e com taxas de sobrevida diferentes entre países desenvolvidos e em desenvolvimento (AKRAM, 2017;

VIEIRA 2017). Segundo Coleman e colaboradores (2008), a estimativa de vida após 5 anos do diagnóstico do CM é de 80% em países desenvolvidos e 40% em países em desenvolvimento. Entre os fatores que determinam essa discrepância estão os recursos e infraestrutura que cada país disponibiliza para o diagnóstico e tratamento da população acometida (ANDERSON, 2008).

Nos últimos anos, os países em desenvolvimento apresentaram um aumento das taxas de incidência do CM, com um maior grau de mortalidade em comparação aos países desenvolvidos (TORRE, 2015). Na América Latina, o aumento da mortalidade foi evidenciado a partir da década de 1980, com sobrevida 20% menor dos casos, quando comparados aos Estados Unidos e Europa ocidental (AMANDOU, 2014). No Brasil, as maiores taxas de mortalidade por CM foram verificadas a partir dos anos 2000 (KLUTHCOVSKY, 2014; MEIRA, 2015). Em 2018 foram registrados mais de 2 milhões de novos casos de CM no mundo com mais de 600 mil mortes. Na América do Sul houve uma incidência de 56,8 novos casos com mortalidade de 13,4 casos para cada 100 mil habitantes, em 2018 (BRAY, 2018). Em média, espera-se que a incidência global para o CM em 2021 seja de 85 para cada 100 mil mulheres (HAN, 2013), com aproximadamente 100 mil casos a mais de CM em países em desenvolvimento quando comparados a países desenvolvidos (AKRAM, 2017). Para o Brasil (Figura 1), o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima uma incidência de mais de 66 mil novos casos, para o mesmo ano (INCA, 2020)

Algumas características e fatores de risco, advindas do século XXI, podem ter proporcionado uma maior susceptibilidade do CM em mulheres. A mama é um órgão sensível ao estrógeno e ao uso de pílula anticoncepcional e/ou reposição de estrógeno combinado com obesidade, baixa ingestão de fibras e sedentarismo podem contribuir para o surgimento do CM. A diminuição da reposição hormonal pós menopausa reduziu a incidência de CM nos Estados Unidos e na Europa após a publicação de Rossouw e colaboradores, em 2002, correlacionando o uso da reposição hormonal com o CM (AKRAM, 2017, BRAY, 2018).

A incidência do CM aumenta com a idade, com maior probabilidade de ocorrência em mulheres acima dos 50 anos e incidência de 2 casos a cada 1000 neste grupo em específico. A quantidade de filhos também é um fator de risco para o CM, com uma menor probabilidade do desenvolvimento da doença em mulheres com múltiplas gestações, devido a menor exposição do tecido mamário ao estrógeno (BRAY 2018; AKRAM, 2017). Andsoy e colaboradores

(2014) também descreverem, em seu estudo, que não só a gestação em si, mas as mulheres que tiveram filhos próximo aos 20 anos tinham uma menor incidência de CM do que mulheres que tiveram filhos após os 30 anos ou que não tiveram filhos.

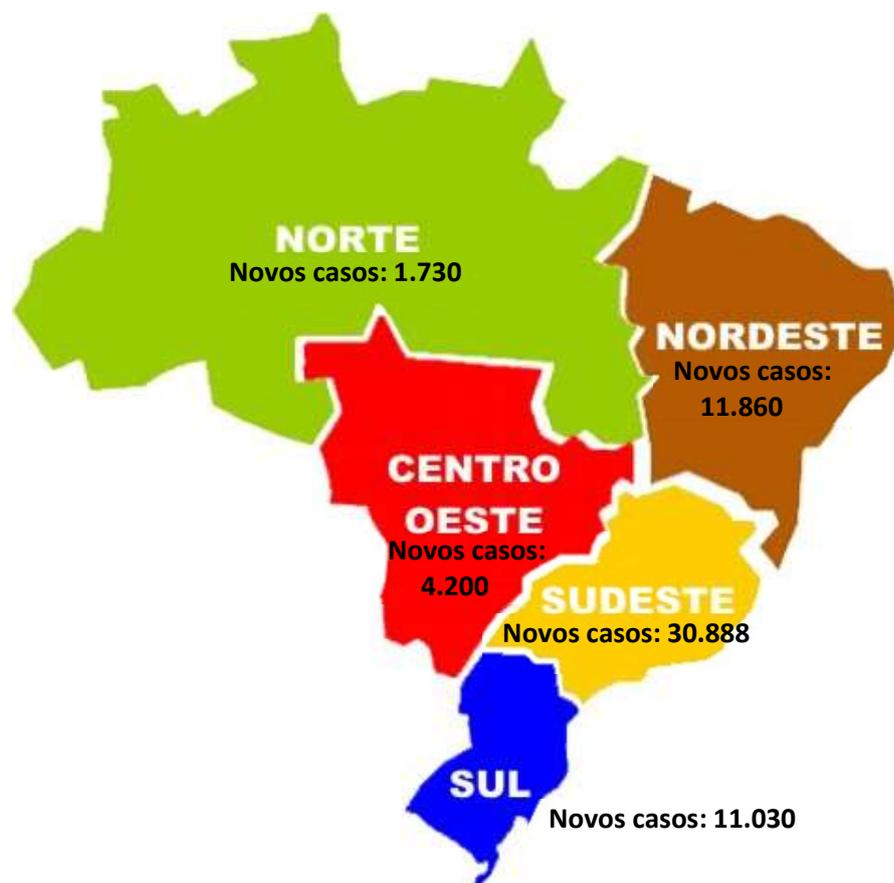


Figura 1: Taxa estimada de novos casos de Câncer de Mama no Brasil no ano de 2019. Fonte: INCA – Ministério da Saúde

Outras características também são descritas como fatores de risco para o CM, como o histórico familiar, a presença de tumores benignos, produção de estrógeno pelo tecido adiposo em mulheres obesas pós menopausa, deficiência de vitamina D, presença de outros tipos de câncer, principalmente os do tipo ginecológico, menarca precoce, uso de contraceptivos orais e reposição hormonal. Também são considerados fatores importantes para o aumento da incidência do CM em mulheres o consumo de álcool e tabagismo (BÉRUBÉ, 2014; TORRES, 2015; AKRAM, 2017).

Na América Latina, alguns fatores de risco são descritos como críticos para o desenvolvimento do CM. Um baixo nível de qualidade de vida, sedentarismo, sobrepeso, alta

ingestão de carboidratos, consumo de carne vermelha e deficiência vitamínica, como B12 e D, são fatores que podem aumentar a incidência de CM tanto pré como pós menopausa (AMADOU, 2014).

2.2 – Fisiopatologia do Câncer de Mama

Homens e mulheres possuem mamas, que se desenvolvem de forma semelhante durante o período embrionário até o nascimento. Todas as estruturas características do órgão como o tecido glandular, ductal e tecido adiposo permanecem quiescentes após o nascimento, até a puberdade. Nos homens, os aumentos dos hormônios androgênicos produzidos após a puberdade bloqueiam qualquer crescimento de ductos e estroma mamários, que involuem e atrofiam, permanecendo apenas o tecido adiposo. Já nas mulheres, os hormônios estrogênicos induzem o crescimento e desenvolvimento do tecido mamário que, no final da maturação do órgão, possuem um equilíbrio tecidual entre a quantidade de rede de ductos, estroma fibroglandular e de parênquima adiposo (JESINGER, 2013).

A mama feminina é um órgão desenhado para proporcionar a nutrição ao bebê durante a lactação, além de prazer sexual para a mulher. Por serem sensíveis às variações de hormônios femininos, os seios adotam as mudanças cíclicas do período menstrual com alteração da densidade do parênquima mamário dependendo dos níveis hormonais durante o ciclo (AKRAM, 2017).

Os tumores de mama geralmente se iniciam durante a hiperproliferação ductal, que podem desenvolver desde tumores benignos até carcinomas de diversos subtipos, inclusive metastáticos, após estimulação crônica de fatores carcinogênicos (SUN, 2017). De acordo com estudos de Polyak e colaboradores (2007) e Basses e colaboradores (2015), existem duas hipóteses diferentes para o surgimento e progressão do CM: a teoria da célula tronco tumoral e a teoria estocástica (Figura 2). A teoria da célula tronco tumoral sugere que todos os subtipos de CM têm origem na mesma célula tumoral oriunda de uma célula progenitora indiferenciada na qual as mutações genéticas e/ou epigenéticas que porventura ocorram nessas células durante a proliferação celular direcionariam para os diferentes tipos de CM. Já a teoria estocástica descreve que os diferentes tipos de CM têm origem em células diferenciadas que acumulariam alterações genéticas e/ou epigenéticas ao longo da sua proliferação, se transformando em diferentes tipos de células tumorais e dando origem aos diversos tipos de tumores classificados.

Apesar das duas teorias serem bem aceitas, nenhuma delas tem suporte total para esclarecer a forma como o CM se desenvolve.

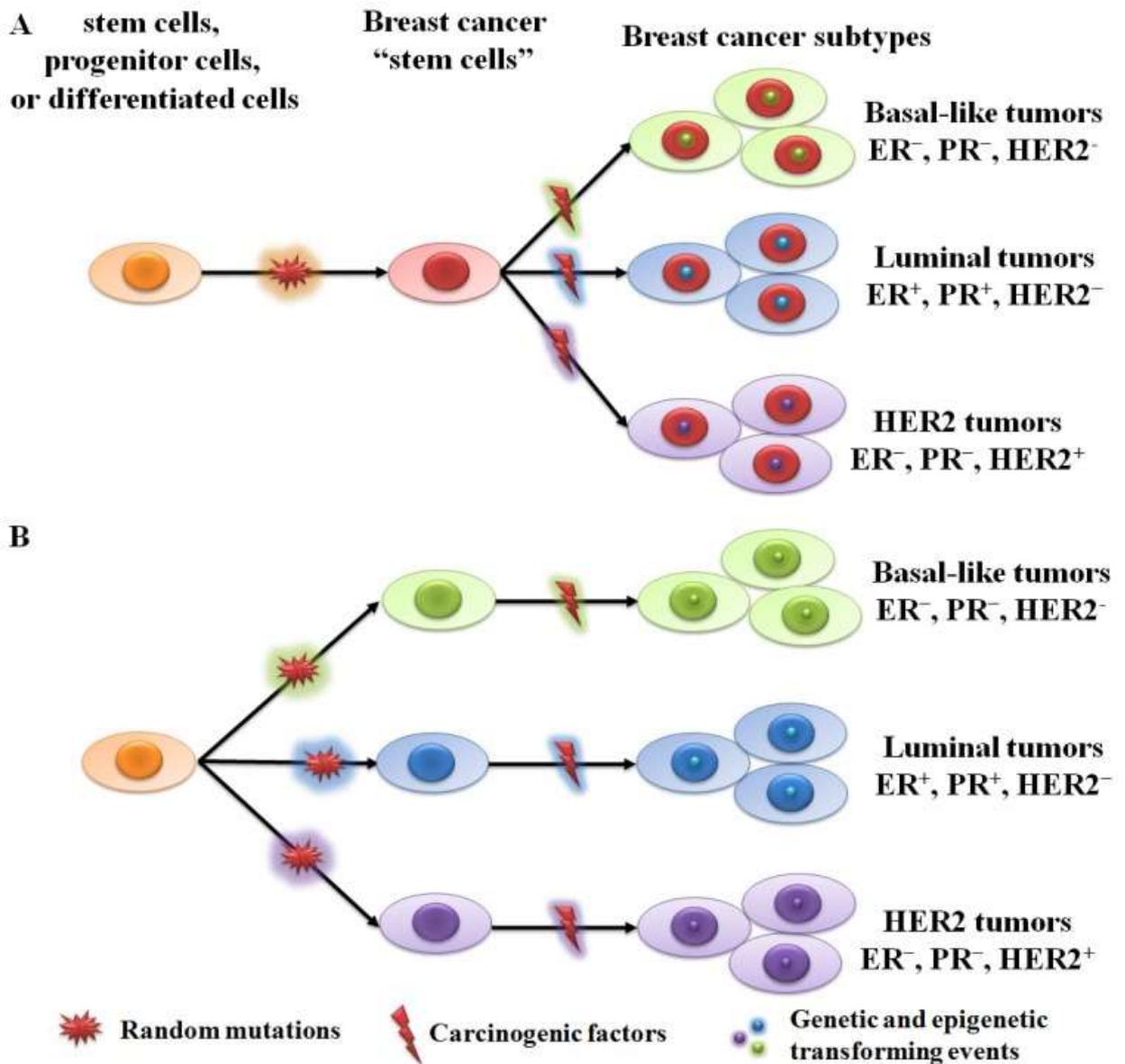


Figura 2 – Representação esquemática das duas teorias aceitas para o surgimento do CM. A figura A representa a teoria do surgimento do CM através de uma célula tronco tumoral. A figura B apresenta a teoria do surgimento do CM através de uma mutação estocástica. Fonte: SUN, 2017.

Como descrito anteriormente, fatores genéticos também possuem uma forte influência sobre o desenvolvimento do tumor e são amplamente utilizados no estabelecimento de riscos, diagnósticos e prognósticos do CM. Os anti-oncogenes BRCA1 e BRCA2, descobertos na

década de 1990, são amplamente utilizados para esse fim, tanto para o CM quanto para o câncer de ovário. Apesar da importância de fatores de risco ambientais, vários pacientes diagnosticados com CM não apresentavam polimorfismos dos genes BRCA1/2, o que possibilitou a investigação da susceptibilidade poligênica para o CM, além da classificação entre risco gênico dependendo do polimorfismo encontrado (FILIPPINI, 2013).

O risco de desenvolvimento de CM em indivíduos com polimorfismos nos genes BRCA1/2 é alto. Em média, 25% dos CM hereditários e de 5 a 10% do total de CM são causados por alteração desses genes. Na população, a frequência de mutações do gene BRCA1 é de aproximadamente 1 para cada 300 indivíduos e do gene BRCA2 de 1 para cada 800 indivíduos (FILIPPINI, 2013; SUM, 2017). Apesar de apresentar uma menor frequência de alteração quando comparado ao gene BRCA1/2, os polimorfismos no gene TP53 estão presentes na maioria dos tumores sólidos e conferem um risco de 18 a 60 vezes maior para o desenvolvimento de CM em pacientes abaixo dos 45 anos quando comparado à população em geral (BLANCO, 2010).

O Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (*HER 2*, da sigla em inglês) também é um importante oncogene do CM. Ele é um receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*, da sigla em inglês) e é detectado em 20% dos CM primários com prognóstico desfavorável (ELIZALDE, 2016). O gene c-Myc codifica a proteína Myc, um fator de transcrição que regula 15% de todos os nossos genes. O aumento da sua expressão está associado ao desenvolvimento e progressão de células tumorais de CM altamente agressivas e invasivas, enquanto em tumores benignos o aumento da proteína Myc não é encontrado (JUNG, 2017).

Polimorfismo de outros diferentes tipos de genes já foram identificados e classificados com risco moderado para o CM, apesar de algumas alterações serem relativamente incomuns na população (menor do que 1%). Alterações nos genes CHEK2, ATM, BRIP1, PALB2 e RAD51C estão associados a um risco de 1,5 a 5 vezes maior para o desenvolvimento de CM (FILIPPINI, 2013). Genes relacionados ao metabolismo de hormônios estrogênicos, como CYP17, COMT, CYP1A1 e CYP19, têm sido amplamente estudados. Apesar de não estarem totalmente estabelecidos como critério para diagnóstico, dados apontam para a importância da sua utilização para o prognóstico do CM (ITO, 2016).

Outro fator importante para a patogênese do CM é a composição do microambiente tumoral, que compreende às células tumorais em proliferação associadas a uma grande variedade de células não tumorais presentes no estroma peritumoral. Dentre os componentes do microambiente tumoral, encontram-se fibroblastos, células do sistema imune, células endoteliais, células do infiltrado inflamatório, moléculas de sinalização, componentes da matriz extracelular, dentre outras, que apresentam diferentes densidades e concentrações de acordo com o tipo de CM (MITAL, 2018).

A fina organização e comunicação entre parênquima e estroma normais é alterada no microambiente tumoral, levando a uma comunicação cruzada entre os diferentes tipos celulares que a compõe (BALKWILL, 2012). As células não tumorais, do microambiente tumoral, podem produzir diferentes tipos de substâncias como proteínas da matriz extracelular, quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e componentes inflamatórios com potencial de induzir comportamentos autócrinos e parácrinos aberrantes nas células desse estroma e consequente influência sobre as células tumorais, e vice e versa (Figura 3). Tais alterações levam a um microambiente menos estruturado e não uniforme, que influenciam características morfológicas, de crescimento e de invasividade do tumor como aumento da taxa de proliferação, angiogenese e indução da transição epitélio-mesenquimal (MAO, 2013; JUNTILA, 2013; MITAL, 2018).

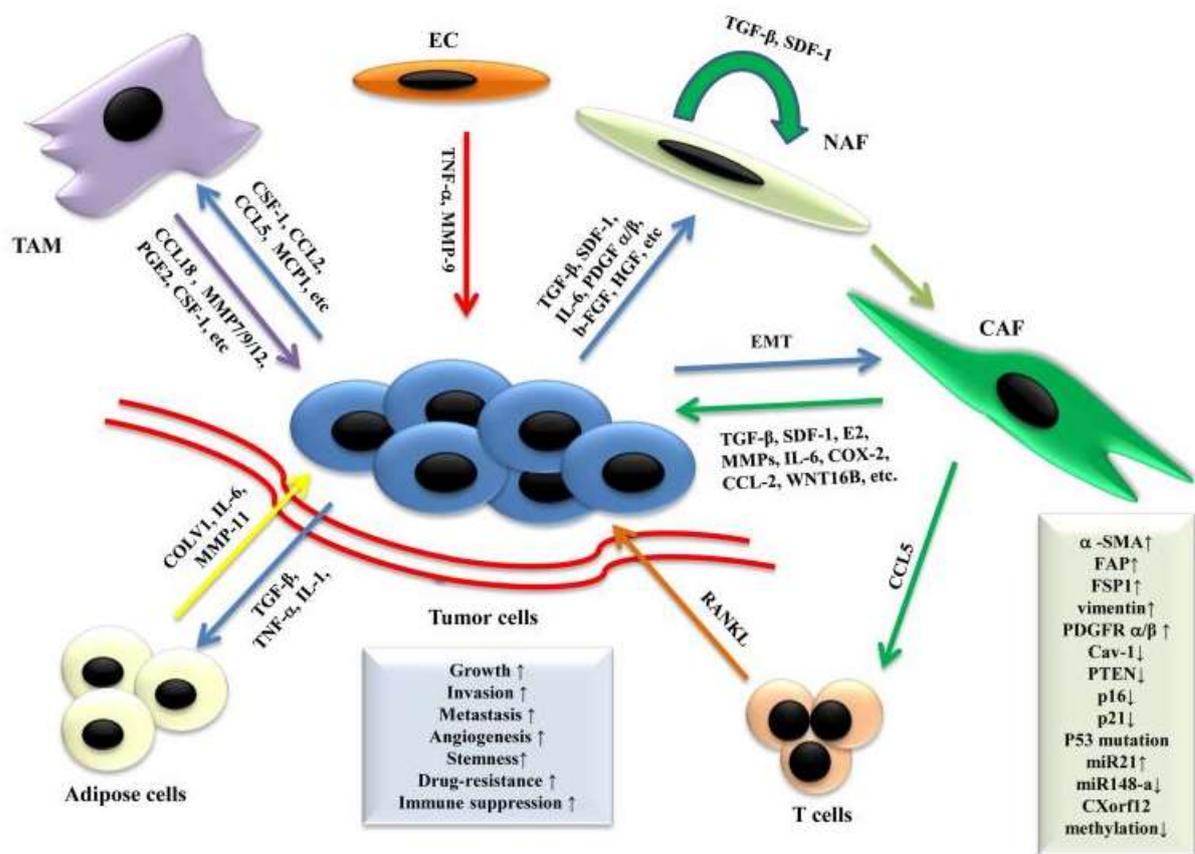


Figura 3 – Representação esquemática dos principais componentes do microambiente tumoral e seus papéis no estabelecimento e progressão do CM. Componentes do estroma tecidual, células transitórias, substâncias químicas secretadas, além do próprio tecido tumoral podem interagir mutuamente e determinar fatores tumorigênicos mais severos, como aumento da taxa de proliferação celular e formação de células metastáticas. Abreviações e termos em inglês: Adipose cells, Células adiposas; Angiogenesis, Angiogênese; CAF, Fibroblastos associados ao câncer; Cav-1, Caveolina-1; CCL2, 5, 18, Quimiocina ligante 2, 5, 18; COLVI, Colágeno VI; CSF-1, Fator-1 estimulador de colônias; Drug-resistance, Resistência a drogas; E2, Estrona -E2; FAP, Proteína de ativação de fibroblastos; FGF, Fator de crescimento de fibroblastos; FSP-1, Proteína específica de fibroblastos; Growth, Crescimento; HGF, Fator de crescimento de hepatócitos; IL-1,4,6,10,13, Interleucina -1,4,6,10,13; Imune suppression, Supressão imune; Invasion, Invasão; Metastasis, Metástases; Methylation, Metilação; MMP-7,9,11, Matriz metaloproteinase-2,9; Mutation, Mutação; NAF, Fibroblastos não associados ao câncer; NF-κB, Fator nuclear κB; PDGFR-α / β, Fator de crescimento derivado de plaquetas-α / β; RANKL, Ligante do fator nuclear κB (RANK); SDF-1, Fator derivado do estroma; Stemness, Rigidez; T cells, Células T; TAM, Macrófagos associados ao tumor; TGF-β, Fator de crescimento transformador-β; TNF-α, Fator de necrose tumoral; Tumor cells, Células tumorais; VEGF, Fator de crescimento endotelial vascular; Vimentin, Vimentina; α-SMA, Actina do músculo liso alfa. Fonte: MAO, 2013.

2.3 – Tipos de Câncer de Mama

O CM pode ser classificado utilizando características patológicas do próprio tumor e/ou clínicas, do paciente, como parâmetros histopatológicos, graus de crescimento do tumor, estágio pré-descritos da doença e por marcação por receptores moleculares. Além disso, outros parâmetros associados podem ser utilizados para determinação de um prognóstico mais preciso como presença de metástase em linfonodos relacionados ao tumor ou por fatores pré definidos como o Índice Prognóstico Nottingham (*NPI*, da sigla em inglês). O NPI é uma ferramenta prognóstica pós cirúrgica útil, cientificamente sólida e altamente reproduzível, baseada em dados como o tamanho do tumor, número de linfonodos envolvidos com o tumor e no grau do seu crescimento, com consequente estimativa da taxa de sobrevida do paciente em 5 anos após o diagnóstico. Geralmente esses critérios parametrizados são identificados e descritos em conjunto para uma melhor classificação do tipo do tumor e estabelecimento de melhor proposta terapêutica para o paciente (SANTOS, 2015; SIKANDAR, 2015).

O CM exhibe diferenças heterogênicas tanto inter quanto intratumorais, e essas características dependem de condições genéticas e não genéticas. As diferenças intratumorais refletem a coexistência de diferentes fenótipos de células de CM com características de células do tumor primário, células com alterações morfogenéticas distintas do tumor primário e células com potencial metastático (Figura 4). Já as diferenças intertumerais são definidas pelas diferenças entre os pacientes, que refletem os sistemas de estadiamento do tumor e suas classificações patológicas (HONG, 2018).

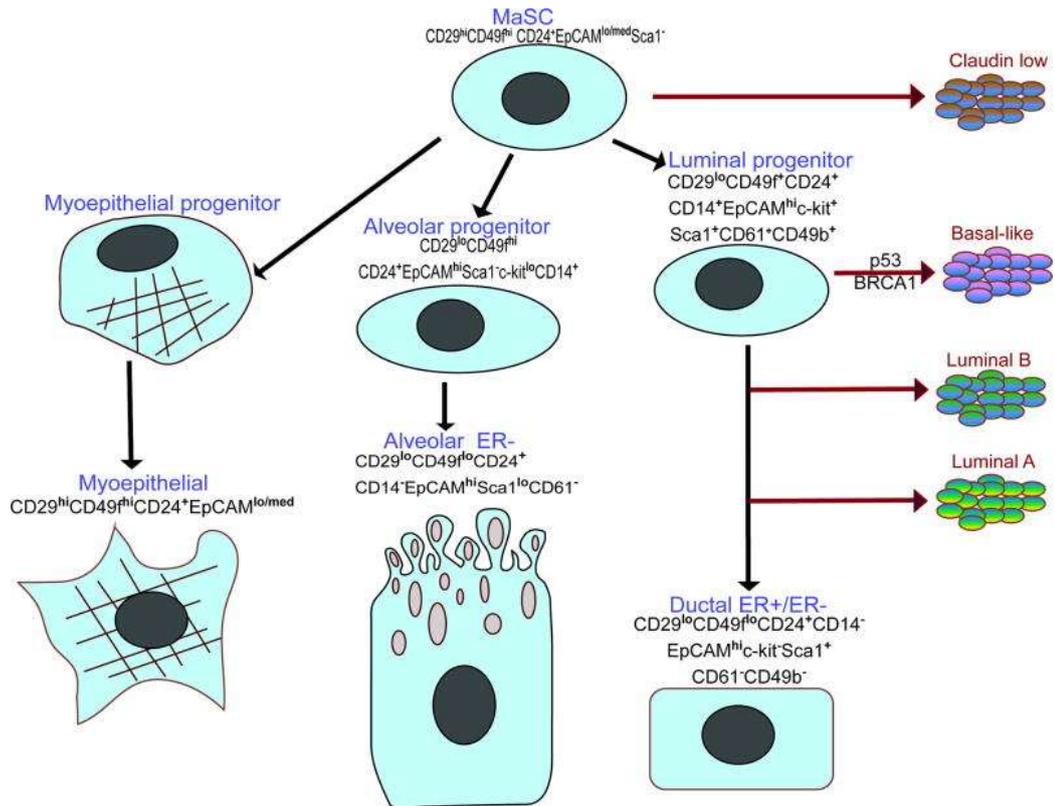


Figura 4 – Representação esquemática da hierarquia epitelial mamária e a seu potencial relacionamento com os principais subtipos de CM. Os marcadores celulares logo acima das células azuis são utilizados para a separação dos vários subtipos celulares epiteliais descritos. Os quatro tipos de tumores de CM mais frequentes estão identificados pelas setas vermelhas: Tumor do tipo baixa quantidade de Claudina (Claudin low), Tumor do tipo Basal (Basal-like), Tumor do tipo Luminal A (Luminal A), Tumor do tipo Luminal B (Luminal B). Fonte: HONG, 2018.

Do ponto de vista histopatológico, o tecido mamário pode apresentar desde um parênquima hiperplásico atípico, ou seja, com uma lesão pré-maligna, até uma massa de tumor sólido de CM, sendo descrito como invasivo e não invasivo.

Os tumores não invasivos podem ser classificados como carcinoma ductal *in situ* (com origem nos ductos mamários) e carcinoma lobular *in situ* (com origem nos lóbulos mamários). Esses dois tipos de tumores são, geralmente, os mais comuns (40 a 70% dos casos), com boa resposta aos tratamentos disponíveis e boa evolução clínica, com alta taxa de sobrevivência nos 5 anos após o diagnóstico. Apesar de não serem invasivos, a heterogeneidade do tumor pode subsidiar a presença de uma célula com perfil mais agressivo, levando ao desenvolvimento de tumores invasivos e com pior prognóstico clínico (BOMBONATI, 2011; HONG, 2018).

Já os tumores invasivos, os carcinomas lobulares infiltrativos e os carcinomas ductais infiltrativos, possuem características mais agressivas, geralmente o seu crescimento extravasa

outras regiões, além do seu ponto inicial de crescimento, possuem alta possibilidade de metastatização, principalmente para o cérebro, ossos, intestinos e pulmão, e geralmente acometem mulheres com idade mais avançada. Além desses tipos específicos, o CM triplo negativo, ou seja, que não apresenta receptor de membrana para estrógeno, progesterona nem para receptor de crescimento epidermal 2, também é um tipo de tumor bastante agressivo, muito comum em mulheres pré-menopausa e com um prognóstico ruim (AKRAM, 2017; HONG, 2018).

Outros tipos histopatológicos de CM invasivos também podem ser identificados, porém de forma mais rara. O carcinoma medular é um tipo de tumor invasivo, porém apresenta menor agressividade do que os demais (e.x., CM triplo negativo). Histologicamente, a sua capacidade invasiva ocorre apenas de forma discreta além da massa do tumor primário. O carcinoma de células mucinosas são células tumorais de CM oriundas de células formadoras de muco, é um câncer extremamente raro e com predição clínica incerta. O carcinoma tubular também é um carcinoma invasivo, mas que apresenta altas taxas de sobrevida e cura em mulheres acometidas. Já a doença de Paget é um tipo de CM inflamatório, que bloqueia o fluxo de células ou líquidos do sistema imunológico para a mama e/ou para a pele da mama), que acomete as células que compõe os mamilos e com patogênese ainda não totalmente elucidada (BOMBONATI, 2011, AKRAM, 2017; HONG, 2018).

Devido às variadas respostas clínicas dos pacientes nos diversos tipos de CM, foi necessário criar uma classificação complementar mais refinada, que conseguisse distinguir mecanismos celulares mais informativos e consequente avaliação clínica e estratégias terapêuticas mais eficientes. Baseando na presença de receptores de membrana celular para estrógeno (ER), progesterona (PR) e receptor de fator epidérmico 2 (HER2), foram definidas 6 classificações distintas para o CM, que são descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Características dos subtipos moleculares de CM.

Subtipo Molecular	Luminal A	Luminal B	Basal like	HER2 positivo	Claudin-low	Tumor tipo célula normal
Frequência	50% a 60%	10% a 20%	10% a 20%	15 a 20%	12 a 14%	5 a 10%
ER/PR/HER2	ER+PR+HER2-	ER±PR±HER2+	ER-PR-HER2-	ER-PR-HER2+	ER-PR-HER2-	ER±PR±HER2-
Proliferação	Baixa	Alta	Alta	Alta	Alta	Baixa
Grau histológico	Intermediário	Alto	Alto	Alto	Alto	Baixo
Prognóstico	Bom	Intermediário	Ruim	Ruim	Ruim	Intermediário
Mutação de P53	Baixo	Intermediário	Alto	Alto	Alto	Baixo
Metastase	Ossos	Ossos, Fígado	Intestino	Intestino	Inespecífico	Inespecífico

Fonte: HONG, 2018 – Modificada

Para avaliar o processo de tumorigênese do CM, as classificações imuno-histológicas realizadas em conjunto, determinam diversas características que possibilitam avaliação diagnóstica, terapêutica e tomada de decisão clínica mais completa. Por exemplo, os carcinomas *in situ* ductal e lobular podem evoluir para um carcinoma invasivo. Porém, do ponto de vista molecular, apresentam-se positivos para receptor de ER e PR, negativos para receptor de HER2, baixa atividade mitótica e boa estabilidade gênica. Já o carcinoma ductal invasivo apresenta-se negativo para os receptores de ER e PR, positivo para o receptor de HER2, alta atipia nuclear e grande instabilidade gênica. Mesmo com a grande quantidade de tipos de CM, essas classificações podem ajudar a entender os diferentes fenótipos das células tumorais e consequentemente ajudar a conduzir o tratamento desses pacientes (SIMS, 2007; PRAT, 2011).

Contudo, os reais mecanismos que induzem a diferenciação de uma célula normal em um tumor primário e consequentemente de um tumor primário a um tumor metastático, mesmo no CM, ainda não estão bem claros. A chave para a classificação dos diversos tipos de CM e as melhores condutas clínicas para cada tipo pode estar na compreensão dos mecanismos de transformação tumorigênica que essas células sofrem. Por isso, estudos mais aprofundados sobre o assunto são de extrema importância não só relacionada à biologia do CM, mas para o desenvolvimento de estratégias clínicas mais robustas e eficientes.

2.4 – Formas de se estudar o CM

Para o estudo de processos carcinogênicos e tumorigênicos do CM, são utilizados fragmentos dos tumores primários ou de tumores metastáticos de pacientes, realizados após intervenção cirúrgica, ou através de linhagens imortalizadas de células em cultura. Todas as duas fontes de amostras são bem estabelecidas pela literatura, apresentando vantagens, mas também algumas desvantagens.

O tumor primário, oriundo de secções cirúrgicas, mantêm distintos clones de células tumorais no seu interior com diferentes perfis genéticos e epigenéticos, além de distintas mutações somáticas (GERLINGER, 2012). E essa diferença não se limita apenas em células tumorais, mas também aos outros tipos celulares que participam da arquitetura tecidual do tumor, como células do sistema imune, células do estroma tecidual e células epiteliais não tumorais (JUNTTILA, 2013). Costa e colaboradores (2015) discriminaram diferenças na expressão de proteínas no CM, demonstrando grandes alterações do perfil de 10 proteínas (CASPE, ENOG, TPM1, CAPG, VIME, TPM3, TRFE, PDIA6, WDR61 e PDIA3), além de alterações em vários processos biológicos entre tecidos não tumorais e de tumor primário de CM, retirados durante o tratamento cirúrgico. Tais estudos são de grande valia para se investigar vários fatores relacionados ao prognóstico e tratamento do CM, mas impedem a avaliação do processo tumorigênico de células em diferentes estágios tumorais.

Para tanto, seria necessário o estudo de vários tipos celulares avaliados isoladamente, o que é característico de pesquisas realizadas *in vitro*. Com elas, os estudos têm uma fonte ilimitada de material auto replicável e homogêneo, sem contaminantes teciduais como células do estroma ou outros tipos celulares, o que facilita o estudo personalizado de cada fenótipo em específico. Obviamente o estudo *in vitro* também apresenta limitações como, por exemplo, a ausência de células não-tumorais que formam o microambiente tumoral e que são importantes no processo de tumorigênese.

Várias linhagens celulares não tumorais e tumorais de CM, como MCF-7, MCF-10A, MDA-MB-231, SK-BR-3, entre outras, estão disponíveis comercialmente para estudos *in vitro* e são amplamente utilizadas neste sentido. Contudo, boa parte das células tumorais imortalizadas tem sua origem em tumores metastáticos, coletados em sítios anatômicos distintos e com possível acúmulo de alterações gênicas importantes, devido a algum tipo de tratamento utilizado pelo indivíduo, como o uso de quimioterapia e/ou radioterapia. Com isso, não é possível estudar os diferentes estágios fenotípicos da tumorigênese com tais células disponíveis no mercado, deixando uma lacuna muito grande na compreensão de quais fenômenos acontecem durante o desenvolvimento dos diversos perfis celulares presentes no tumor primário e metastático. Afim de suprimir essa lacuna, no presente estudo foram utilizadas, além das linhagens comerciais MCF-10A (linhagem celular de epitélio mamário com fenótipo não tumoral) e MDA-231-MD (linhagem celular de epitélio mamário com fenótipo tumoral metastático), duas linhagens celulares de CM, MGSO-3 e MACL-1, isoladas de

tumores primários e estabelecidas pelo grupo de pesquisa do Prof. Alfredo de Miranda Góes, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, que gentilmente nos cedeu estas linhagens para o presente estudo.

A linhagem tumoral de CM MGSO-3 tem como origem um carcinoma ductal *in situ*, que apresentava um perfil do subtipo HER2 (marcação positiva para o receptor do tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano - HER2 positivo - e marcação negativa para receptores de estrógeno e progesterona - ER/PR negativos). Já a linhagem tumoral MACL-1 foi isolada de um carcinoma do subtipo luminal A (HER2 negativo e ER/PR positivo) (CORRÊA,2013).

No estabelecimento das linhagens tumorais, essas marcações foram perdidas, o que é considerado comum no estabelecimento de linhagens celulares *in vitro*, já que as células se adaptam a um novo perfil de expressão gênica de acordo com o ambiente em que elas estão inseridas (BROZOVA, 2007). No entanto, a marcação histológica para Ki-76, um importante marcador de proliferação celular usado como marcador de prognóstico no CM, se manteve positivo nas linhagens tumorais estabelecidas (CORRÊA,2013).

Outras características de célula tumoral foram encontradas nas linhagens MGSO-3 e MACL-1, como atividade de fosfatase alcalina aumentada, aumento da produção de RNAm da transcriptase reversa da telomerase (hTERT) em comparação a uma célula não tumoral (fibroblasto), e aumento da expressão de RNAm para Mucina 1 associada à membrana celular (MUC-1) em comparação a linhagem tumoral metastática MDA-MB-231 (CORRÊA, 2009).

Tabela 2 – Origem das células tumorais de CM

Linhagem celular	Organismo	Tecido	Tipo Celular	Tumorigênica	Origem
MCF-10A	Homo sapiens	Glândula mamária	Epitelial	Não	Doença Fibrocítica
MGSO-3	Homo sapiens	Glândula mamária	Epitelial	Sim	Derivado de tumor primário
MACL-1	Homo sapiens	Glândula mamária	Epitelial	Sim	Derivado de tumor primário
MDA-231-MD	Homo sapiens	Glândula mamária	Epitelial	Sim	Derivado de sítio metastático (Líquido Pleural)

Fonte: Próprio autor.

Através do estudo das quatro linhagens descritas na tabela 2, é possível construir um fluxo tumorigênico, desde a célula com fenótipo normal (MCF-10A), passando por linhagens celulares com fenótipo de tumor primário (MGSO-3 E MACL-1), até uma linhagem com fenótipo metastático (MDA-231-MD) e assim, procurar entender melhor quais alterações são importantes para esse processo.

As principais ferramentas de estudo utilizadas atualmente, para o CM, estão embasadas na análise genômicas e na quantificação de RNAs, por técnicas de biologia molecular. As avaliações moleculares são metodologias muito importantes para a classificação e prognóstico do câncer, principalmente na classificação dos subtipos de CM. Entretanto, os genes e RNAs não nos evidenciam nenhuma capacidade catalítica ou de sinalização relacionados, dependendo da expressão gênica para tal determinação.

Dentro dos avanços relacionados à epidemiologia molecular do câncer, algumas características fenotípicas não elucidavam claramente as características encontradas no DNA e RNA das células tumorais. Tal contraponto direcionou à um novo paradigma para a compreensão do processo de carcinogênese e de tumorigênese: “quais aspectos de susceptibilidade genética dão suporte a fatores ambientais de risco no desenvolvimento do câncer?”. Esse novo paradigma surgiu a partir de questionamentos sobre as condições ambientais e a real condição genética para maior susceptibilidade de desenvolvimento do câncer.

Um grande exemplo correlaciona-se ao consumo de álcool. Vários estudos demonstram a correlação entre o consumo de álcool e o desenvolvimento de vários tipos de câncer, sem exemplificar a condição biológica relacionada ao fato. Porém, alterações funcionais encontradas na enzima ALDH2, responsável pela oxidação do acetaldeído, produto de oxidação do etanol, e muito frequente em famílias de origem japonesa, estão diretamente relacionadas ao aumento dos índices de câncer de esôfago nessa população (ITO, 2016).

O tabagismo, apesar de apresentar alguma correlação com o surgimento do CM, ainda apresenta conexões biológicas inconsistentes. Mas, em pacientes com alterações na produção da enzima N-acetiltransferase 2, responsável pela desintoxicação de elementos carcinogênicos do cigarro, há uma forte susceptibilidade para o surgimento de CM (BONDURANT, 2011).

A chave para alterações biológicas relacionados à *splicing* alternativos de RNA para a produção de diferentes proteínas, alterações de produção ou função de proteínas, vias de sinalização proteica ou modificações pós-traducionais são fundamentais para a compreensão da biogênese do CM (ZEIDAN, 2015).

Para tanto, a avaliação do perfil de proteínas presentes nas células tumorais de CM pode refletir melhor o estado funcional das células, já que essas moléculas são as principais efetoras de ações celulares (COSTA, 2015). Em complementação às técnicas genômicas, a proteômica,

que se refere ao estudo em larga escala de proteínas, abrangendo aspectos como sua identificação, ontologia, interação proteína-proteína, envolvimento de vias de sinalização, quantificação e análise funcional, pode elucidar de forma mais clara processos aberrantes nos vários subtipos de CM e, potencialmente, identificar novas proteínas ou perfis protéicos que refinem a sua classificação (Figura 5). Além disso, a técnica pode ser utilizada para identificação de biomarcadores que podem auxiliar no prognóstico da doença, além de indicar o potencial surgimento de metástase e uma possível resistência a terapias para cada subtipo específico de CM (LAM, 2014).

Especificamente para o CM, a utilização da proteômica concentra-se na descoberta de novos marcadores mais precisos e na compreensão das vias de sinalização que direcionam a iniciação e progressão do tumor (ZEIDAN, 2015). Portanto, a proteômica, como ferramenta de pesquisa na biologia do CM, é uma valiosa ferramenta para auxiliar na elucidação de processos carcinogênicos e tumorigênicos, além de subsidiar ações terapêuticas e prognósticas mais precisas.

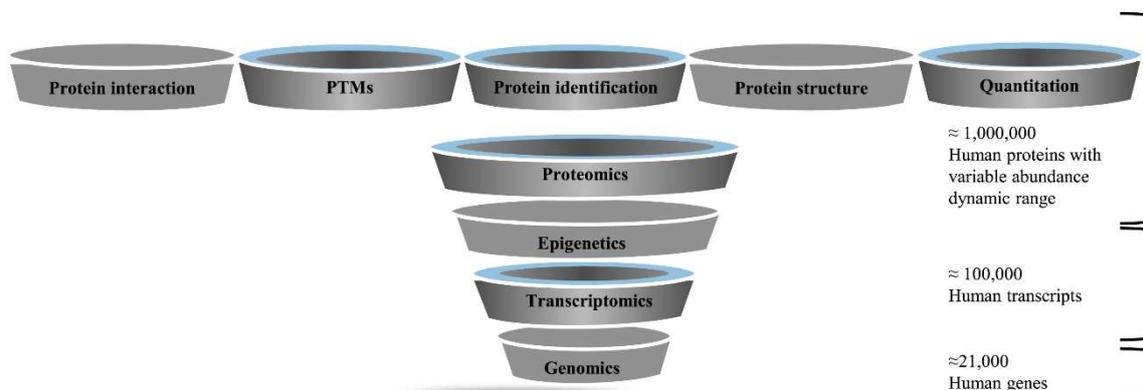


Figura 5 - Representação esquemática da complexidade e de moléculas/eventos de interesse durante a transição da genômica e transcriptômica para estudos baseados em proteômica. PTMs: modificações pós-traducionais, sigla em inglês. Fonte: ZEIDAN, 2015.

2.5 – Proteômica

O termo proteoma surgiu em meados da década de 1990, proposto Marc Wilkins (WILKINS, 1996), e é utilizado para caracterizar um conjunto de proteínas encontradas em células vivas, tecidos ou organismos, em um determinado momento, representando o resultado da transcrição e tradução gênica somados às alterações estruturais e/ou funcionais após

modificações pós-traducionais (TSIATSIANI, 2015). A proteômica é uma área da ciência que possibilita o estudo de estruturas e funções de proteínas e suas interações com o auxílio de métodos analíticos físico-químicos de alta resolução, como a cromatografia líquida (LC) e a espectrometria de massa (MS). Com a utilização dessas técnicas, é possível avaliar diferentes dinâmicas da ação de proteínas entre diferentes amostras biológicas e, a partir disso, compreender sistemas mais complexos (PAVIA, 2010; RAUNNIYAR, 2014).

Mesmo após o sequenciamento do genoma humano (VENTER, 2001), a compreensão dos processos biológicos não foi totalmente elucidada porque uma parte importante não depende do contexto genético (CALDERON-CELIS, 2017). Apesar da produção de proteínas estarem diretamente ligadas à transcrição e tradução de genes, essa relação não se estabelece de forma linear, já que o genoma humano possui aproximadamente 20 mil genes e a quantidade de proteínas humanas é calculada em aproximadamente 1 milhão de proteoformas (MUNHÖZ, 2014). Nesse contexto, a proteômica complementa a compreensão da biologia de organismos complexos, permitindo a identificação de proteínas e seus mecanismos de regulação, modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína, e quantificação da abundância dos níveis proteicos em condições normais e patológicas (CIFANI, 2016; CALDERON-CELLIS, 2017).

A complexidade do proteoma traz grandes desafios para a sua caracterização em determinadas células, tecidos e organismos. No plasma humano, por exemplo, a faixa de concentração de proteínas pode variar mais de 10 ordens de magnitude, como a albumina em relação às citocinas, conforme exemplificado na Figura 06 (GEVER, 2017). Muitos marcadores de doenças, inclusive, podem ser detectados em concentrações na faixa de ng/mL a pg/mL, podendo ser tão baixas quanto uma molécula/mL, quantidade que é muito baixa para diagnóstico precoce de uma doença, por exemplo (LANDEGREN, 2012).

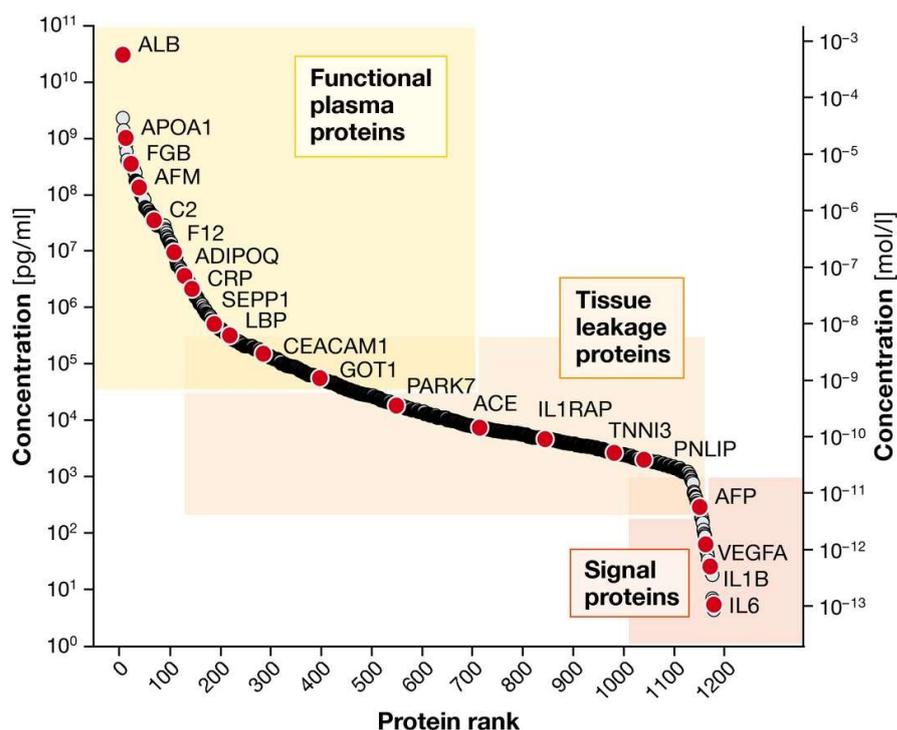


Figura 6 – Concentração de algumas proteínas encontradas no plasma humano. As proteínas estão identificadas pelos respectivos genes. Fonte: Geyer, 2017.

Para a avaliação dessa dinâmica complexa, os estudos de sequenciamento genômico, análises de bioinformática e espectrometria de massa (do inglês, MS) vêm evoluindo exponencialmente, principalmente na última década (CALDERON-CELIS, 2017; VALIKANGAS, 2018). Inicialmente, os métodos de separação e identificação, como a eletroforese bidimensional e a MS de ionização em dessorção a laser assistida por matriz (do inglês, MALDI) possibilitaram a detecção de proteínas de modo diferencial (LATTERICH, 2008; HAWKRIDGE, 2014). Já a técnica de LC-MS, baseada no acoplamento de cromatografia líquida de alta pressão (do inglês, HPLC) com a MS de ionização por eletrospray (do inglês, ESI) possibilitou a análise de proteomas mais complexos (HAWKRIDGE, 2014; CALDERON-CELIS, 2017), sendo atualmente o método mais empregado na proteômica.

O desenvolvimento de metodologias mais eficazes nas separações cromatográficas, na resolução de massa, na sensibilidade e na velocidade de aquisição espectral permitiram o surgimento de metodologias mais simples e robustas, como a proteômica “shotgun”, na qual os protocolos baseiam-se na obtenção da amostra, digestão proteolítica e análise por LC-MS do material obtido. Com o surgimento do analisador de massa Orbitrap, que é do tipo armadilha de íons, e a sua capacidade de aquisição espectral em alta resolução, a proteômica shotgun

alcançou novos patamares (HU, 2005), o que possibilita, atualmente, a identificação de milhares de proteínas a partir de amostras complexas em uma única análise LC-MS.

Suportados por essa evolução analítica, a proteômica quantitativa aplicada a sistemas biológicos também cresceu rapidamente. Através da sua análise, circuitos intracelulares próprios, em diferentes fases do desenvolvimento celular e em diferentes perfis temporais de sinalizações celulares em resposta a estímulos internos e externos puderam ser estudados de forma mais ampla e completa (IVAKHNO, 2006; RAUNIYAR, 2014; VALIKANGAS, 2018).

Os métodos para quantificação de proteínas por LC-MS podem ser divididos em estratégias de marcação com isótopos estáveis ou sem marcação. Além disso, a marcação com isótopos estáveis podem ser realizadas de duas formas: a marcação metabólica, quando a marcação ocorre através do metabolismo celular, por exemplo utilizando aminoácidos essenciais, como a lisina, marcados com tais isótopos no meio de cultura celular, como no caso da técnica de SILAC (do inglês, *Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture*); ou a marcação química, quando os isótopos são acrescentados após a digestão das proteínas extraídas de algum tecido ou célula, como no caso da marcação com TMT 10 plex, que utiliza marcadores isotópicos para marcação de peptídeos via aminas primárias (LI, 2017; RAUNIYAR, 2014)

A sigla TMT significa marcadores de massa em tandem (*Tandem Mass Tags*, da sigla em inglês). São marcadores químicos isotópicos que são conjugados quimicamente com as aminas primárias dos peptídeos produzidos após digestão enzimática na preparação para proteômica. Com essa marcação, é possível a junção de várias amostras em um mesmo frasco que pode ser analisado no equipamento de uma única vez, otimizando o processamento.

A análise simultânea de vários grupos experimentais utilizando o TMT é possível porque os marcadores isotópicos apresentam íons repórter específicos, que são liberados após a fragmentação destes grupos durante a espectrometria em tandem MS/MS, possibilitando, assim, a identificação de qual grupo experimental pertenciam um determinado íon repórter. Cada *tag* possui um grupo repórter, um grupo de equilíbrio de massa (para que todas as *tags* apresentem a mesma massa molecular) e um grupo reativo para se ligar às aminas primárias dos peptídeos. Após a marcação com o TMT, a massa molecular de um mesmo peptídeo, mas oriundo de grupos experimentais distintos, será a mesma, mesmo sendo marcado com *tags* apresentando íons repórter com massas moleculares distintas, pois o grupo de equilíbrio

compensa tais diferenças de massa. As informações quantitativas são geradas na varredura MS/MS, quando os peptídeos e as tags são fragmentadas, por exemplo utilizando a dissociação por colisão de alta energia (sigla em inglês, HCD), no qual o grupo repórter é liberado.

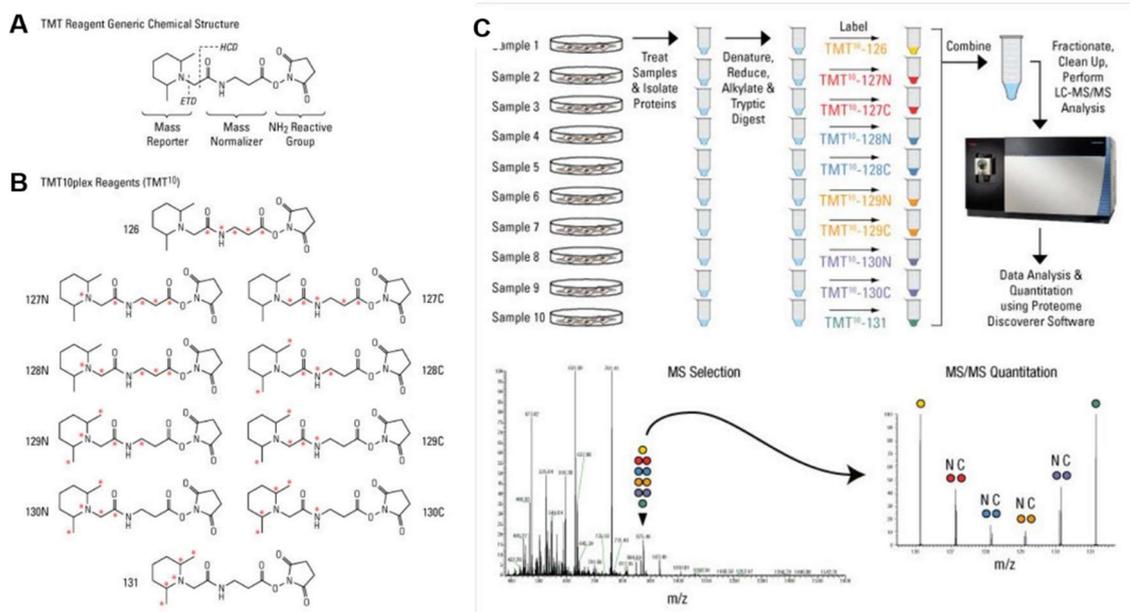


Figura 7. TMT10plex. (A) Grupos que compõe um *tag*, incluindo o local de fragmentação baseado no tipo utilizado (e.x., ETD ou HCD). (B) Estrutura de cada um dos 10 *tags* disponíveis. (C) Típico fluxograma de uso do TMT, incluindo um exemplo de espectro do tipo MS, no qual os peptídeos marcados pelas 10 *tags* apresentaram a mesma relação *m/z* e o espectro MSMS, destacando os íons repórter usados para a quantificação relativa. Fonte: thermofischer.com.

A evolução da proteômica, assim como a de outras ciências ômica, foi fundamental para compreensão global de sistemas complexos e o entendimento a respeito, não só, do efeito de uma proteína em uma via de sinalização, mas do seu papel dentro de um complexo de vias extenso, chamado de sistema biológicos, que pode, ou não, determinar uma mudança chave na atividade funcional celular (GOLDSTEIN, 2019; SHI, 2019).

O conhecimento sobre a estrutura de uma proteína é fundamental para a compreensão da sua função ou disfunção. Apesar da evolução das técnicas de biologia estrutural de alta resolução como a cristalografia, o raio X e a espectrometria de ressonância nuclear magnética demonstrarem boa aplicabilidade nessa investigação, a flexibilidade da análise proteômica possui superioridade analítica, já que o tamanho da proteína alvo de estudo e a complexidade do pool de proteínas em uma dada amostra não se caracteriza um obstáculo no processo de avaliação, o que é realidade para as outras metodologias (KAUR, 2019).

A análise de complexos proteômicos, ou a prototipagem, também possibilitou a estratificação de células ou organismos que, mesmo pertencentes a um grupo específico, apresentavam características destoantes dos seus pares e geravam interpretações inadequadas sobre sua condição biológica. Isso aconteceu na caracterização, por exemplo, de bactérias da mesma cepa com susceptibilidade diferente a um mesmo antibiótico ou na identificação de células tumorais que, mesmo apresentando marcadores relacionados a um bom prognóstico, evoluíam para quadros metastáticos muito agressivos. Essa prototipagem ou caracterização do específica do proteoma de organismo tornou mais robusta a compreensão de sistemas complexos e a diferenciação entre indivíduos que até então eram considerados semelhantes (BOJA, 2011; KARISSON, 2015).

Todas essas características relacionadas à técnica e análise proteômica possibilitaram avanços em diversas áreas biomédicas como a detecção de vários marcadores biológicos, identificação de proteínas candidatas à produção de vacinas, compreensão de mecanismos de patogenicidade, alterações do padrão de expressão celular em resposta a diferentes sinais e estabelecimento e interpretações de vias de proteínas funcionais em diferentes patologias (ASLAN, 2017; LI, 2017), incluindo o câncer

2.6 – Proteômica e o CM

A complexidade e heterogeneidade do CM demonstra que a doença se desenvolve por múltiplas vias que nada mais são do que o resultado de uma combinação da tumorigênese, reincidência tumoral e surgimento de metástase, envolvendo uma rede complexa de proteínas associadas à diversos eventos moleculares. Essa transformação celular resulta em células tumorais com alterações na expressão de proteínas, modificações pós-traducionais e degradação de moléculas, que podem influenciam em toda maquinaria dessas células. Por esse motivo, fica claro que a análise de proteínas é uma boa ferramenta de identificação das modificações e interações responsáveis pela transformação tumoral (FERLAY, 2015).

A avaliação do perfil de proteínas dos diversos tipos de CM, através de técnicas proteômicas, têm elucidado diversos aspectos da biogênese desse tumor, permitindo o monitoramento de alterações estruturais e comportamentais das células tumorais, além de

avaliar possíveis marcadores, não só no próprio tecido tumoral mas também no sangue e outros fluidos corporais.

Quando avalia-se a heterogeneidade das subpopulações de células tumorais em um tumor primário, apesar de apresentarem alguns marcadores comuns, como os já descritos anteriormente, podem possuir diferentes sinalizações intracelulares que irão diferenciá-las em várias características tumorais como proliferação e diferenciação, por exemplo. Tais características também são relacionadas à resposta celular ao tratamento escolhido. Como exemplo, tumores sólidos com marcação positiva para HER2 positivo, porém com alterações na porção extracelular do receptor, podem produzir células tumorais hiperativas e resistentes ao tratamento com trastuzumab (LIPTON, 2013). Além disso, Pains e colaboradores (2015) reportaram um caso clínico em que pacientes com CM HER2 negativo apresentaram tumores com comportamento semelhante a uma paciente com marcação positiva para o receptor. Após análise proteômica do plasma desses pacientes, foi possível evidenciar altas concentrações plasmáticas de calpain-10, uma enzima capaz de clivar a parte extracelular do receptor HER2. Ou seja, imunohistoquimicamente e geneticamente os pacientes apresentavam padrão HER2 negativo, mas um fenótipo característico para HER2 positivo, pois as via sinalização desse receptor eram preservadas.

Brunoro e colaboradores (2019) utilizaram fluido aspirado do mamilo para investigar possíveis alterações do líquido que banhava o tumor, no interior da mama, e conseqüentemente correlacioná-lo com o prognóstico do CM. De um total de mais de 1200 proteínas identificadas, foram determinadas alterações em proteínas envolvidas na via glicolítica, na via do fator de crescimento dependente de insulina e na via de degranulação plaquetária, ambas associadas a microambientes tumorais com maior potencial proliferativo.

Já Gomig e colaboradores (2019) demonstraram alterações no perfil proteômico de pacientes com carcinoma ductal invasivo em diferentes sítios tumorais e peri-tumorais. Foi reportada uma significativa desregulação de proteínas no próprio tumor primário, com alterações semelhantes em comparação à análise de linfonodos axilares com presença de metástases, em vias como a do estresse oxidativo, metabolismo energético e de produção de óxido nítrico. Já tecidos não tumorais adjacentes ao tumor e tecidos contra-laterais (da outra mama, sem a presença de tumor) apresentaram grande semelhança entre si e nenhuma semelhança quando comparados ao perfil proteômico do tecido tumoral. Com isso, os autores

contribuíram para o entendimento não só da importância da avaliação do tumor *in situ*, mas também para a importância do microambiente tumoral e o tecido estromal que o circunda.

Zografos e colaboradores (2019) determinaram a expressão de assinaturas protéicas no soro de pacientes masculinos com CM. Tais assinaturas apresentavam alterações de proteínas relacionadas ao ciclo celular, função mitocondrial, metabolismo lipídico e transporte celular, demonstrando que não necessariamente apenas o tumor deve ser investigado, mas seleções de outras matrizes biológicas do paciente também podem ser usadas, principalmente através de técnicas proteômicas.

Além de contribuírem para a compreensão do surgimento do CM, técnicas proteômicas podem elucidar alterações não encontradas em análises moleculares. Estudo realizado por Tyanona e colaboradores (2015) mapearam 19 assinaturas proteicas, em 1992 pacientes com CM, e correlacionaram a sua presença com a variação do número de cópias (CNVs, da sigla em inglês) encontradas no genoma e a variação da expressão de RNAm. Das 19 assinaturas encontradas, ou seja, proteínas que apresentavam nível de regulação relevante nos tecidos estudados, setes não apresentavam alterações nem nas CNVs e nem na expressão de RNAm, sendo possível identificá-las apenas pelo uso da proteômica.

Com isso, acreditamos que análises proteômicas das linhagens celulares usadas no presente estudo seriam de grande valia para demonstrar as alterações fenotípicas dos vários estágios do CM, o que poderia trazer luz à aspectos relacionados ao processo tumorigênico do CM.

3 – JUSTIFICATIVA

O CM é uma das principais causas de mortes em mulheres em todo mundo (RIVERA-FRANCO, 2018). Novos métodos de investigação e rastreamento clínicos contribuíram, nos últimos anos, para um declínio nas taxas de mortalidade da doença (DEPPEN, 2012, CEDOLIN 2014). Além disso, a investigação e aplicação de novas terapias têm auxiliado para esse declínio, principalmente em mulheres entre a faixa de 50 anos, idade mais acometida pelo CM (BOSSETI, 2012).

No entanto, ainda não compreendemos plenamente a biologia do CM, incluindo as características fenotípicas que possibilitam que a célula tumoral desenvolva a capacidade de proliferação e migração. Características genéticas, estilo de vida e fatores ambientais são determinantes para o desenvolvimento e prognóstico do CM (MAHONEY, 2008; KLEIBL 2016).

Mesmo com o mapeamento molecular, já empregado na clínica para determinar o diagnóstico e prognóstico do CM, o ganho real na taxa de sobrevida dos pacientes acometidos não foi expressivo. A abordagem genômica e transcriptômica possui limitações, já que se pode elucidar apenas as alterações ao nível gênico ou de RNAm e não alterações proteicas, que são os efetores finais da homeostase celular (CHAE, 2014). Além disso, a pesquisa de alterações funcionais em diferentes linhagens não tumorais, de tumores primários e tumores metastáticos é pouco explorada, o que impossibilita uma avaliação mais completa do processo de tumorigênese do CM.

A avaliação proteômica das diferentes linhagens utilizadas nesse estudo possibilitou uma avaliação ampla do perfil de proteínas presentes em cada tipo celular. Suas semelhanças e diferenças biológicas na identificação da sua ontologia, classificação, regulação das proteínas e redes de interação, o que contribuiu para uma melhor compreensão do processo tumorigênico do CM e, conseqüentemente, abrindo novas linhas de estudo que possibilitem uma melhor classificação dos subtipos de CM, prognóstico e tratamento alternativos mais adequados.

4 – OBJETIVOS

Determinar e comparar o proteoma de linhagens celulares, *in vitro*, não tumorais, de tumores primários e de tumor metastático, visando identificar diferenças de perfis proteômicos entre células no diferentes estágios tumorigênico no CM.

4.1 – Objetivos específicos

- Comparar as proteínas diferencialmente reguladas entre as diferentes linhagens celulares (MCF-10A, MGSO-3, MACL-1 e MDA-231-MD) por proteômica quantitativa.
- Identificar vias metabólicas, de sinalização e redes de interação associadas às proteínas encontradas diferencialmente reguladas.
- Confirmar proteínas chaves encontradas neste estudo por técnicas complementares (western blot).

5 – METODOLOGIA

5.1 Cultura Celular

As linhagens de células não tumorais (MCF-10A), de tumor primário (MGSO-3 e MACL-1) e tumor metastático (MDA-231-MD) foram cultivadas em meio *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM-Sigma Chemical Co.) suplementado com bicarbonato de sódio 1,2 g/L, 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 1% de solução de 5 mg/mL de sulfato de penicilina/estreptomicina em salina 0,9%. As culturas foram mantidas em garrafas tratadas para otimizar a adesão celular, a 37 °C em estufa umidificada com atmosfera de 5% CO₂. Para cada tipo celular, manteve-se 3 garrafas de cultura de 75 cm² de área de superfície.

As células foram repicadas até a 14^a/15^a passagem. Após atingirem uma monocamada celular com confluência superior a 90%, as células foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato (PBS) sem adição de cálcio e magnésio, pH 7,4, posteriormente lavadas com solução salina estéril por mais 3 vezes. Logo após a retirada da solução salina, foi acrescentado 1 mL de inibidor de protease (complemente mini EDTA-free, Roche) em cada garrafa para realização da raspagem das células com scraper estéril e individual para cada tipo celular.

As células foram coletadas em tubos do tipo “eppendorf” de 1,5 mL, centrifugadas a 3000 g por minuto por 5 minutos, retirado o sobrenadante e mantidas a -80 °C até o momento da análise. Para cada linhagem celular, foram utilizadas 4 garrafas de cultura celular T25 (área de superfície de 25 cm²) formando um grupo com tamanho amostral igual a quatro (n = 4) por cada tipo celular (Figura 8).

5.2 – Extração das proteínas celulares para proteômica.

Para a extração das proteínas das células, utilizando protocolo padronizado por nosso grupo (RODRIGUES-RIBEIRO, 2019), foi adicionado em cada amostra 50 µL de tampão de lise (ureia 6M, tiourea 2M, cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 10mM, cloroacetamida 40 mM, bicarbonato de trietilamônio (TEAB) 20 mM). Em seguida, as amostras foram sonicadas por duas vezes durante 15 segundos em banho de gelo e incubadas por 2h a temperatura ambiente. Após essa etapa, foi realizada a quantificação das proteínas por método fluorescente (Qubit, Thermo). A seguir, as amostras foram diluídas 10 vezes em TEAB, visando reduzir a concentração de ureia e tiourea para 0,6M e 0,2M, respectivamente. Posteriormente,

foi adicionada a enzima Lys-C (Wako) 1:50 (enzima/proteína) por 2 horas e, logo após, foi adicionada a enzima Tripsina (Promega) na proporção 1:50 (enzima/proteína). A reação enzimática foi realizada em temperatura ambiente. Após 16 horas, a reação enzimática foi interrompida pela adição de TFA (concentração final de 1%) e as amostras foram dessalinizadas por micropurificação usando a resina C18 ZipTip® Pipette Tips (Merck-Millipores®) e seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Para cada uma das amostras preparadas, foi separado 25 µg de peptídeos para a análise proteômica.

5.3 – Preparação do “POOL” de referência

O presente trabalho se propôs a identificar as diferenças do perfil proteômico nas diferentes linhagens de células epiteliais, desde o fenótipo normal, passando pelo tumoral com características primárias e pelo tumoral com características metastáticas. Por isso, foi necessário estabelecer as diferenças entre esses três perfis de fenótipos distintos. Foram utilizadas quatro linhagens distintas: MCF-10A, que possui fenótipo de célula epitelial mamária normal; MGSO-3 e MACL-1, linhagens celulares que possuem fenótipo de células de origem epitelial oriundas de tumor primário; e MDA-231-MD, linhagem celular que possui fenótipo de célula de origem epitelial oriundas de tumor metastático. Para estabelecer a comparação proteômica que propusemos, foi necessário criar um grupo de referência representado por um “POOL” contendo quantidades iguais de peptídeos extraídos de todas as células (MCF-10A, MGSO-3, MACL-1 e MDA-231-MD), para ser usado como um grupo “normalizador” dos outros *datasets*. Como o tamanho amostral do nosso estudo foi $n = 4$, foram criados quatro “POOLS”, de acordo com a tabela 3 e figura 8

Tabela 3 – Origem e composição dos POOLs gerados para ser um *dataset* de referência.

POOL	Tipo de composição	Quantidade final de peptídeos no POOL
POO 1	25% de peptídeos MCF-10A, N1;	25 µg (Formado por quantidades iguais de peptídeos oriundos de cada imagem)
	25% de peptídeos MGSO-3, N1;	
	25% de peptídeos MACL-1, N1;	
	25% de peptídeos MDA-231-MD, N1;	
POO 2	25% de peptídeos MCF-10A, N2;	25 µg (Formado por quantidades iguais de peptídeos oriundos de cada imagem)
	25% de peptídeos MGSO-3, N2;	
	25% de peptídeos MACL-1, N2;	
	25% de peptídeos MDA-231-MD, N2;	
POO 3	25% de peptídeos MCF-10A, N3;	25 µg (Formado por quantidades iguais de peptídeos oriundos de cada imagem)
	25% de peptídeos MGSO-3, N3;	
	25% de peptídeos MACL-1, N3;	
	25% de peptídeos MDA-231-MD, N3;	
POO 4	25% de peptídeos MCF-10A, N4;	25 µg (Formado por quantidades iguais de peptídeos oriundos de cada imagem)
	25% de peptídeos MGSO-3, N4;	
	25% de peptídeos MACL-1, N4;	
	25% de peptídeos MDA-231-MD, N4;	

N =

Amostra do grupo experimental. Fonte: Próprio autor

5.4 – Marcação das proteínas pelo kit *TMT10plexTM Isobaric Label Reagent Set*

No kit utilizado nesse experimento, trabalhamos com 10 tags que possuem diferença de massa de 6 mDa entre as tags isotópicas com marcadores reportes com massa ^{15}N e ^{13}C , espaçados por 1 Da. Utilizamos as 10 tags do kit para marcar todos os grupos experimentais e replicatas deste trabalho (Figura 8). As amostras foram marcadas seguindo o protocolo do fabricante. Após serão combinadas conforme a figura 8, as amostras foram evaporadas em centrífuga a vácuo do tipo *speedvac*, e armazenadas a -20°C .

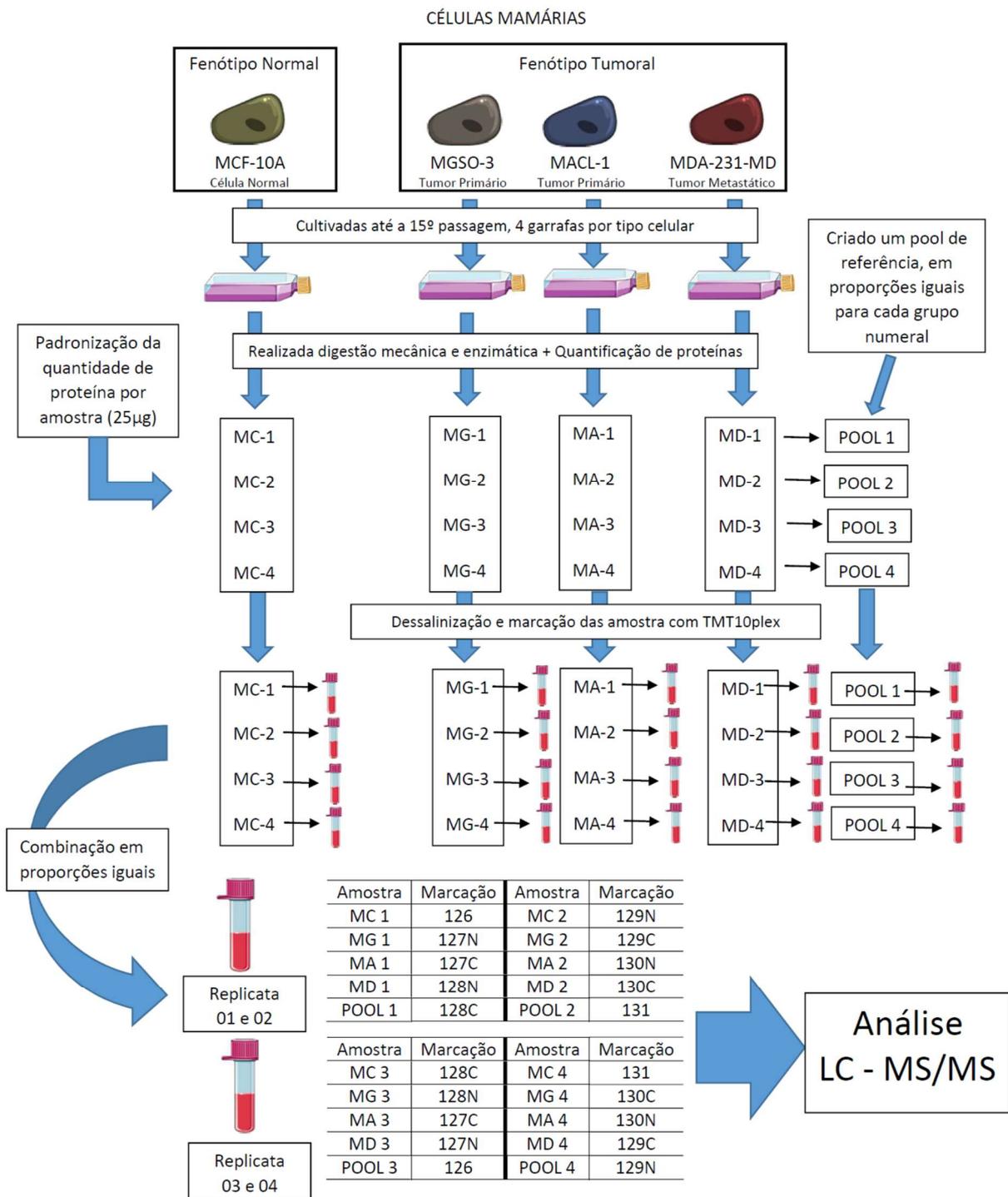


Figura 8 – Representação esquemática do fluxograma de trabalho da etapa de preparação das amostra para análise proteômica via LC-MS/MS. MC: Linhagem celular MCF-10A; MG: Linhagem celular MGSO-3; MA: Linhagem celular MACL-1; MD: Linhagem celular MDA-231-MD. As marcações dos peptídeos por TMT10plex são discriminadas na tabela da figura descrita em cada replicata. Fonte: Próprio autor.

5.5 – Pré-fracionamento “offline”

As amostras foram solubilizadas em 20 mM de formiato de amônio (pH 10) e carregadas em um cartucho Sep-Pak SPE (Waters) previamente ativado com 1 mL de acetonitrila e equilibrado com o 20 mM de formiato de amônio (pH 10). Após o carregamento das amostras, o cartucho Sep-Pak foi lavado 3x com 20 mM de formiato de amônio. As amostras foram eluídas por um gradiente (em *step*) de 20 mM de formiato de amônio e acetonitrila (5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20%, 22,5%, 25%, 27%, 30%, 50% e 95% de acetonitrila). As amostras eluídas foram combinadas em 8 frações. As amostras foram evaporadas em centrífuga a vácuo do tipo *speedvac* e armazenadas a -20°C.

5.6. – Análise proteômica: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução

Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de nanofluxo (EASY nLC, Thermo) acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução (Q Exactive HF, Thermo). As amostras pré-fracionadas foram ressuspendidas em solução A (ácido fórmico 0,1%). Cada amostra foi carregada (5 µL) em uma pré-coluna de fase reversa C18 (3 cm de comprimento × 100 µm diâmetro interno, 5 µm diâmetro da resina, Reprosil-Pur C18-AQ) utilizando um fluxo de 20 µl/min e a separação cromatográfica ocorreu em coluna analítica (20 cm de comprimento × 75 µm diâmetro interno, 3 µm diâmetro da resina, Reprosil-Pur C18-AQ) utilizando o seguinte gradiente da solução B (ácido fórmico 0,1% em 95% de acetonitrila): (i) 1–3% da solução B em 3 min, (ii) 3–28% da solução B em 45 min, (iii) 28–45% da solução B em 10 min, (iv) 45–100% da solução B em 3 min. O fluxo foi mantido em 250 nL/min (0,25 µL/min). O espectrômetro de massa foi operado no modo positivo e análise dependente de dados (DDA, sigla em inglês) Top20. Os íons parentais (MS1) foram acumulados (tempo máximo de acumulação = 120ms ou número máximo de íons acumulados = 3×10^6) e resolvidos no orbitrap utilizando uma resolução de 120.000 FWHM. Os íons mais intensos foram selecionados para fragmentação HCD (janela de seleção dos íons no quadrupolo = 1,2 m/z e energia normalizada de fragmentação (NCE, sigla em inglês) = 32). Os íons-filhos (MS2) foram acumulados (tempo máximo de acumulação = 120ms ou número máximo de íons acumulados = 1×10^5) e resolvidos no orbitrap utilizando uma resolução de 60.000 FWHM. Os íons selecionados para fragmentação foram incluídos em uma lista de exclusão dinâmica por 15 segundos.

5.7 – Análise de Bioinformática

Os espectros gerados (.RAW) foram visualizados utilizando o programa Xcalibur (Thermo). Utilizamos o programa MaxQuant (COX, 2008) para realizar as buscas em banco de dados de proteínas humanas (Uniprot/Swissprot, 26.468 proteínas depositadas, download em 27/06/2019), utilizando o algoritmo de buscas Andromeda, implementando no software MaxQuant. Como modificação fixa, foi utilizado “carbamidometilação de cisteínas” e, como modificações variáveis, “TMT10plex (N-terminal e Lys)”, “oxidação de Met”, “acetilação de N-terminal (proteínas)”. A opção “match between runs” não foi ativada. A tripsina e a Lys-C foram incluídas como enzimas e foram permitidos até 2 perdas de digestão. Apenas as proteínas que continham uma taxa de falso positivo (FDR, sigla em inglês) $\leq 1\%$ e pelo menos um peptídeo único foram incluídas nas análises posteriores, que foram realizadas utilizando o programa DanteR (TAVERNER, 2012) e Perseus (TYANOVA, 2016), para análises estatísticas e visualização dos dados.

5.8 - Quantificação de proteínas por Western Blot

Para das proteínas (tabela 4), foi utilizado 40 μg de extrato proteico de cada linhagem celular ($n = 3$). As amostras foram aplicadas em canaletas de gel de poliacrilamida (10%) e a separação das proteínas ocorreu por 1 hora, de acordo com sua massa molecular. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, que foram bloqueadas com leite em pó (5%) diluído em PBS-Tween (0,3%) por 1 hora. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por 16 a 18 horas com solução contendo 5% de leite em pó, diluído em PBS-Tween 0,3% com anticorpos das proteínas de interesse (tabela 4). Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário, na diluição 1:1000, por 2 horas. Logo após esse processo, as membranas foram reveladas por detecção quimiluminescente (Amersham Biosciences do Brasil LTDA)

Tabela 4 – Anticorpos utilizados na avaliação de expressão de proteínas por Western Blot

Proteína	Anticorpo	Organismo	Empresa	Anticorpo Secundário	Diluição utilizada
β -Actina	Anti- β -Actina	Homo sapiens	Abcam	Anti-Coelho	1:1000
GAPDH	Anti-GAPDH	Homo sapiens	Abcam	Anti-Coelho	1:1000

Fonte: Bula dos fabricantes dos anticorpos

5.9 – Determinação da densidade de mitocôndrias através da marcação com MITOTRACKER™ Green.

Com o objetivo de estimar a quantidade de mitocôndrias presentes em cada linhagem celular, foi utilizado o Kit MITOTRACKERTM Green da Thermo Fisher Scientific, específico para esse objetivo.

As células específicas de cada linhagem foram cultivadas em garrafas T25 até a passagem 15, com confluência superior a 90%. Então, as células foram lavadas por 3 vezes com tampão PBS e cultivadas em meio DMEM sem suplementação de soro fetal bovino por 24 horas para sincronização do ciclo celular de todas as células no estágio G0/G1. Após sincronização, as células foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS e incubadas com o fluoróforo do kit na concentração 150 mM por 30 minutos, seguindo de tripsinização e fixação das células com paraformaldeído a 4%.

Células das quatro linhagens foram fixadas sem a marcação pelo fluoróforo para determinação do perfil, tamanho e granulosidade de cada tipo de linhagem celular. Em seguida, determinou-se um *gate* eletrônico único e específico em torno das células de interesse para cada linhagem. As amostras foram analisadas em triplicata e em cada uma foram adquiridos 10.000 eventos. Para leitura, foi utilizado o equipamento BD FACSCan™ com laser de argônio com excitação de 488 nm (15mW), do Laboratório de Citometria, do Centro de Laboratórios Multiusuários do ICB-UFMG (CELAM). Para aquisição das imagens foi utilizado o software BD FACSCeliquist.

5.10 – Análise Estatística

Os dados da proteômica foram analisados usando One-Way ANOVA e *fold-change* = 1,3 (0,38 log₂) em referência ao Pool. Os demais resultados obtidos foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) e as diferenças entre as médias foram analisadas estatisticamente empregando-se o teste One-Way ANOVA seguido de teste de Tukey. Valores de probabilidade de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6 – RESULTADOS

6.1 – Visão geral do perfil proteômico das linhagens analisadas

No estudo proteômico das quatro linhagens utilizadas, foram identificadas um total de 3.008 proteínas. No gráfico de Análise de Componentes Principais, *PCA* (sigla em inglês) (Figura 9), realizamos a comparação dos pools que refletem um mistura de quantidades equimolares de proteínas entre os grupos experimentais e observamos o grau de semelhança e diferença entre o proteoma das quatro linhagens celulares. Para a avaliação dos perfis proteômicos das quatro linhagens celulares, utilizou-se tamanho amostral igual a 4 ($n = 4$), onde cada garrafa de cultura de células representada um grupo experimental. Neste sentido, podemos observar na figura 9 uma boa reprodutibilidade obtida neste estudo, já que as quatro replicadas de cada linhagem celular se agruparam em *clusters* bem definidos. Apenas a linhagem MDA-231-MD apresentou uma maior variação, quando comparada com as outras linhagens celulares (Figura 9). Acreditamos que essa variação seja devida a maior tendência mutagênica destas células, que é uma característica de tumores metastáticos.

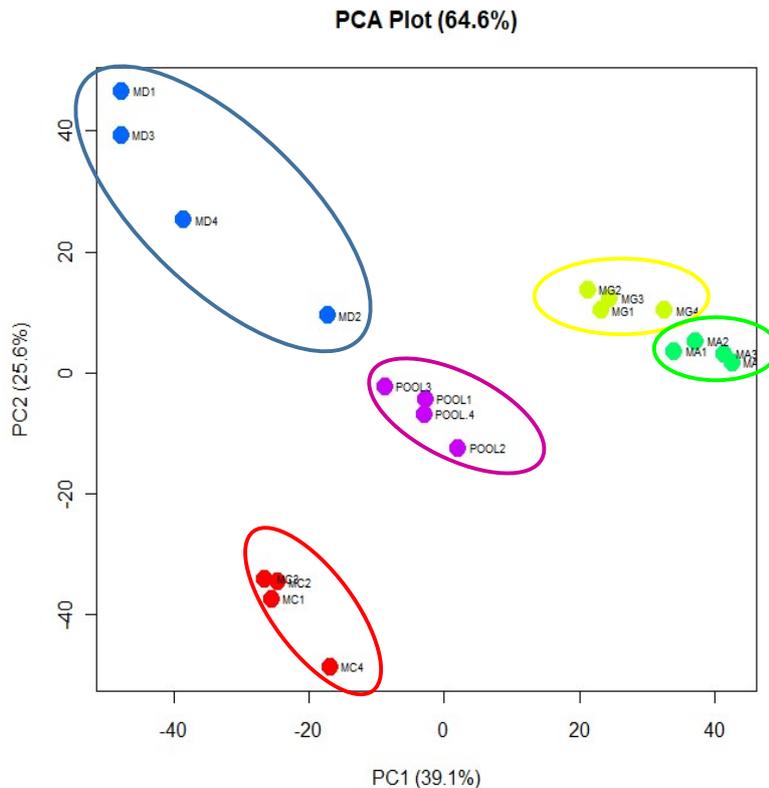


Figura 9 – Gráfico de PCA (Análise de Componentes Principais), em duas dimensões, apresentando a disposição espacial das amostras experimentais utilizadas. Notar que as quatro amostras de Pool (em roxo) encontram-se próximas ao centro do gráfico e em distância relativa semelhante entre os quatro tipos celulares analisados. MC = MCF-10A (vermelho), MG – MGSO-3 (amarelo), MA – MACL-1 (verde), MD – MDA-231-MD (azul).

Analisando as similaridades e diferenças entre as diferentes linhagens, observamos que o proteoma das células de MCF-10A (fenótipo normal) apresentou uma grande diferença em comparação com o proteoma das demais linhagens celulares, MGSO-3 e MACL-1 (fenótipos de tumores primários), e MDA-231-MD (fenótipo de tumor metastático). Também observamos que as linhagens de tumores primários (MGSO-3 e MACL-1) foram agrupadas próximas no gráfico de PCA, indicando uma maior similaridade entre os seus proteomas, e mantendo uma certa distância em relação à linhagem MDA-231-MD. Com isso, podemos sugerir que existe uma diferença no perfil proteômico das linhagens celulares estudadas, especialmente quando comparamos o fenótipo normal (MCF-10A) com os fenótipos de tumores primários (MGSO-3 e MACL-1) e metastáticos (MDA-231-MD). É importante salientar que o POOL dos proteomas se manteve próximo ao centro do gráfico, evidenciado seu papel normalizador.

Com relação a distribuição da abundância das proteínas, através dos histogramas representados da figura 10 à 14, observamos uma distribuição gaussiana e, portanto, uma distribuição normal dos dados quantitativos.

Já no gráfico de *boxplot* (figura 15), foi possível observar que ambos os grupos apresentam uma simetria semelhante, com medianas bem próximas, e uma dispersão relativamente comum entre os grupos, indicando que a normalização dos dados foi satisfatória. O mesmo perfil foi visualizado para os POOLs (figura 16)

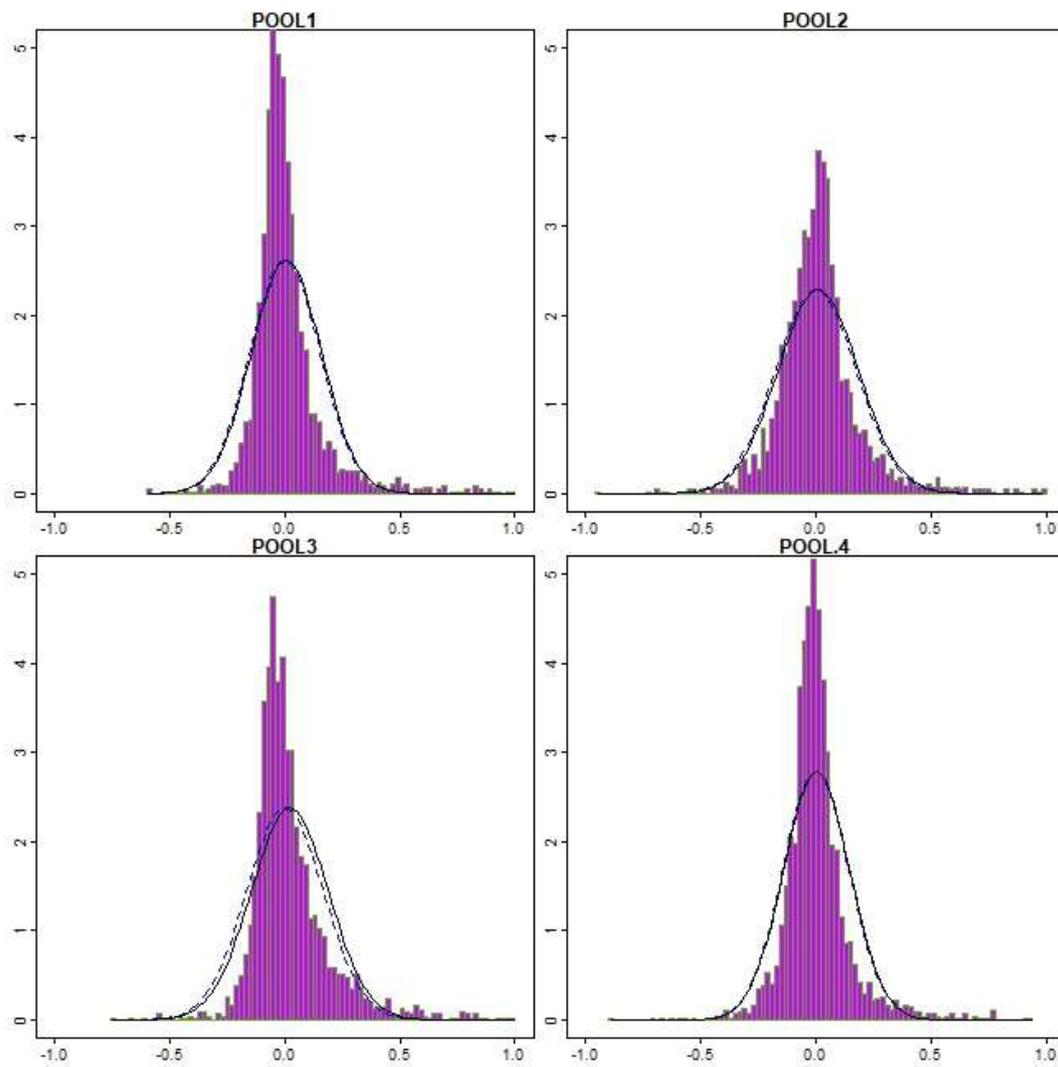


Figura 10 - Histograma da distribuição das proteínas quantificadas nos *datasets* dos Pools. A linha preta representa uma distribuição gaussiana. O eixo X representa a quantificação das proteínas, indo de -1 a +1. O eixo Y indica a frequência de proteínas em cada valor do eixo X.

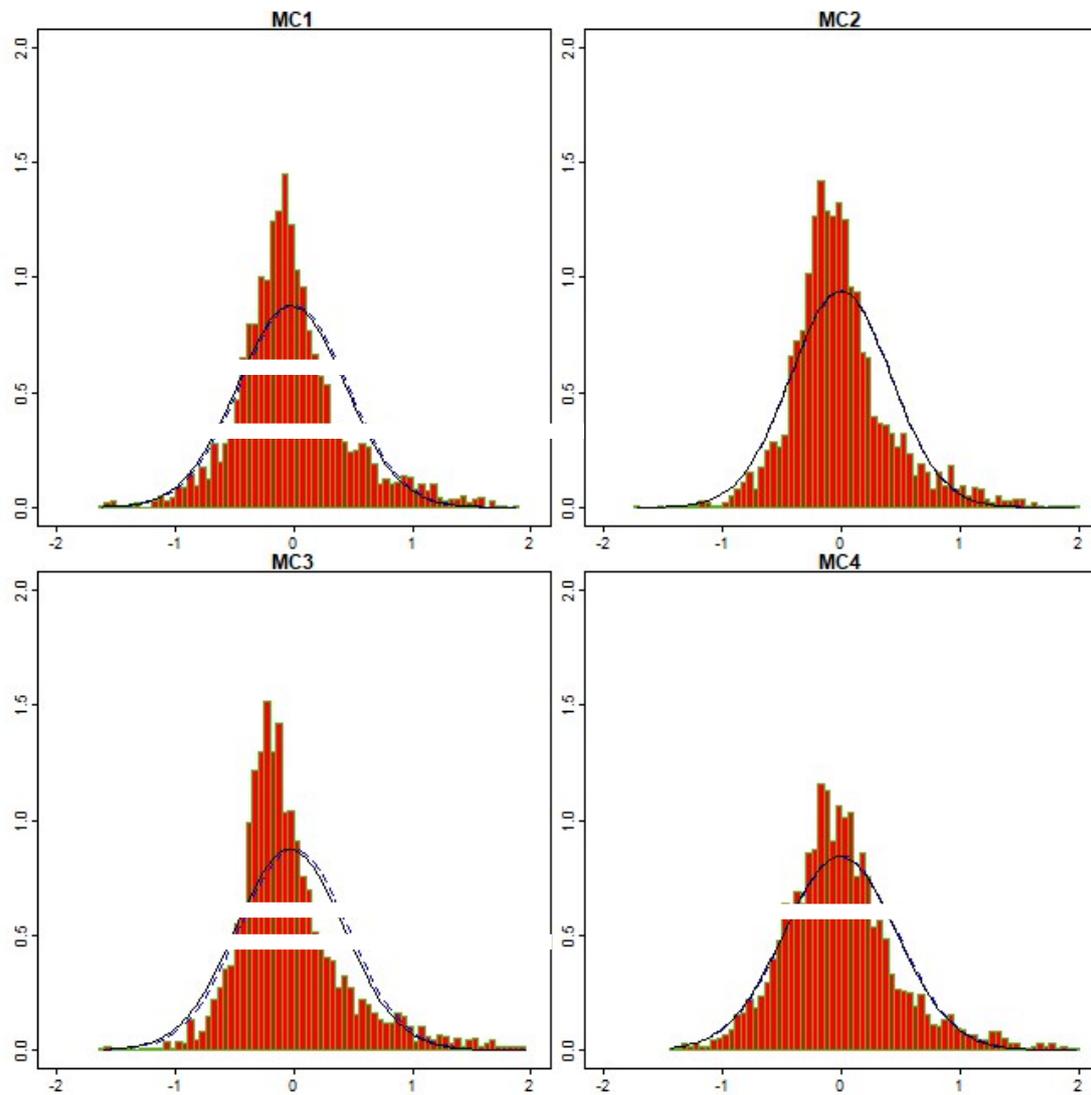


Figura 11 – Histograma da distribuição das proteínas quantificadas nos *datasets* da linhagem MCF-10A. A linha preta representa uma distribuição gaussiana. O eixo X representa a quantificação das proteínas, indo de -1 a +1. O eixo Y indica a frequência de proteínas em cada valor X.

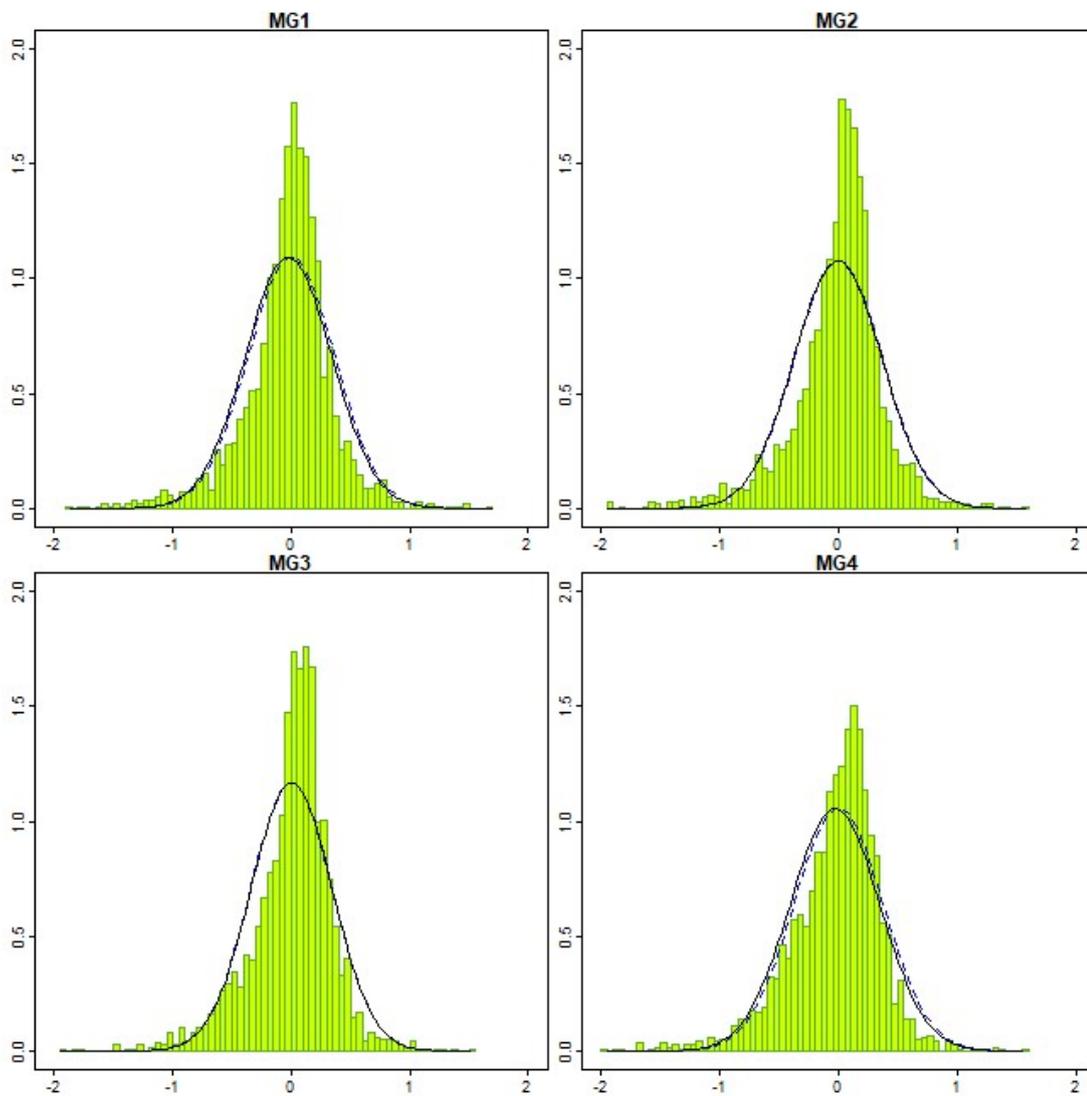


Figura 12 – Histograma da distribuição das proteínas quantificadas nos *datasets* da linhagem MGSO-3. A linha preta representa uma distribuição gaussiana. O eixo X representa a quantificação das proteínas, indo de -1 a +1. O eixo Y indica a frequência de proteínas em cada valor X.

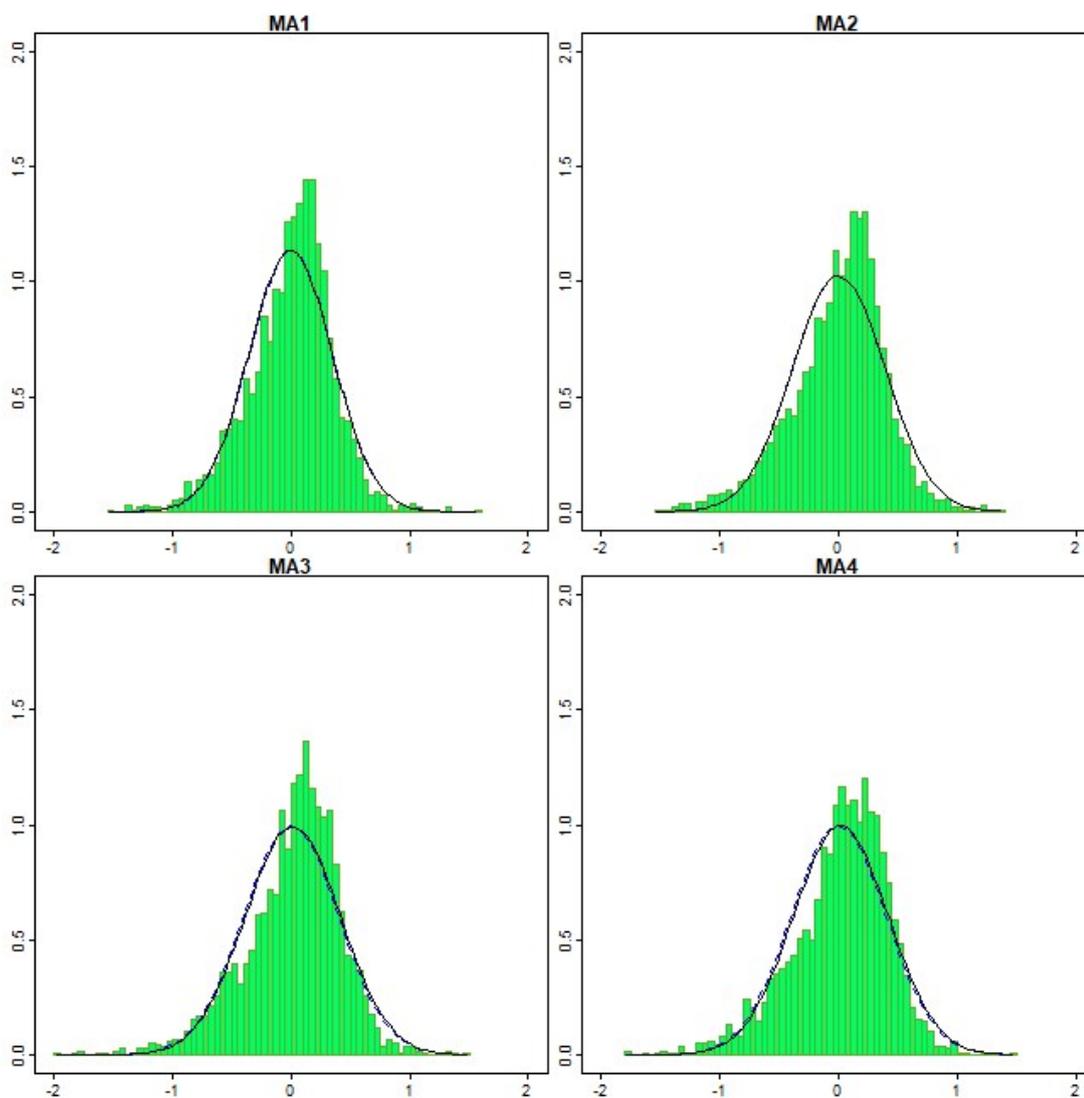


Figura 13 – Histograma da distribuição das proteínas quantificadas nos *datasets* da linhagem MACL-1. A linha preta representa uma distribuição gaussiana. O eixo X representa a quantificação das proteínas, indo de -1 a +1. O eixo Y indica a frequência de proteínas em cada valor X.

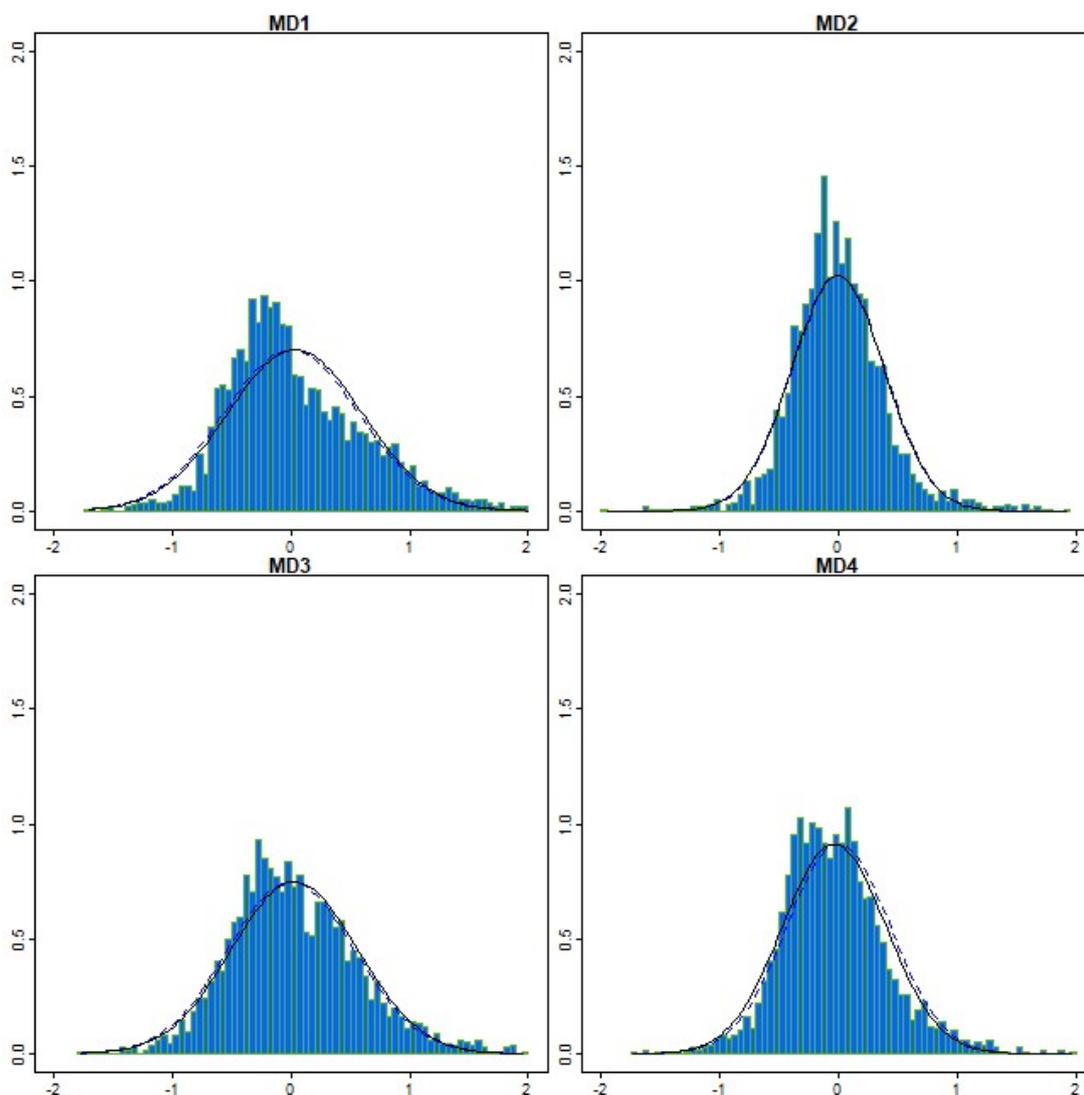


Figura 14 – Histograma da distribuição das proteínas quantificadas nos *datasets* da linhagem MDA-231-MD. A linha preta representa uma distribuição gaussiana. O eixo X representa a quantificação das proteínas, indo de -1 a +1. O eixo Y indica a frequência de proteínas em cada valor X.

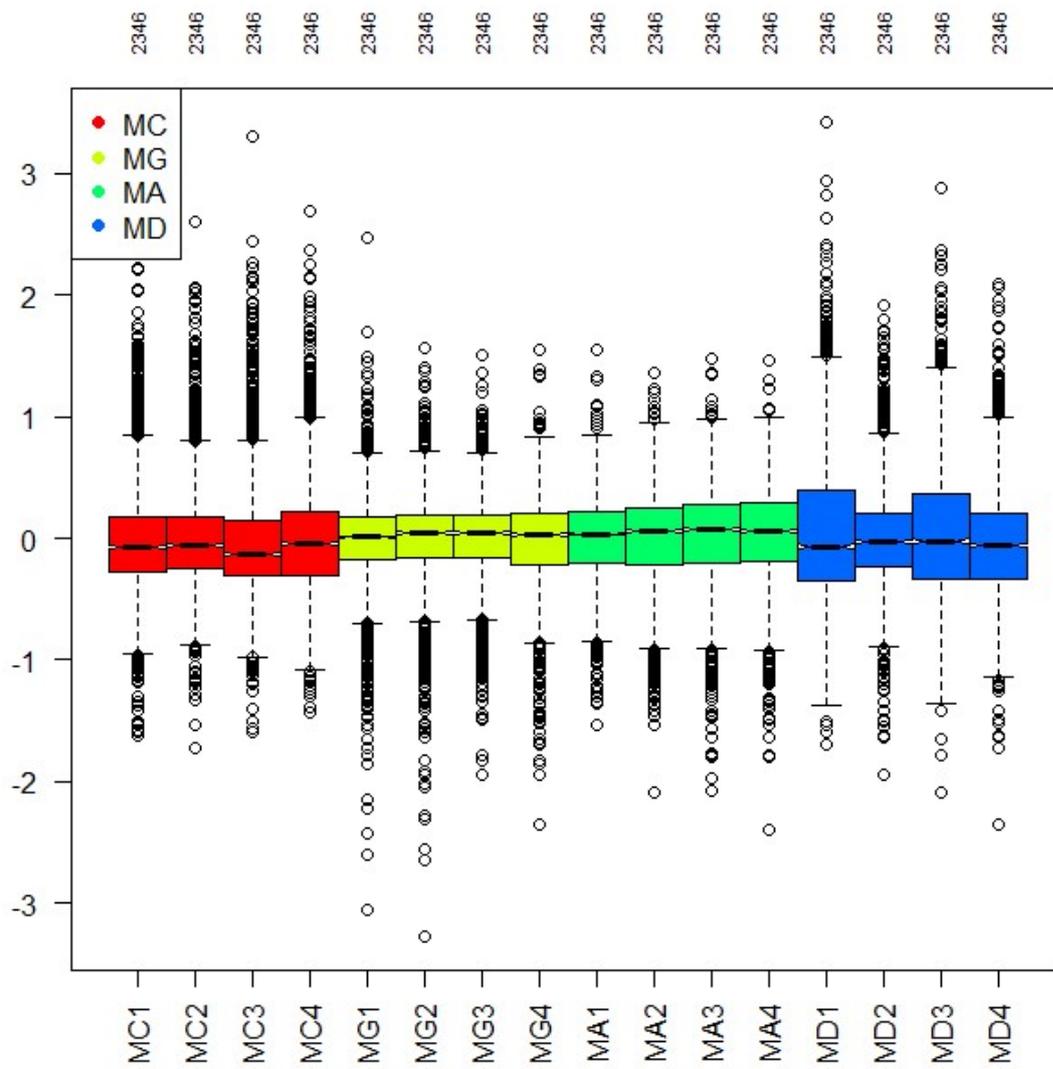


Figura 15 – Gráfico de box-plot das quatro linhagens celulares experimentais utilizadas (MC: MCF-10A; MG: MGSO-3; MA: MACL-1; MD: MDA-231-MD). Valores de abundância das proteínas estão representados em log2.

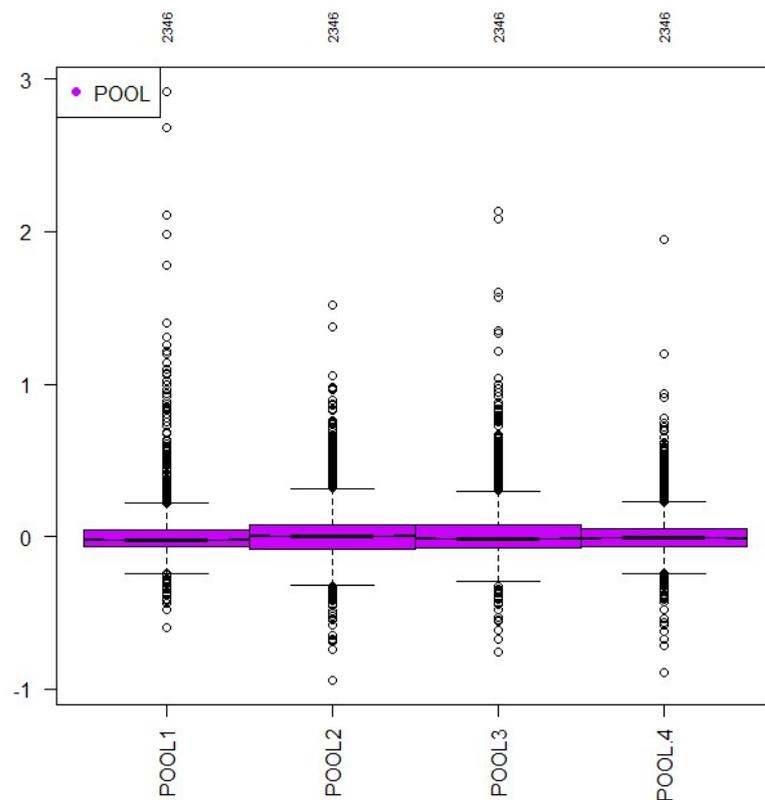


Figura 16 – Gráfico de box-plot grupos experimentais de referência (POOLs). Valores de abundância das proteínas estão representados em log2.

O gráfico de calor (*heatmap*) da Figura 17 representa as razões de abundância das quatro linhagens celulares analisadas, devidamente subtraídas pelas mesmas proteínas dos grupos de referência (POOLs). Cores mais quentes indicam proteínas mais abundantes e mais frias as menos abundantes. As linhas representam as proteínas identificadas e quantificadas neste estudo, sendo os grupos experimentais apresentados nas colunas. O gráfico corrobora com todos os resultados até então apresentados. A sua análise permite verificar que as replicatas de cada grupo experimental estão agrupadas no mesmo *cluster*. Podemos perceber também que as células com o fenótipo de tumor primário (MGSO-3 e MACL-1) estão mais próximas no dendrograma apresentado (colunas). Também podemos perceber que existe uma diferença no perfil de abundância das proteínas de células com o fenótipo normal (MCF-10A), com o fenótipo de tumor primário (MGSO-3 e MACL-1) e com o fenótipo de tumor metastático (MDA-231-MD). É possível identificar, inclusive, uma dinâmica no perfil de abundância das proteínas desde MCF-10A (fenótipo normal) até MDA-231-MD (fenótipo de tumor

metastático). Ou seja, a alteração no perfil proteômico dessas células podem indicar as bases moleculares que subsidiam o processo tumorigênico e o desenvolvimento da patologia.

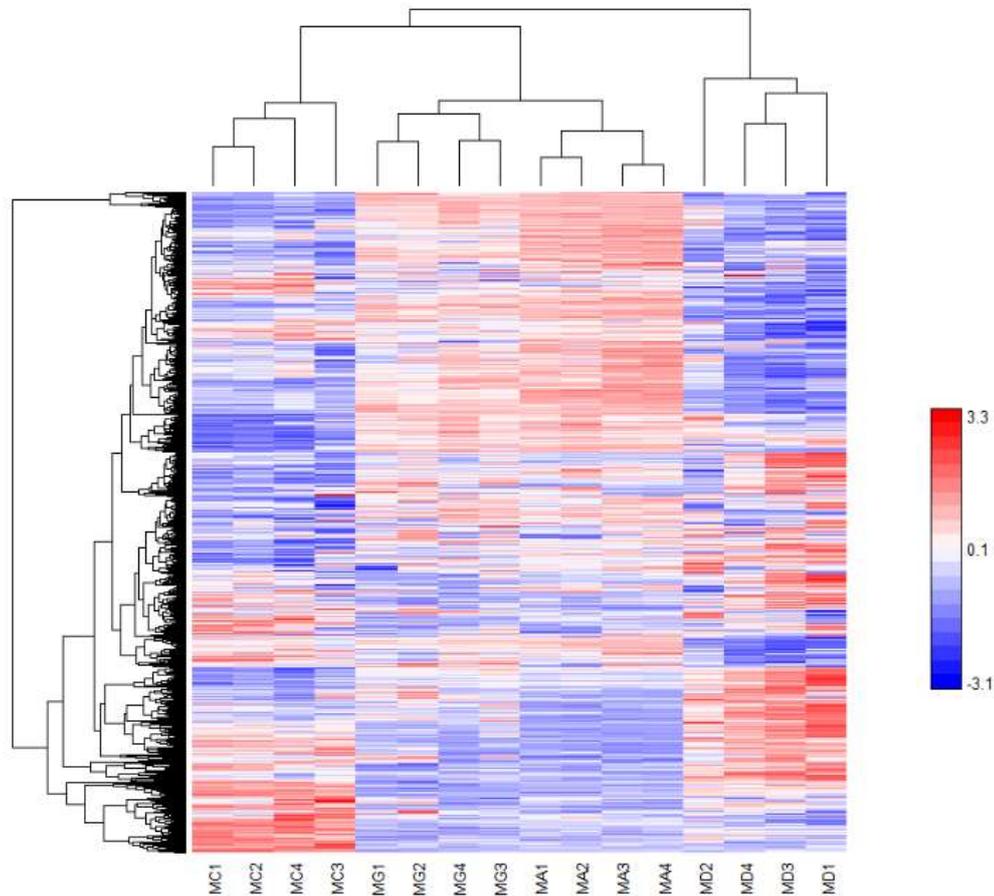


Figura 17 – Gráfico de calor (*heatmap*) das quatro linhagens celulares experimentais avaliadas. As proteínas (linhas) foram agrupadas utilizando a distância de Euclidean. Cores mais quentes (diferentes tons de vermelho) indicam abundâncias maiores das proteínas e cores mais frias (diferentes tons de azul) representam as proteínas menos abundantes. Baseando no padrão de distâncias de Euclidean, foi possível agrupar os grupos experimentais em dendrogramas (colunas). MC – MCF-10A (Linhagem celular epitelial, fenótipo normal); MG – MGSO-3 (Linhagem celular epitelial, tumor primário); MA – MACL-1 (Linhagem celular epitelial, tumor primário); MD – MDA-231-MD (Linhagem celular epitelial, tumor metastático).

Aplicando um valor estatístico de $p < 0,05$ nas 3.008 proteínas encontradas, foram quantificadas e identificadas 2.347 proteínas. Para a determinação da regulação, se positiva (*up-regulation*) ou negativa (*down-regulation*), comparamos os *datasets* das quatro linhagens utilizadas com o *dataset* denominado POOL, que compreende uma mistura igual em massa de peptídeos oriundos de todas as linhagens celulares usadas neste estudo, como representado na figura 8. Neste contexto, valores de intensidade menores do que zero representam proteínas menos abundantes e valores maiores do que zero indicam que as proteínas estão mais abundantes. Para este estudo decidimos aplicar um filtro mais restritivo para identificar as

proteínas significativamente reguladas, aplicando também um valor mínimo de *fold-change* > 1,3 ou 0,38 em escala logarítmica na base 2 (log2) em relação ao Pool. Desta forma, encontramos 1709 proteínas reguladas em ambas as linhagens celulares (Tabela 05 e figura 18).

Tabela 5 – Número de proteínas identificadas significativamente reguladas utilizando os diferentes filtros estatísticos ($P < 0,05$ ou *fold-change* = 1,3 e $P < 0,05$)

Total de proteínas encontradas		p<0,05	2347
		p<0,05+fg 1,3	1709
Tipo celular	Valor estatístico	Todas	Down
MCF-10A	p < 0.05	Todas	940
		Down	572
		UP	368
	Fold change 1.3	Todas	884
		Down	540
		UP	344
MGSO-3	p < 0.05	Todas	933
		Down	391
		UP	542
	Fold change 1.3	Todas	876
		Down	381
		UP	495
MACL-1	p < 0.05	Todas	1213
		Down	448
		UP	765
	Fold change 1.3	Todas	1.123
		Down	442
		UP	681
MDA-231-MD	p < 0.05	Todas	1281
		Down	701
		UP	580
	Fold change 1.3	Todas	1200
		Down	666
		UP	534

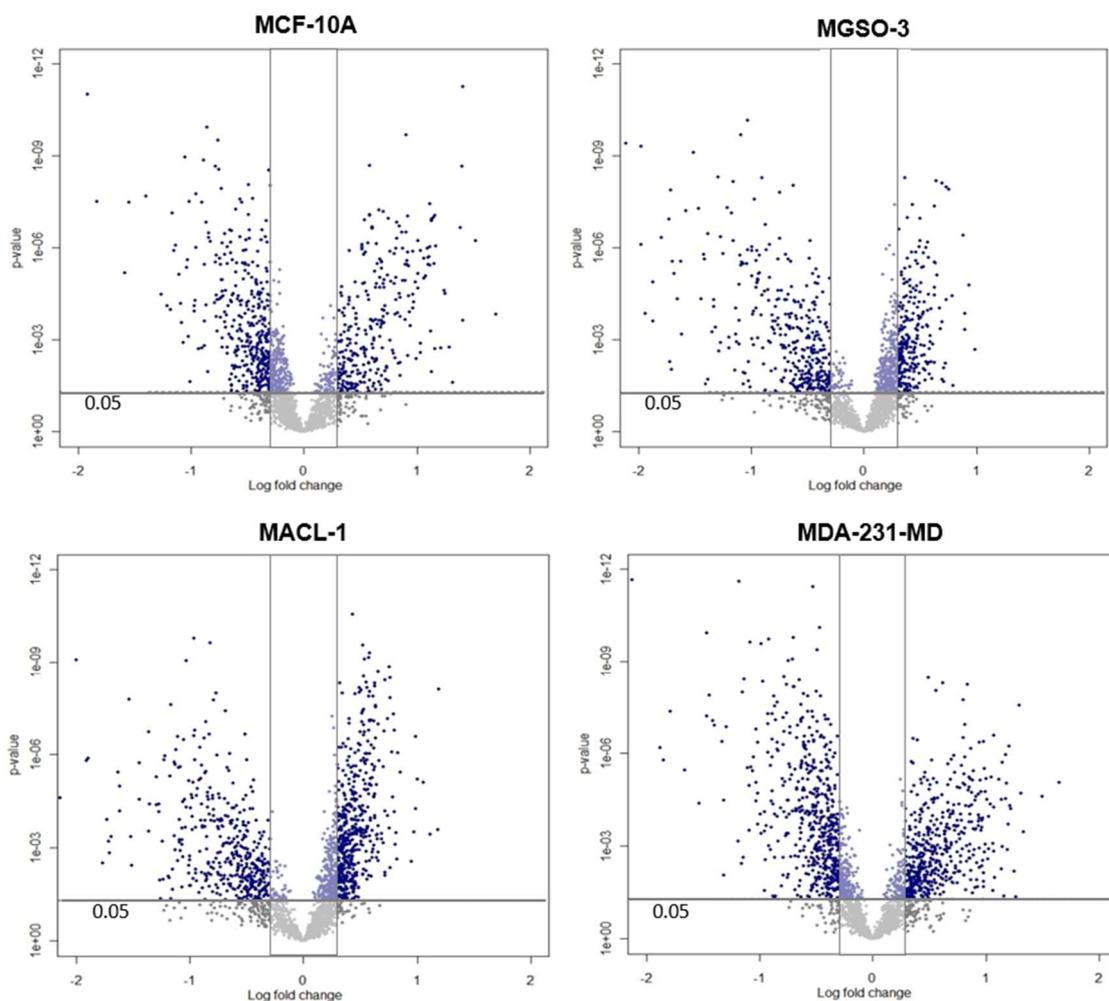


Figura 18 – Gráfico de Volcano plot evidenciando a quantidade de proteínas mais abundantes (up) e menos abundantes (down) das amostras experimentais utilizadas para $p < 0,05$ e $fold-change > 1,3$.

A partir deste ponto da tese, todos os resultados serão apresentados utilizando apenas as proteínas reguladas estatisticamente ($P < 0,05$ e $fold-change > 1,3$). Com o diagrama de Venn, foi possível verificar como as proteínas das quatro linhagens estudadas, sejam elas menos ou mais abundantes, estavam compartilhadas entre si, assim como os processos biológicos associados a tais proteínas (figuras 19 e 20).

Na análise das proteínas menos abundantes (figura 19), quatro proteínas reguladas eram compartilhadas entre todas as linhagens: NADH hidrogenase 1 β mitocondrial; Proteína THEM6; Proteína secretória 4 associada à membrana; e Complexo de proteína 2 nucleolar homóloga.

Ainda sobre as proteínas menos abundantes, foram identificadas 81 proteínas compartilhadas entre todas as linhagens celulares utilizadas neste estudo. Quando observamos apenas para os *datasets* de células com perfil de tumoral primário, foram identificadas 212

proteínas compartilhadas entre MACL-1 e MGSO-3. Com relação às proteínas menos abundantes e exclusivas para cada linhagem, foram identificadas 301 proteínas de MCF-10A (célula mamária não-tumoral), a 51 proteínas de MGSO-3 (células tumorais primárias), 101 proteínas de MACL-1 (células tumorais primárias), e 347 proteínas de MDA-231-MD (células tumorais metastáticas).

Utilizando análises de ontologia gênica (GO, sigla em inglês), através do programa *DAVID Functional Annotation Tool* (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>), as proteínas compartilhadas entre as linhagens de tumor primário (MGSO-3 e MACL-1) apresentaram, entre os 10 processos biológicos mais relevantes estatisticamente, ou seja, com valor de $P < 0,05$ para os termos GO relacionados a processos biológicos, processos relacionados ao metabolismo energético, apresentação de antígenos via MHC de classe I e adesão celular, dentre outros. Já na análise GO das proteínas compartilhadas por todas as linhagens tumorais (primárias e metastáticas), os dez processos biológicos mais relevantes encontrados foram a regulação da homeostase e gradiente eletroquímico celular, localização de proteínas na membrana plasmática e processos de metabolismo energético (Figuras 19).

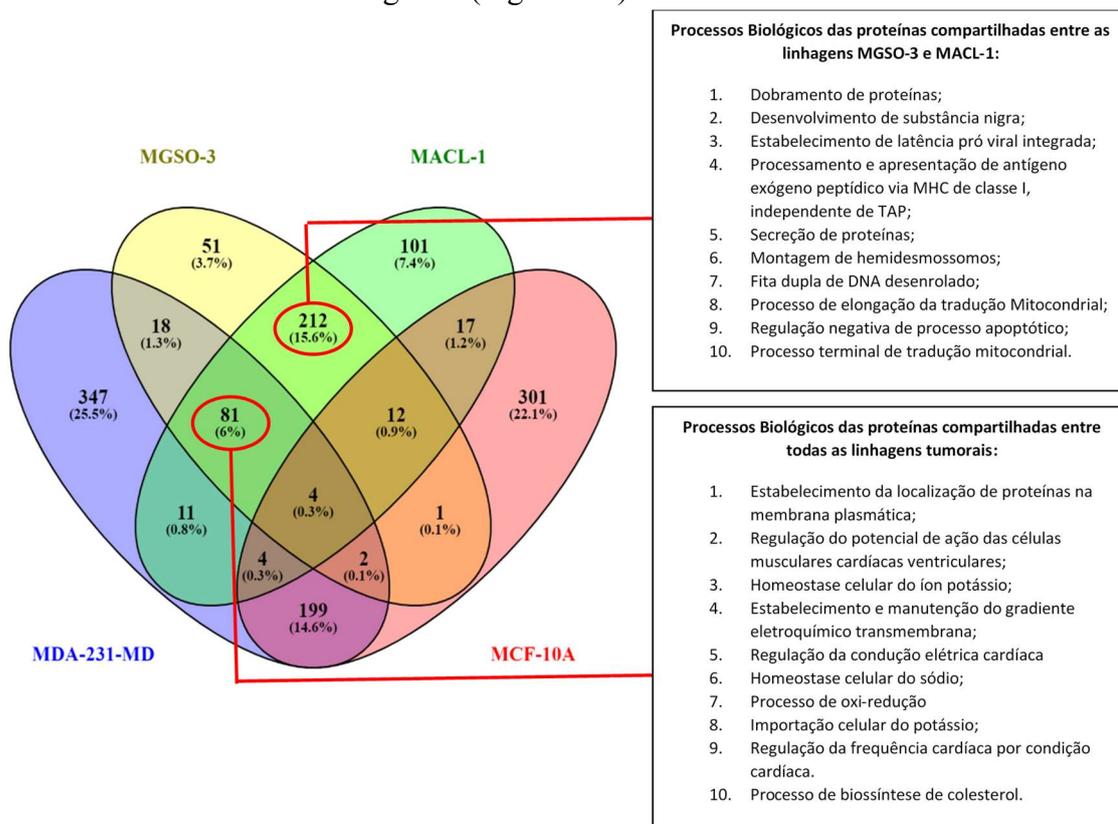


Figura 19: Diagrama de Venn das proteínas menos abundantes ($P < 0,05$ e fold-change $< -0,38$ (\log_2)) nas quatro linhagens celulares analisadas. Os quadros em destaque mostram os processos biológicos mais relevantes, estatisticamente, para as proteínas tumorais compartilhadas. Softwares utilizados: diagrama de Venn (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>); ontologia gênica das proteínas: David Functional Annotation Tools (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>).

Na análise de proteínas mais abundantes, utilizando o mesmo processo descrito anteriormente, apenas uma proteína compartilhada entre todas as linhagens celulares foi encontrada, o fator de transcrição MfaK. Já as proteínas compartilhadas entre todas as células tumorais, foram encontradas 37 proteínas. Analisando apenas as linhagens de células tumorais com fenótipo primário, foram encontradas 347 proteínas compartilhadas (Figura 20).

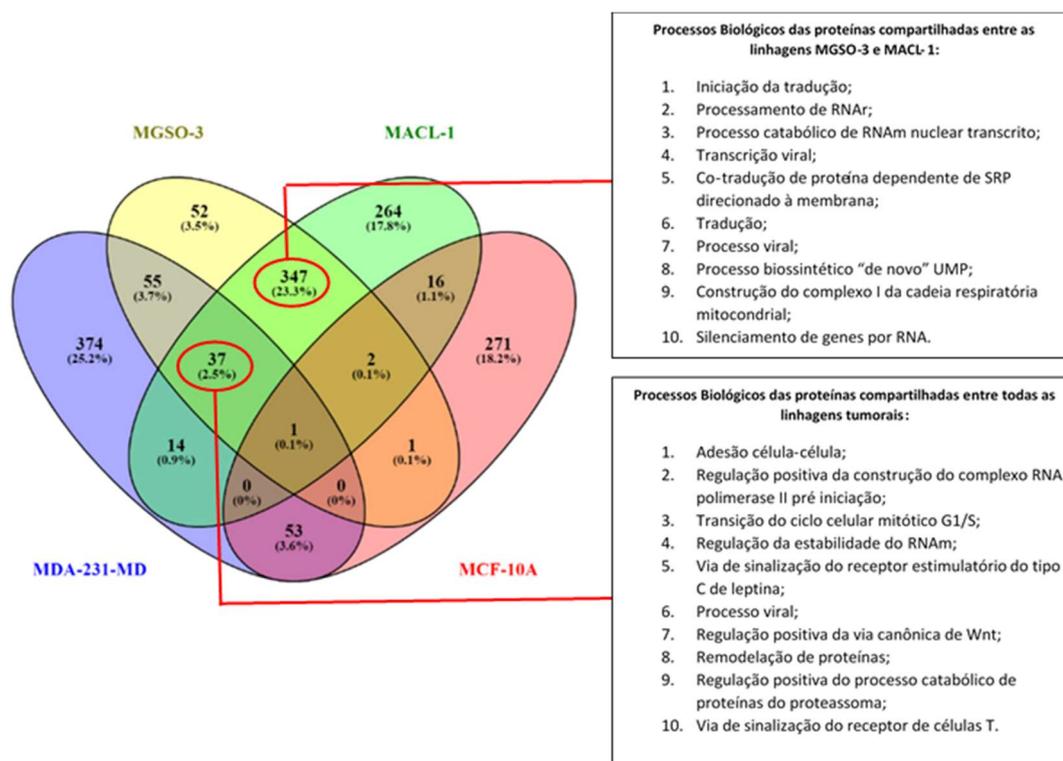


Figura 20: Diagrama de Venn das proteínas mais abundantes ($P < 0,05$ e fold-change $> 0,38$ (\log_2)) nas quatro linhagens celulares analisadas. Os quadros em destaque mostram os processos biológicos mais relevantes, estatisticamente, para as proteínas tumorais compartilhadas. Softwares utilizados: diagrama de Venn (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>); ontologia gênica das proteínas: David Functional Annotation Tools (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>).

Com relação à análise de GO das proteínas exclusivas para cada linhagem celular, as tabelas 6 e 7 apresentam os dez processos biológicos estatisticamente mais relevantes de cada. Para as proteínas menos abundantes (tabela 6), observamos que, mesmo com proteínas exclusivas, alguns processos biológicos são semelhantes entre as linhagens celulares tumorais, principalmente relacionados a processos ligados à RNA. No entanto, a maioria dos processos biológicos são distintos, o que pode caracterizar a particularidade de cada linhagem celular. Para as proteínas mais abundantes (tabela 7), os processos biológicos apresentam-se de forma bem variada entre as quatro linhagens celulares.

Para compreendermos melhor as diferenças no proteoma das linhagens celulares em diferentes estágios tumorigênicos, utilizamos novamente o programa *DAVID Functional Annotation Tool* (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>) mas escolhemos associar as proteínas diferencialmente reguladas a termos GO mais abrangentes de processos biológicos (figura 21). A quantidade de proteínas envolvidas em cada grupo foi determinada em porcentagem do total de proteínas menos abundantes ou positivamente em cada linhagem celular.

Os termos GO de processos biológicos com maior porcentagem de proteínas envolvidas foram os relacionados à expressão gênica. O principal destaque observado nesse grupo relaciona-se às linhagens celulares MGSO-3 e MACL-1 (células primárias de CM), que apresentaram mais proteínas mais abundantes associadas a esse processo biológico em comparação às demais linhagens. Em seguida, os termos de processos biológicos relacionados ao metabolismo energético, ciclo celular, citoesqueleto e metabolismo e sinalização de proteínas foram os que mais se alteraram, de forma semelhante, seguidos de termos relacionados ao tráfego vesicular, vias de sinalização celular e reconhecimento imunológico. Em relação ao termo citoesqueleto, vale ressaltar que foram encontradas mais proteínas menos abundantes para as células com fenótipo de tumor primário (MGSO-3 e MACL-1) e positivamente para as células com fenótipo normal (MCF-10A) e de câncer metastático (MDA-231-MD).

Todos os processos biológicos encontrados estão diretamente ou indiretamente relacionados às características cancerígenas descritas na literatura e, conseqüentemente, de acordo com o fenótipo de tipo de linhagens celulares estudadas. Para podermos entender de forma mais profunda a diferença no proteoma das células em diferentes estágios tumorigênicos, optamos por trabalhar, nesse momento, especificamente com processos biológicos relacionados ao metabolismo energético, ciclo celular e citoesqueleto.

Tabela 6 – Processos biológicos mais relevantes das proteínas menos abundantes e exclusivas de cada linhagem celular

Tipo de linhagem celular	Processo biológico	Tipo de linhagem celular	Processo biológico
MCF-10A	Processamento e apresentação de antígeno peptídico exógeno via MHC de classe I, TAP dependente	MGSO-3	Splincing de mRNA via spliceosomo
	Sinalização de NIK/NF-kappaB		Proliferação celular
	Via de sinalização do receptor tipo C estimulatório de lectina		Proteínas direcionadas à mitocôndrias
	Regulação negativa da atividade da ubiquitina ligase envolvido no ciclo celular mitótico		Expressão genética
	Regulação positiva da atividade da ubiquitina ligase envolvida na regulação da transição do ciclo mitótico		Regulação de poliadenilação de RNAm
	Processo catabólico dependente do complexo promotor da anáfase		Processo viral
	Proteína co-traducional dependente de SRP direcionada à membrana		Exportação de RNA para o núcleo
	Translocação de proteínas importadas para o núcleo		Canal de transporte de elétrons
	Maturação do SSU-rRNA		Exportação de RNAm para o núcleo
	Montagem de corpos multivesiculares		Regulação positiva de oligomerização de proteínas
MACL-1	Adesão célula-célula	MDA-231-MD	Proteína co-traducional dependente de SRP direcionada à membrana
	Resposta à espécies reativas de oxigênio		Tradução
	Regulação negativa do splincing de RNAm, via spliceosomo		Resposta mediada por IRE1 para proteínas mal formadas
	Diferenciação de células epiteliais		Gliconeogênese
	Homeostase de redox celular		Cobertura por COPI das vesículas do Golgi
	Transporte mediado por vesícula		Processamento de RNAm
	Processo biossintético de xilose		Processamento de RNA
	Resposta ao estradiol		Transporte regulado por vesículas
	Montagem de proteínas		Regulação do transporte de glicose
	Regeneração orgânica		Importação de proteínas para dentro da matrix mitocondrial

Tabela 7 – Processos biológicos mais relevantes das proteínas mais abundantes e exclusivas de cada linhagem celular

Tipo de linhagem celular	Processo biológico	Tipo de linhagem celular	Processo biológico
MCF-10A	Regulação positiva da produção do interferon tipo I	MGSO-3	Adesão célula-célula
	Montagem de conjuntos de feixes de actina		Docking de vesículas do Golgi
	Adesão celular mediada por integrinas		Transporte mediado por vesículas
	Transporte elétrico mitocondrial, do ubiquitinol para o citocromo C		Transporte do retículo endoplasmático para o Golgi mediado por vesículas
	Adesão celular		Metabolismo de carboidrato
	Adesão célula-substrato		Transporte de proteínas
	Construção de ácido graxo		Transporte de proteínas intracelular
	Resposta celular ao indol-3-metanol		Remoção de radicais superóxidos
	Regulação positiva da organização de projeções celulares		
	Transporte transmembrana de ion hidrogênio		
MACL-1	Processamento de RNAr	MDA-231-MD	Adesão célula-célula
	Proteína co-traducional dependente de SRP direcionada à membrana		Regulação positiva da atividade da ubiquitina ligase envolvida na regulação da transição do ciclo mitótico
	Transcrição viral		Processo catabólico da proteína dependente de ubiquitina mediada por proteassoma
	Iniciação da tradução		Agregação plaquetária
	Dcaimento nonsense-mediado do processo catabólico da transcrição nuclear de RNAm		Localização de proteínas
	Tradução		Polimerização ou despolimerização de actina
	Biogênese de Ribossomos		Resposta à proteína mal formada
	Exportação de pequenas subunidades ribossomais do núcleo		Contração muscular
	Regulação positiva da expressão genica por epigenética		Processamento e apresentação de antígeno peptídico exógeno via MHC de classe I, TAP dependente
	Transporte mediado de vesículas do retículo endoplasmático para o Golgi		Movimento de componentes celulares ou subcelulares

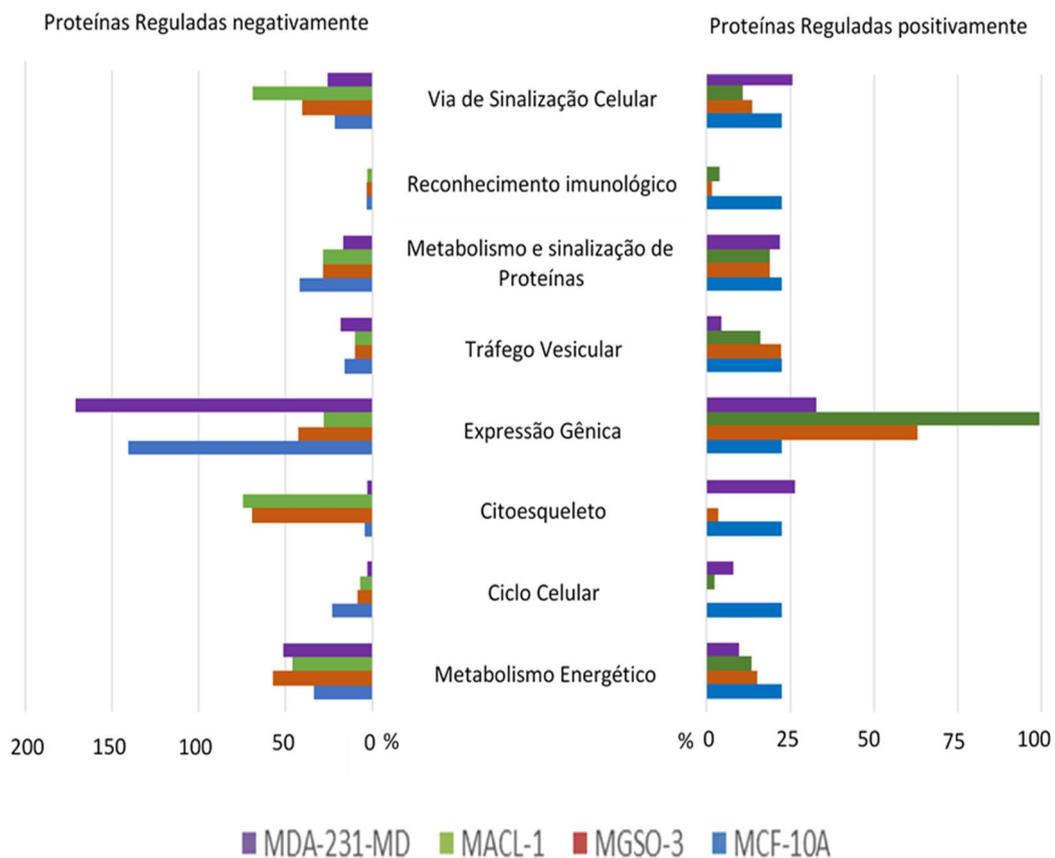


Figura 21: Perfil dos processos biológicos encontrados, por ontologia gênica (GO), nas linhagens celulares não tumorais e tumorais, agrupados em oito categorias distintas. As barras indicam a porcentagem de proteínas envolvidas em cada categoria, discriminadas para cada linhagem celular em relação ao total de proteínas mais e menos abundantes.

6.2 – Metabolismo energético nas linhagens celulares em estudo

Para compreendermos, de forma mais ampla, as alterações relacionadas ao metabolismo energético, todas as proteínas reguladas relacionadas a esse termo GO foram dispostas em um mapa de calor (*heatmap*) e comparadas entre as quatro linhagens estudadas.

Através da figura 22, verifica-se que as linhagens com fenótipo de tumor primário, MGSO-3 e MACL-1, apresentam uma transição para regulação positiva de várias proteínas que estavam menos abundantes na linhagem de fenótipo normal (MCF-10A). Mais surpreendente ainda é que grande parte dessas proteínas com regulação positiva nas linhagens de fenótipo de tumor primário tornam-se menos abundantes na linhagem celular com fenótipo de tumor metastático (MDA-231-MD). Além disso, as proteínas menos abundantes nas linhagens MGSO-3 e MACL-1, na sua grande parte, tornam-se mais abundantes na linhagem MDA-231-

MD. Já com esse resultado, percebe-se que várias proteínas associadas ao metabolismo energético são reguladas de forma significativamente diferente durante a tumorigênese.

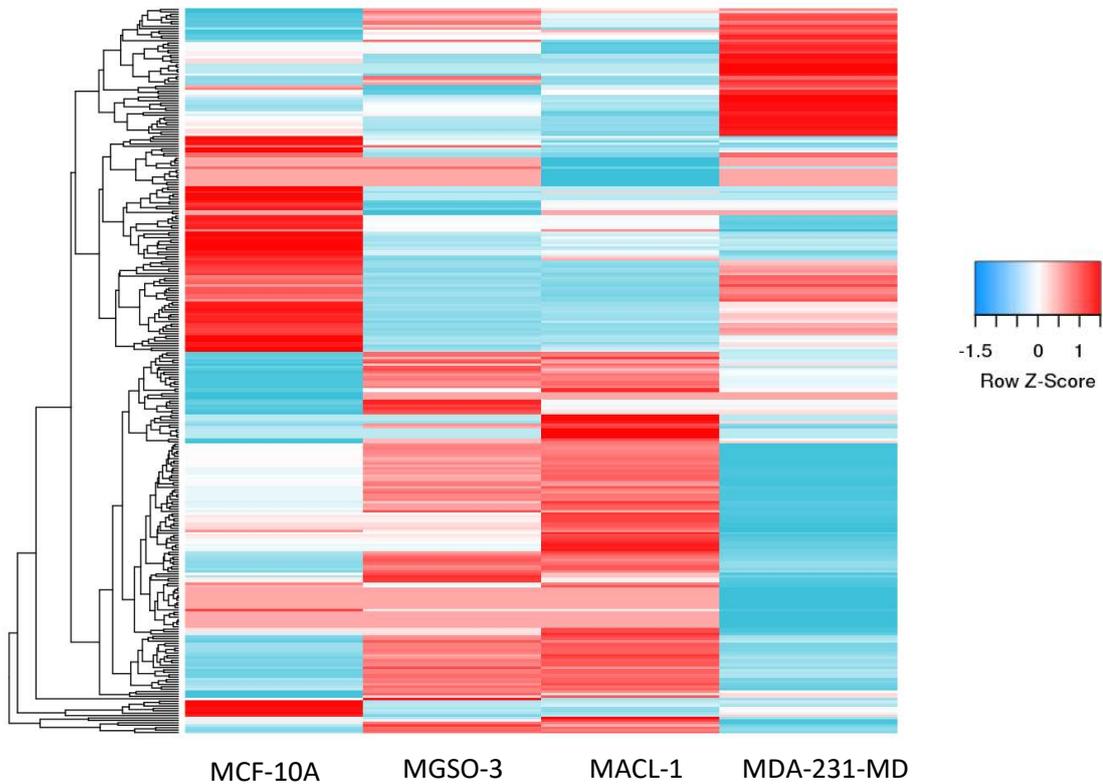


Figura 22 – Gráfico de calor (*heatmap*) das quatro linhagens celulares experimentais avaliadas. Somente as proteínas associadas ao metabolismo energético estão representadas. As proteínas (linhas) foram agrupadas utilizando a distância de Euclidean. Cores mais quentes (diferentes tons de vermelho) indicam abundâncias maiores das proteínas e cores mais frias (diferentes tons de azul) representam as proteínas menos abundantes. Baseando no padrão de distâncias de Euclidean, foi possível agrupar os grupos experimentais em dendrogramas (colunas). MC – MCF-10A (Linhagem celular epitelial, fenótipo normal); MG – MGSO-3 (Linhagem celular epitelial, tumor primário); MA – MACL-1 (Linhagem celular epitelial, tumor primário); MD – MDA-231-MD (Linhagem celular epitelial, tumor metastático).

6.2.1 – Síntese e degradação de lipídeos

Dentro do GO termo metabolismo energético, percebe-se várias proteínas relacionadas a diferentes processos metabólicos de síntese e degradação de lipídeos (Figura 23). A análise destes processos sugere que a linhagem de fenótipo normal, MCF-10A, utiliza vários mecanismos de síntese e de degradação de lipídeos no seu metabolismo energético, desde processos de biossíntese de lipídeos e colesterol até a β oxidação de ácidos graxos, que apresentam proteínas relacionadas a esses processos e mais abundantes. No entanto, todas as linhagens tumorais, sejam elas com fenótipo de tumor primário ou metastático, apresentam a maioria desses processos regulados negativamente. Esses dados indicam um comportamento do metabolismo de lipídeo inverso das linhagens tumorais em relação a linhagem MCF-10A.

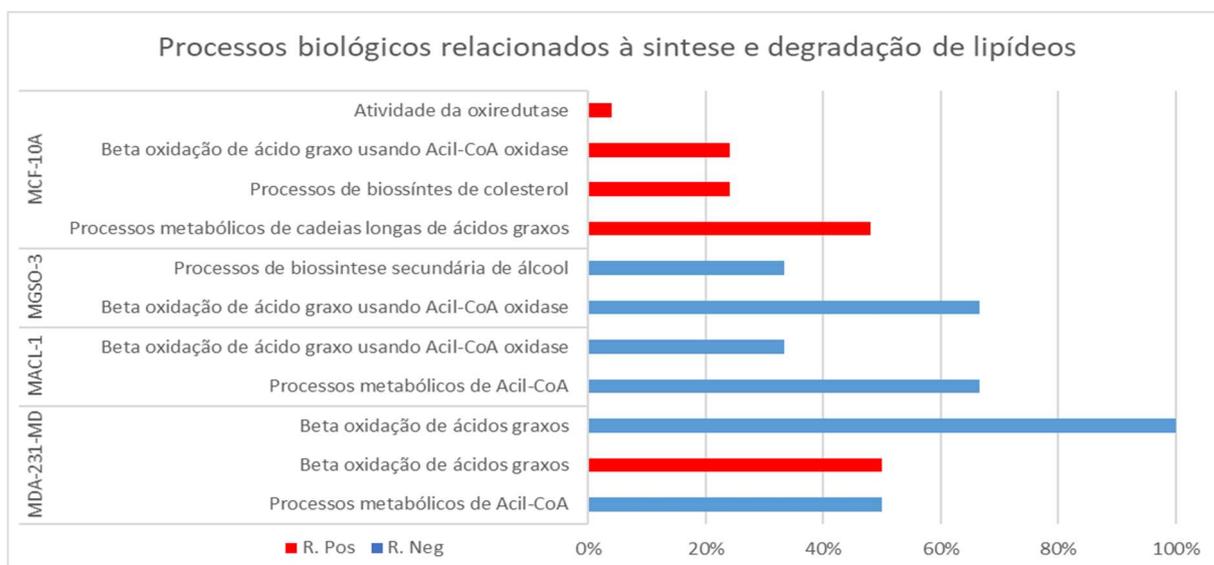


Figura 23 – Gráfico dos processos biológicos relacionados ao metabolismo energético na síntese e degradação de lipídeos para cada linhagem celular. A porcentagem das vias metabólicas de cada linhagem celular envolvidas nos processos biológicos, descrita na representação gráfica, é dada pela sua relação com todas as proteínas mais ou menos abundante relacionadas ao processo. R.Pos: Processos biológicos com regulação positiva; R.Neg: Processos biológicos com regulação negativa

Dentre esses processos metabólicos alterados nas linhagens tumorais, a β oxidação estava representada nas quatro linhagens celulares estudadas. Utilizando as proteínas reguladas desse processo para elaborar um gráfico de calor (*heatmap*), foi possível observar como esse processo de hidrólise de lipídeos para obtenção de energia se comportava nas quatro linhagens estudadas (Figura 24). Tanto a β oxidação mitocondrial quanto a β oxidação peroxissomal apresentavam proteínas com regulação alterada. Todas as proteínas encontradas que participavam da β oxidação peroxissomal estavam menos abundantes ou sem regulação em todas as linhagens tumorais. Já na β oxidação mitocondrial, a regulação negativa ocorria primordialmente nas linhagens de tumor primário, sendo tais proteínas mais abundantes na linhagem com fenótipos normal e de tumoral metastático. Esse dado sugere que tumores primários utilizam em menor escala os lipídeos como fonte primária de energia. Contudo, a linhagem de tumor metastático apresentou algumas proteínas mais abundantes para obtenção de energia através da β oxidação, sugerindo que essa maquinaria proteica pode ser usada pela linhagem metastática para obtenção de energia (Figura 24).

Outras proteínas acessórias ao processo de β oxidação estavam presentes. A Carnitina O-palmitoiltransferase 2 (gene CPT2) estava regulada positivamente nas linhagens celulares de tumor primário, apesar das proteínas de β oxidação estarem menos abundantes. A Enzima Trifuncional β (gene HADHB), responsável pela β oxidação de ácidos graxos de cadeias longas, e a Isomerase (3,5)-Delta(2,4)-dienoil-CoA (gene ECH1), responsável pela β oxidação de ácidos graxos insaturados, foi encontrada regulada negativamente em todas as linhagens celulares tumorais.

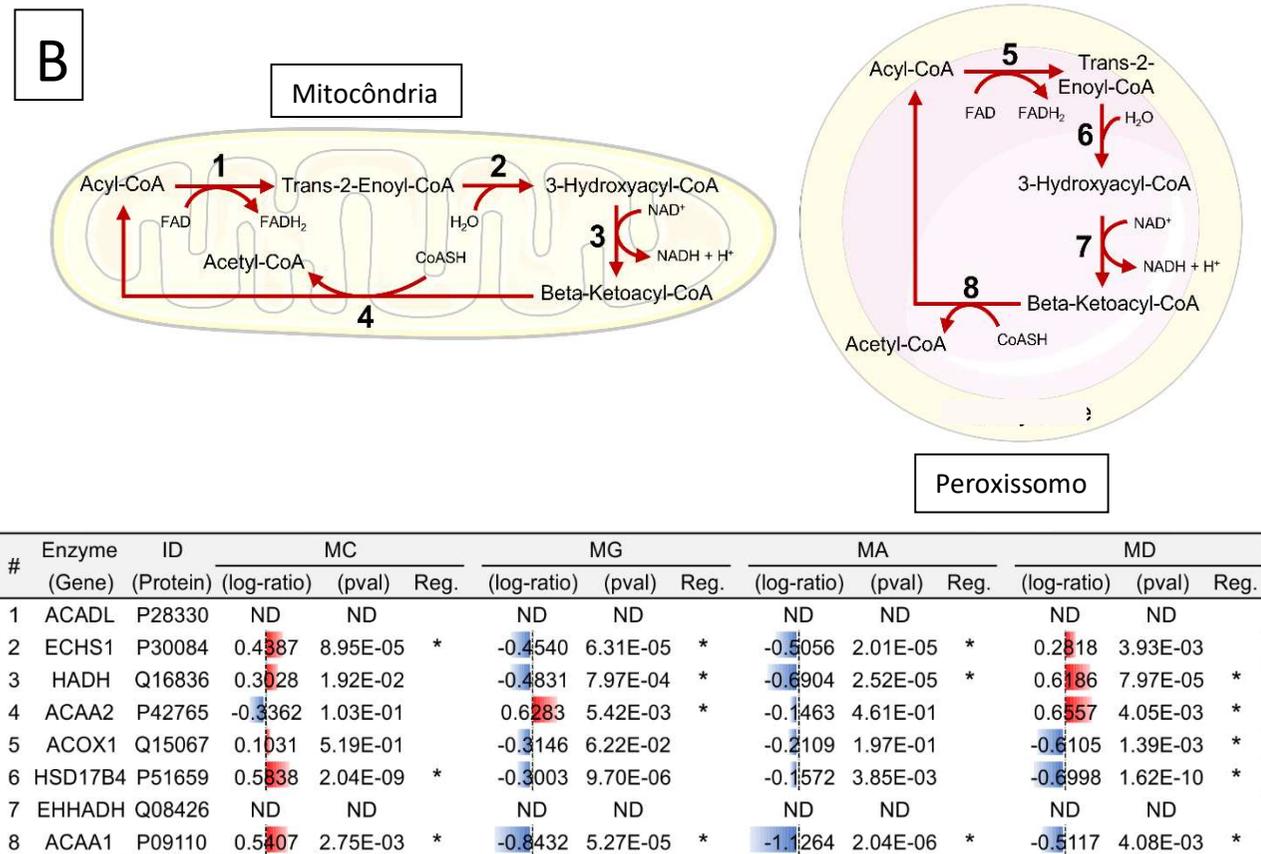
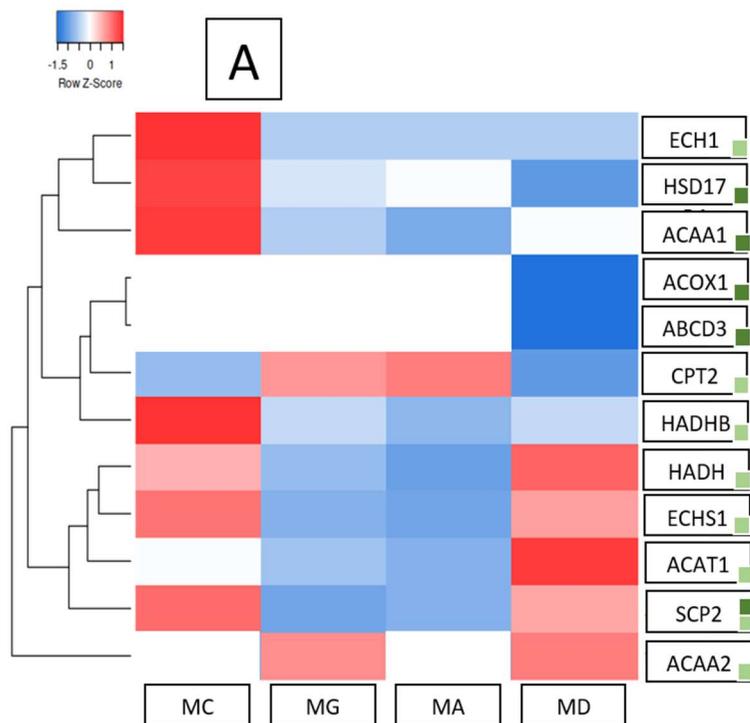


Figura 24 – Avaliação do processo de β oxidação nas linhagens celulares estudados. A – Mapa de calor (*heatmap*) das proteínas envolvidas na β oxidação encontradas nas quatro linhagens celulares. Os genes de cada proteína estão descritos lateralmente ao *heatmap*. A marcação verde-clara indica proteínas presentes em peroxissomos, já a marcação verde-escura indica proteínas presentes nas mitocôndrias. B – Representação esquemática das vias da β oxidação de lipídeos nas mitocôndrias e nos peroxissomos. Os números indicados representam as enzimas correspondente a cada reação da via metabólica e sua quantificação experimental está discriminado no quadro logo abaixo; O asterisco (*) indica as proteínas reguladas; Valor de $p < 0,05$ e $\log_2\text{ratio} < -0,38$ para regulação negativa (azul) e $> 0,38$ (vermelho) para regulação positiva; Reg: Regulado; ND: Não detectado; MC: MCF-10A; MG: MGSO-3; MA: MACL-1; MD: MDA-231-MD.

6.2.2 – Glicólise e metabolismo do piruvato.

Com relação ao metabolismo de carboidratos, as linhagens tumorais apresentaram a maioria dos processos associados a proteínas mais abundantes, principalmente nas linhagens celulares de tumor primário (MGSO-3 E MACL-1) (Figuras 25 e 26). Os dados indicam que as células com fenótipo de tumor primário apresentam uma maior tendência a metabolizar a glicose. Todas as linhagens tumorais apresentaram processos biológicos relacionados à quebra (catabolismo) da glicose, como metabolismo da glicose, metabolismo do piruvato e processos glicolíticos. Contudo, a linhagem celular MDA-231-MD, com fenótipo tumoral metastático, apresentou as proteínas associadas à processos de produção e metabolização da glicose menos abundantes (Figura 25).

O metabolismo de piruvato foi um processo biológico presente em todas as linhagens celulares tumorais, com presença de proteínas menos abundantes e positivamente. Para entendermos melhor como essas proteínas se organizavam e interagiam, elaboramos um mapa de calor (*heatmap*) com todas as proteínas reguladas nesse processo descrito pela avaliação da ontologia gênica dessas linhagens (Figura 26). Foi possível observar nitidamente que um grupo de proteínas estava regulada positivamente, quase que exclusivamente, nas linhagens celulares de tumor primário, e menos abundantes, tanto na linhagem celular de fenótipo normal com na linhagem de fenótipo metastático. Além disso, a linhagem celular MDA-231-MD apresentou poucas proteínas mais abundantes, que por sua vez também estavam menos abundantes ou não tinham regulação estatística nas demais linhagens.

Quando há comparação entre o quadro de processos biológicos e o *heatmap*, especificamente no caso do metabolismo de piruvato, pode haver uma falsa contradição. Isso acontece porque os processos biológicos avaliam todas as proteínas em conjunto, de forma macro, e essa perspectiva pode denotar um caráter de regulação mais positiva ou mais negativa, como é o caso. A análise específica da regulação de cada proteína é uma análise direta da sua atividade naquela condição fisiológica, o que possibilita distintas regulações para aquela proteína, mas não para o processo como um todo.

Das seis proteínas mais abundantes nas linhagens celulares de tumor primário, apenas uma é presente no citoplasma celular, a Lactato Desidrogenase C, gene LDHC. As demais proteínas reguladas são localizadas na mitocôndria. Das proteínas mais abundantes na linhagem tumoral com fenótipo metastático, apenas uma apresenta localização mitocondrial, a hidroxiacetilglutadiona hidrolase, gene HAGH, com as demais sendo presentes em outras regiões celulares.

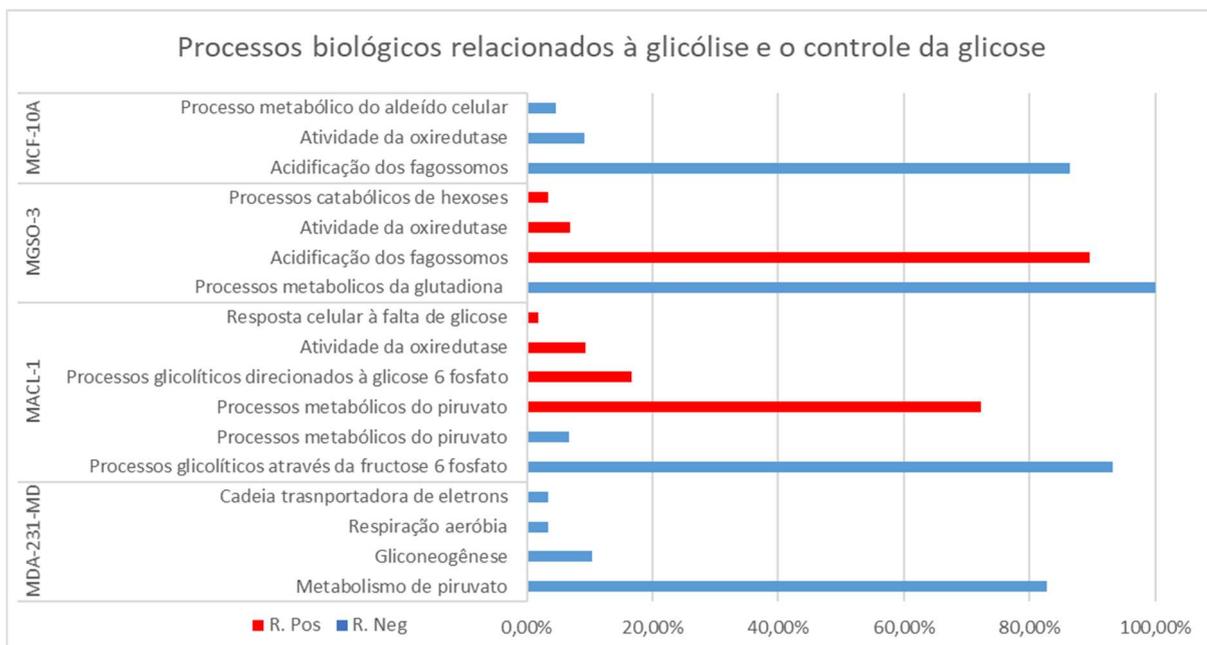


Figura 25 – Gráfico dos processos biológicos relacionados ao metabolismo energético no controle da glicose e glicólise para cada linhagem celular analisada. A porcentagem das vias metabólicas de cada linhagem celular envolvidas nos processos biológicos, descrita na representação gráfica, é dada pela sua relação com todas as proteínas mais ou menos abundante relacionadas ao processo. R.Pos: Processos biológicos com regulação positiva; R.Neg: Processos biológicos com regulação negativa

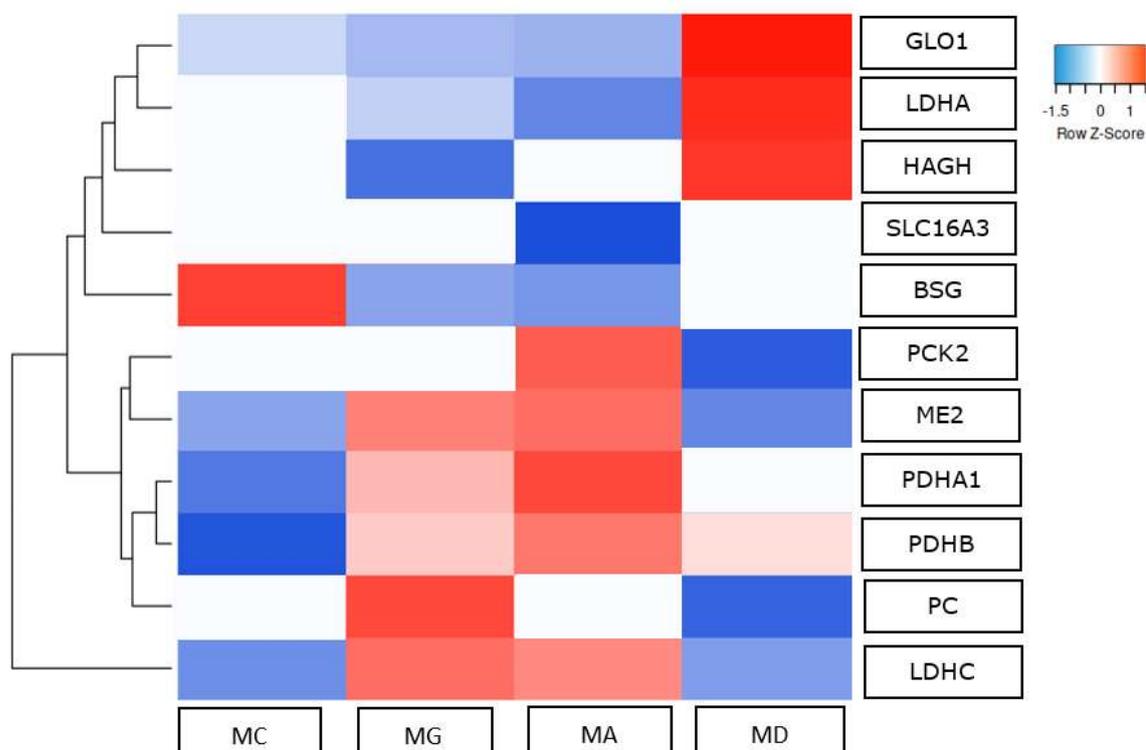


Figura 26 – Mapa de calor (*heatmap*) das proteínas identificadas neste estudo e associadas ao processo de metabolismo do piruvato. Os genes de cada proteína estão descritos no canto direito de cada linha. Azul: regulação negativa; Vermelho regulação positiva; MC: MCF-10A; MG: MGSO-3; MA: MACL-1; MD: MDA-231-MD.

Ao analisarmos o papel das proteínas mais abundantes nas linhagens celulares de tumor primário dentro do processo de metabolismo da glicose, percebemos que existe um potencial fluxo para que o piruvato percorra seu caminho normal, desde o final da glicólise até a sua translocação para a mitocôndria e o início do ciclo do ácido cítrico. As proteínas Piruvato desidrogenase subunidades α e β (genes PDHA1 e PDHB), que participam da conversão do piruvato em acetil-CoA, foram encontradas reguladas nas linhagens tumorais. Além disso, também foram encontradas proteínas mais abundantes que participam da formação de piruvato a partir do malato e do oxalacetato, respectivamente, a enzima mitocondrial málica-dependente de NAD⁺ (gene ME2) e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (gene PCK2). Também estava presente uma isoenzima da lactado desidrogenase, a LDHC, que tem uma maior tendência de produzir piruvato a partir do lactado, o que a difere das isoenzimas LDH A e B. Com isso, os dados indicam uma maior tendência das linhagens de tumor primário em utilizar o ciclo do ácido cítrico para a obtenção de energia, em comparação com as linhagens com fenótipos normal e metastático (figura 27).

Ainda sobre o processo biológico metabolismo de piruvato, as três proteínas mais abundantes apenas na linhagem de fenótipo tumoral metastático (MDA-231-MD), não apresentam uma conexão direta como as proteínas mais abundantes nas linhagens com fenótipo tumoral primário, mas possuem objetivos em comum. As enzimas lactoilglutadiona liase (gene GLO1), lactato desidrogenase tipo A (gene LDHA) e a hidroxiaçilglutadiona hidrolase (gene HAGH) participam do processo de produção de ATP na conversão de piruvato à lactato e evidenciam o perfil de metabolismo anaeróbico da linhagem celular metastática.

Os demais processos regulados positivamente, principalmente nas linhagens celulares de tumor primário, correlacionam com a via glicolítica. Como não apresentam um padrão característico entre as linhagens, seja por regulação positiva ou negativa, resolvemos avaliar a regulação de uma proteína central dentro do processo glicolítico, a gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (gene GAPDH). Como mostrado na figura 28 A, a GAPDH não apresentou uma regulação significativa para a linhagem celular MCF-10A (fenótipo normal), mas apresentou uma regulação negativa na linhagem celular MACL-1 (fenótipo de tumor primário) e regulação positiva para as linhagens MGSO-3 (fenótipo de tumor primário) e MDA-231-MD (fenótipo de tumor metastático). Corroborando esse dado, a análise de abundância dessa proteína por western blot validou o resultado proteômico (figura 28).

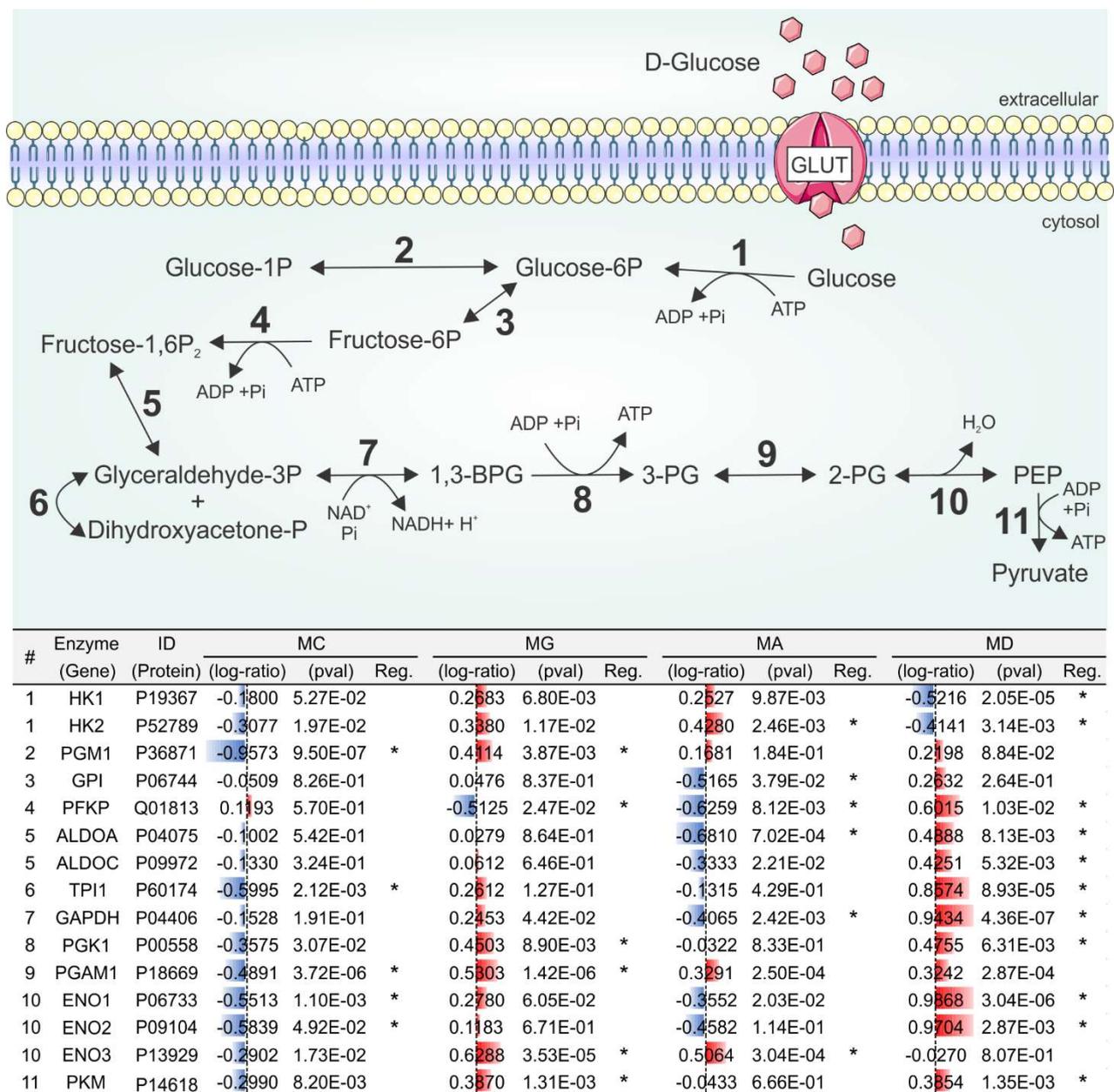


Figura 27 - Representação esquemática das vias envolvidas no metabolismo de glicose, evidenciando as proteínas associadas ao metabolismo de piruvato que foram encontradas na análise do proteoma das linhagens celulares estudadas. Os números na representação esquemática indicam as enzimas correspondente a cada reação da via metabólica e sua quantificação experimental está descrito no quadro logo abaixo; O asterisco (*) indica as proteínas reguladas; Valor de $p < 0,05$ e $\log_2\text{ratio} < -0,38$ para regulação negativa (azul) e $> 0,38$ (vermelho) para regulação positiva; Reg: Regulado; ND: Não detectado; MC: MCF-10A; MG: MGSO-3; MA: MACL-1; MD: MDA-231-MD.

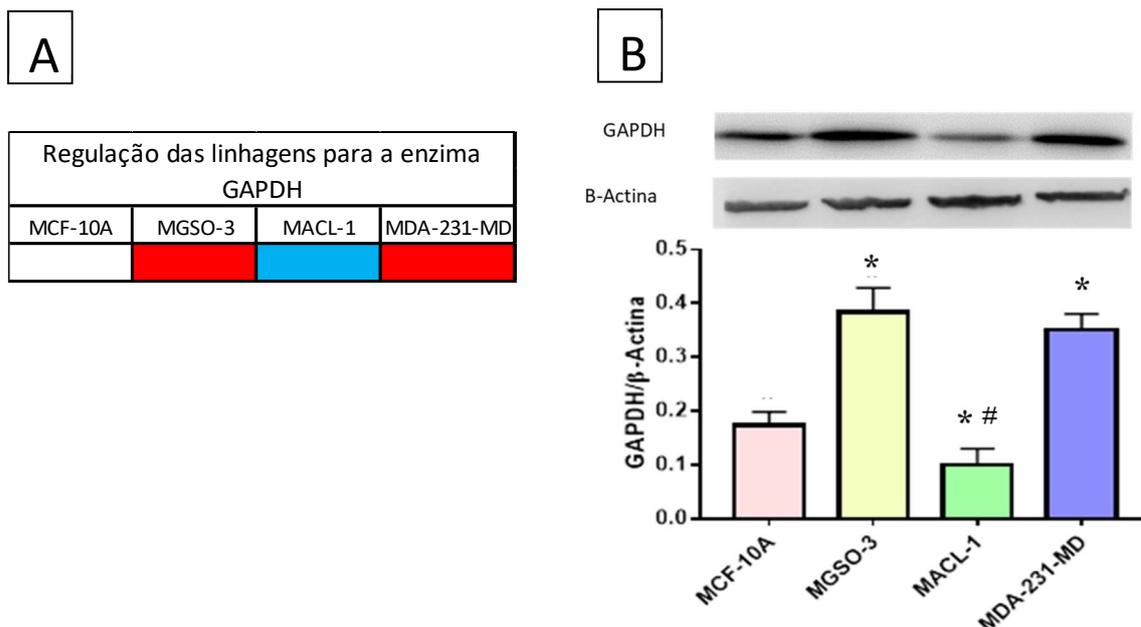


Figura 28 – Quantificação da abundância da proteína GAPDH. A: Tabela contendo o padrão de abundância da proteína GAPDH nas linhagens estudadas obtida por proteômica. Cor Branca: sem regulação; Cor Azul: regulação negativa; Cor Vermelha: regulação positiva. B: Quantificação da abundância da proteína GAPDH nas quatro linhagens celulares estudadas utilizando por western blot. Uma foto representativa do western blot foi inserida na parte superior e na parte inferior está representado o gráfico com a quantificação dos resultados (n = 3, para cada linhagem celular). Os dados estão expressos com a média ± EPM. One-Way ANOVA seguido de teste de Tukey. * $P < 0,05$ vs. MCF-10A. # $P < 0,05$ vs. MGSO-3.

6.2.3 – Ciclo de Krebs e Fosforilação Oxidativa

Seguindo o fluxo do metabolismo glicídico, as próximas etapas, após a formação do piruvato, são o ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa (Figura 29). Para compreendermos, de forma mais clara, como tais rotas metabólicas estavam reguladas, foi elaborado um mapa de calor (*heatmap*) com as proteínas reguladas e associadas ao ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa. Foi possível observar perfis distintos de regulação entre as quatro linhagens estudadas. As linhagens celulares MGSO-3 e MACL-1, com fenótipos de tumor primário, apresentaram um perfil de regulação proteica bem similar e distintas das demais células (Figura 30). Com o objetivo de compreendermos as funções dessas proteínas, elas foram identificadas e estudadas de acordo com as funções que exercem nessa etapa aeróbica do metabolismo.

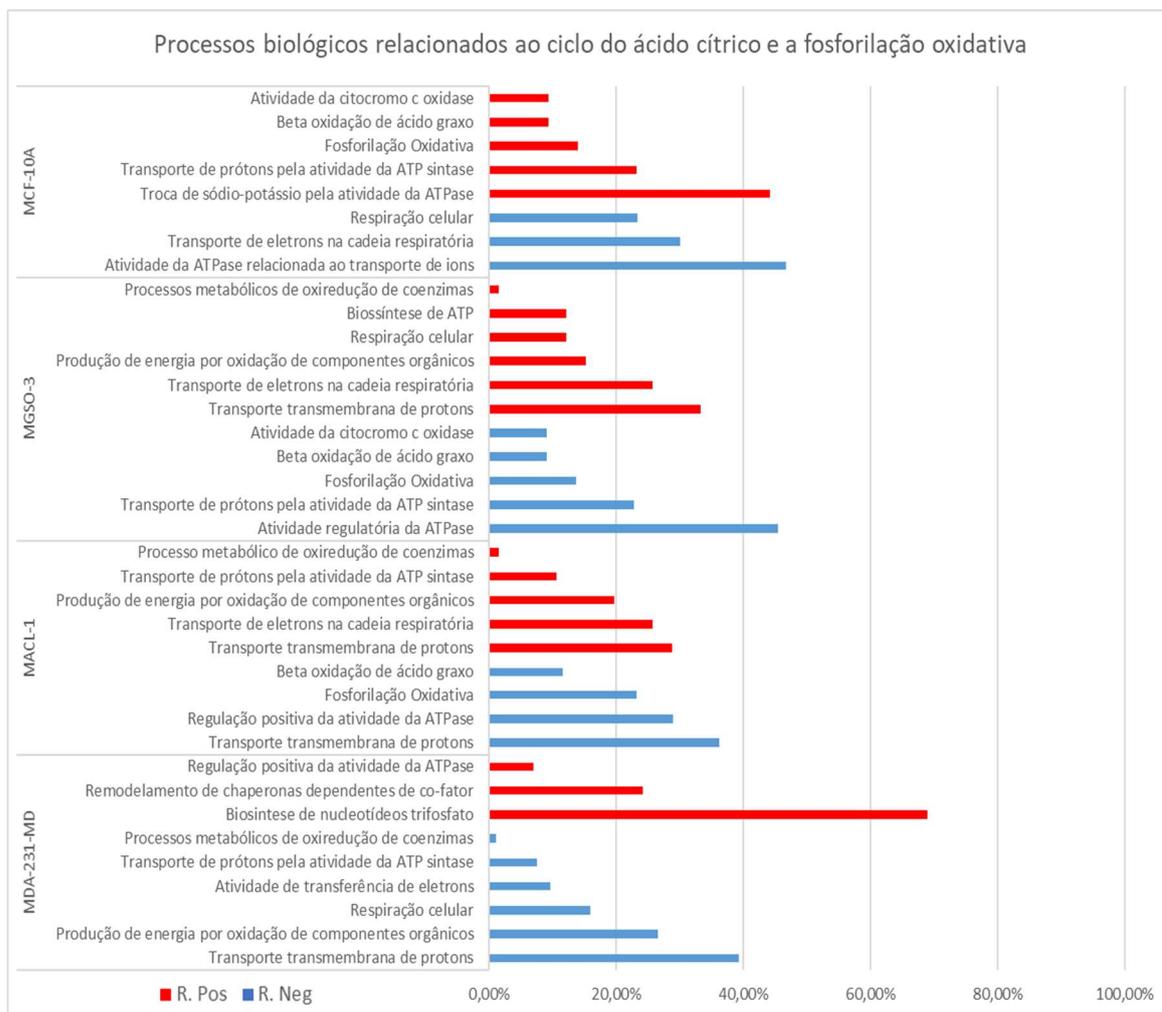


Figura 29 – Percentual de proteínas reguladas e associadas ao Ciclo de Krebs e a Fosforilação Oxidativa para cada linhagem celular analisada. A porcentagem das vias metabólicas de cada linhagem celular envolvidas nos processos biológicos, descrita na representação gráfica, é dada pela sua relação com todas as proteínas mais ou menos abundante relacionadas ao processo. R. Pos: Percentual de proteínas com regulação positiva; R. Neg: Percentual de proteínas com regulação negativa.

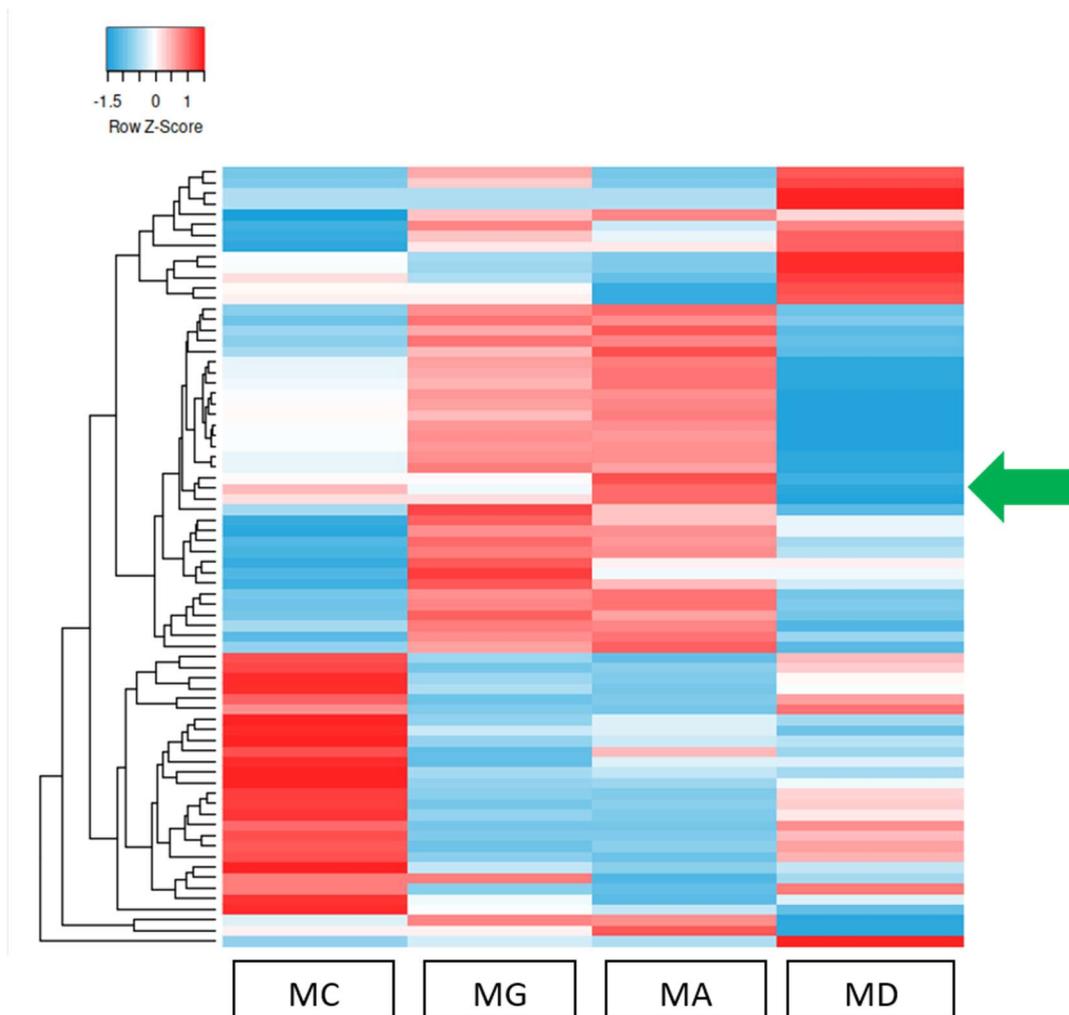


Figura 30 – Mapa de calor (*heatmap*) das proteínas reguladas e associadas ao Ciclo de Krebs e a Fosforilação Oxidativa nas quatro linhagens celulares experimentais. As variações de intensidade da cor vermelha representam proteínas mais abundantes e as variações de intensidade da cor azul representam as proteínas menos abundantes. A seta verde indica a região do *heatmap* com maior homogeneidade de proteínas menos abundantes ou positivamente nas quatro linhagens celulares estudadas.

As proteínas reguladas de forma distinta nas linhagens celulares de tumor primário, em comparação à linhagem celular de fenótipo normal e à linhagem celular de fenótipo tumoral metastático, indicadas pela seta verde na Figura 30, foram selecionadas para desenvolvermos uma rede de interação de proteínas, utilizando o algoritmo *STRING* (<https://string-db.org>). Observando a figura 31, percebemos a presença de 3 grupos distintos de proteínas (*clusters*), que foram denominados grupos 1 a 3.

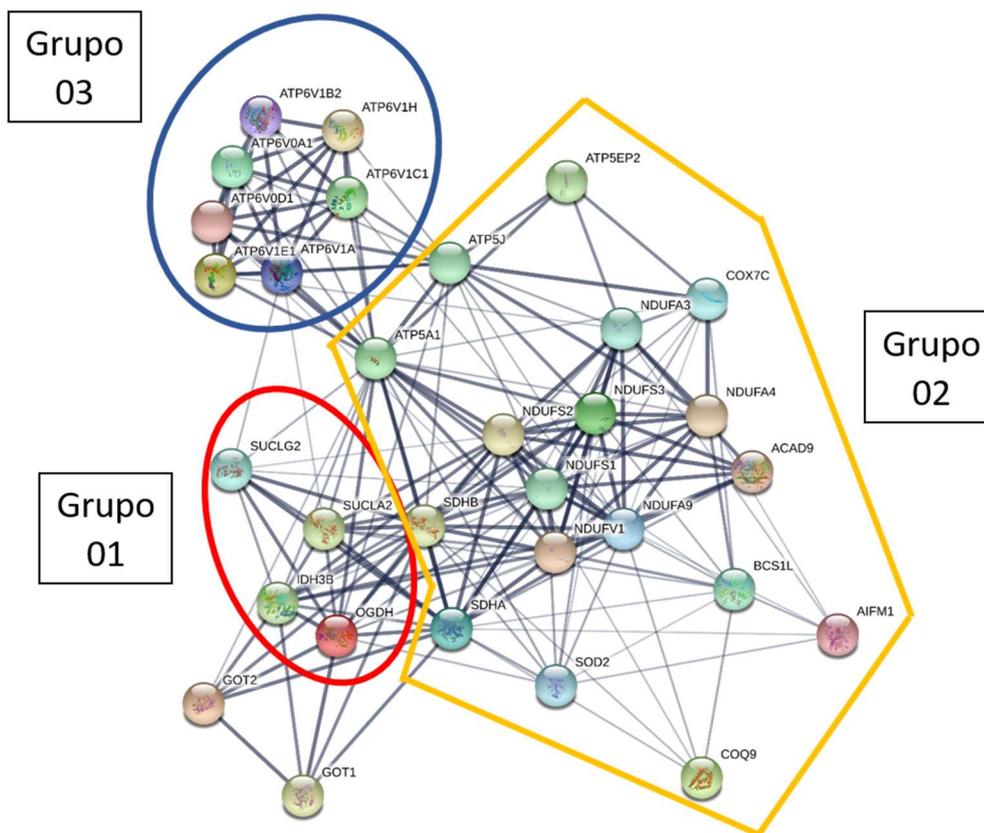
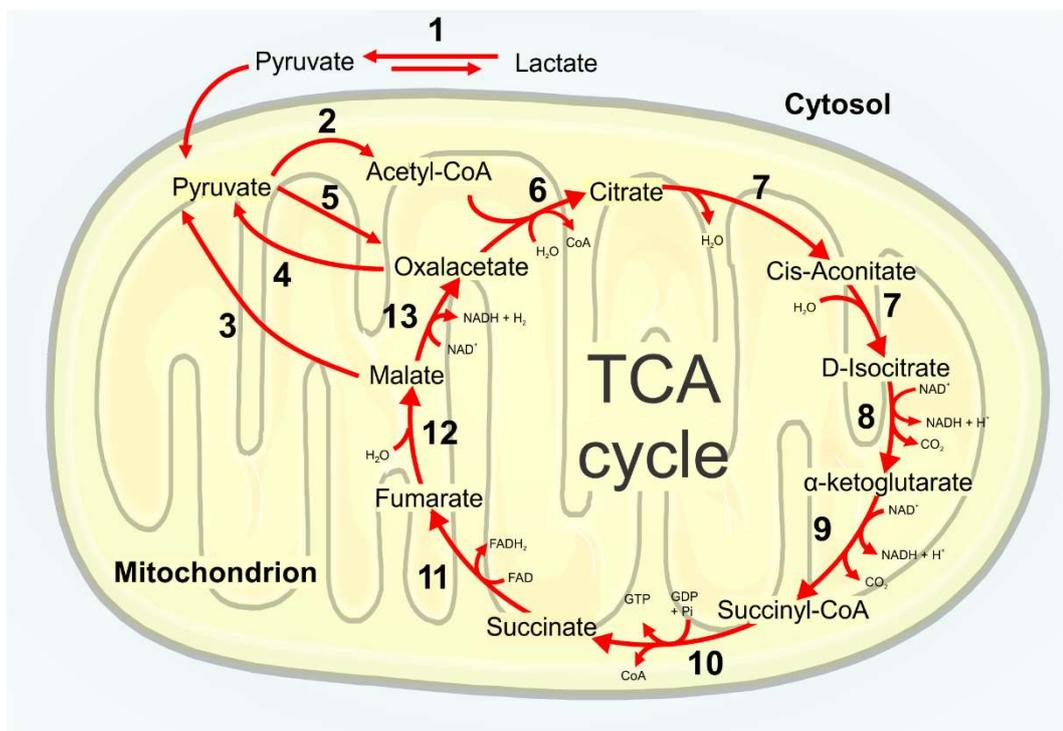


Figura 31 – Rede de interação de proteínas presente nas quatro linhagens celulares estudadas. A espessura da linha de ligação entre as proteínas indica a força de interação por associação funcional e física entre elas. As proteínas foram divididas em três grupos distintos de acordo com a função e localização celular que possuem.

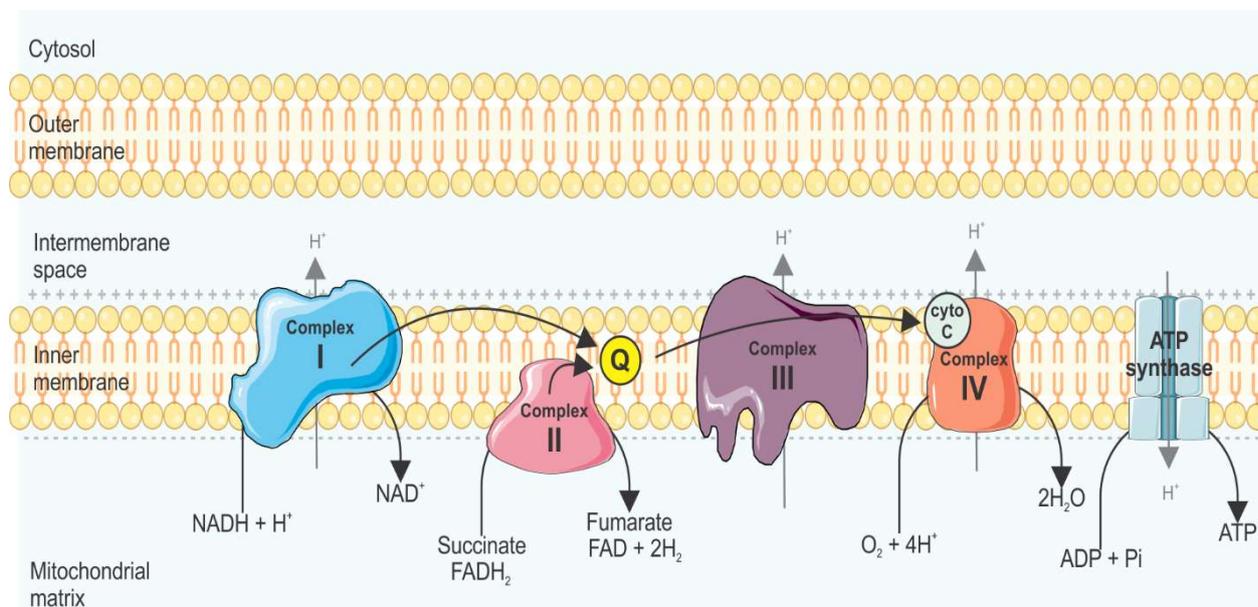
As proteínas presentes no grupo 1 são associadas ao ciclo do ácido cítrico. As quatro proteínas presentes nesse grupo têm função enzimática e participam do processo de oxidação dos componentes do ciclo. Essas proteínas participam do processo de transformação do isocitrato até o succinato (Figura 32). Nesse processo, além da produção de NADH, para a produção de ATP na fosforilação oxidativa, há também a produção de GTP, composto que também pode ser usado nos processos de gasto de energia na célula. Com isso, podemos sugerir que as linhagens celulares com fenótipo de tumor primário utilizam essa maquinaria para a produção de energia. Tal alternativa de obtenção de energia pode não ser tão utilizada tanto pela linhagem celular com fenótipo normal quanto pela linhagem com fenótipo tumoral metastático (Figura 32).



#	Enzyme (Gene)	ID (Protein)	MC			MG			MA			MD		
			(log-ratio)	(pval)	Reg.									
1	LDHC	P07864	-1.5448	3.27E-08	*	0.9326	1.60E-05	*	0.6378	3.48E-04	*	-1.3961	1.23E-07	*
2	PDHA1	P08559	-0.2136	2.10E-03		0.2672	3.21E-04		0.4358	4.44E-07	*	-0.0266	6.50E-01	
2	PDHB	P11177	-0.2194	1.35E-03		0.1716	7.79E-03		0.2930	9.97E-05		0.1383	2.58E-02	
3	ME2	P23368	-0.4835	2.66E-07	*	0.4243	1.35E-06	*	0.4988	1.79E-07	*	-0.6131	1.18E-08	*
4	PCK2	Q16822	-0.1755	1.59E-01		0.2523	5.03E-02		0.5112	6.16E-04	*	-0.7991	6.61E-06	*
5	PC	P11498	0.0342	6.81E-01		0.2775	3.92E-03		0.0940	2.67E-01		-0.3584	5.20E-04	
6	CS	O75390	0.4609	2.02E-04	*	-0.0398	6.80E-01		-0.1022	2.97E-01		-0.4645	1.88E-04	*
7	ACO2	Q99798	ND	ND										
8	IDH2	P48735	-0.5053	7.66E-05	*	0.3413	2.46E-03		0.2364	8.12E-03		-1.4634	1.14E-10	*
9	OGDH	Q02218	-0.1876	1.84E-02		0.1939	1.55E-02		0.3698	1.06E-04		-0.3267	3.45E-04	
10	SUCLA2	Q9P2R7	0.0170	5.34E-01		0.2726	3.78E-08		0.3169	4.98E-09		-0.5288	3.61E-12	*
10	SUCLG2	Q96199	-0.5110	5.49E-07	*	0.4891	9.42E-07	*	0.5962	7.66E-08	*	-0.5228	4.12E-07	*
11	SDHB	P21912	-0.2433	4.65E-04		0.2901	8.76E-05		0.2404	5.17E-04		-0.1999	2.33E-03	
12	FH	P07954	ND	ND										
13	MDH2	P40926	ND	ND										

Figura 32 – Representação esquemática do ciclo do ácido cítrico. Os números na representação esquemática indicam as enzimas correspondente a cada reação da via metabólica e sua quantificação experimental está discriminado no quadro logo abaixo; O asterisco (*) indica as proteínas reguladas; Valor de $p < 0,05$ e $\log_2\text{ratio} < -0,38$ para regulação negativa (azul) e $> 0,38$ (vermelho) para regulação positiva; Reg: Regulado; ND: Não detectado; MC: MCF-10A; MG: MGSO-3; MA: MACL-1; MD: MDA-231-MD.

Já o grupo 2 (figura 31) representa proteínas reguladas associadas a fosforilação oxidativa. Mais uma vez, esse dado sugere que as linhagens celulares de tumor primário utilizam a maquinaria de metabolismo aeróbio para a produção de energia. A linhagem MCF-10A foi a linhagem celular que menos apresentou regulação de proteínas nesse processo, e, quando estavam, apresentavam regulação negativa. Para as linhagens celulares MGSO-3 e MACL-1, a grande maioria das proteínas apresentou regulação positiva, sugerindo uma maior utilização desse processo na obtenção de energia. Já a linhagem celular MDA-231-MD apresentou a maioria das proteínas menos abundantes, o que pode indicar uma menor utilização das vias aeróbicas para a obtenção de energia celular (Figura 33).



#	Enzyme (Gene)	ID (Protein)	MC			MG			MA			MD		
			(log-ratio)	(pval)	Reg.									
Complex I	ACAD9	Q9H845	0.1577	1.73E-01		0.1591	1.46E-01		0.2115	4.47E-02		-0.5164	2.94E-04	*
Complex I	NDUFA3	O95167	-0.3460	4.79E-03	*	0.4030	2.75E-02	*	0.3990	2.88E-02	*	-0.2035	2.37E-01	
Complex I	NDUFA9	Q16795	-0.1161	2.44E-01		0.3253	3.97E-03		0.4132	6.12E-04	*	-0.4931	1.18E-04	*
Complex I	NDUFS1	P28331	-0.1573	5.59E-03		0.2718	5.23E-05		0.3490	3.23E-06		-0.2120	5.64E-04	
Complex I	NDUFS2	O75306	-0.1290	1.80E-01		0.3024	4.92E-03		0.2952	5.77E-03		-0.5150	4.97E-05	*
Complex I	NDUFS3	O75489	-0.1119	8.79E-02		0.2626	6.55E-04		0.2097	3.79E-03		-0.3106	1.40E-04	
Complex I	NDUFV1	P49821	-0.0790	4.71E-01		0.2384	4.13E-02		0.4309	1.08E-03	*	-0.5626	9.47E-05	*
Complex II	SDHA	P31040	-0.2584	4.14E-03		0.2171	1.25E-02		0.1406	8.60E-02		-0.3866	1.43E-04	*
Complex II	SDHB	P21912	-0.2433	4.65E-04		0.2901	8.76E-05		0.2404	5.17E-04		-0.1999	2.33E-03	
Ubiquinone (Q)	COQ9	O75208	0.0158	8.67E-01		0.2647	1.21E-02		0.3901	7.63E-04	*	-0.4440	2.40E-04	*
Complex III	UQCRC1	P31930	0.5319	8.84E-08	*	-0.3599	2.81E-05		-0.1876	7.52E-03		-0.2496	9.34E-04	
Cyto C	COX7C	P15954	-0.1566	1.51E-01		0.2217	4.90E-02		0.2358	3.78E-02		-0.3139	8.41E-03	
Complex IV	NDUFA4	O00483	-0.7847	2.15E-09	*	0.6275	4.39E-08	*	0.7597	3.35E-09	*	-0.4419	3.56E-06	*
ATP synthase	ATP5F1A	P25705	-0.0669	9.48E-02		0.1775	2.70E-04		0.3108	5.64E-07		-0.0918	2.73E-02	
ATP synthase	ATP5F1EP2	Q5VTU8	-0.0801	5.54E-01		0.2367	4.68E-02		0.3336	2.35E-02		-0.5658	6.63E-04	*
ATP synthase	ATP5MC1	P05496	-0.0022	9.89E-01		0.0050	9.74E-01		1.0046	6.30E-06	*	-1.4629	6.02E-08	*
ATP synthase	ATP5ME	P56385	0.6323	1.94E-05	*	-0.6363	1.81E-05	*	-0.5063	1.91E-04	*	0.3412	4.80E-03	
ATP synthase	ATP5MF	P56134	0.4305	3.27E-03	*	0.0938	4.59E-01		0.0437	7.28E-01		-0.4136	4.32E-03	*
ATP synthase	ATP5PF	P18859	0.6085	3.79E-03	*	-0.8094	3.83E-04	*	-0.8671	2.02E-04	*	0.7710	5.89E-04	*
ATP synthase	ATP5PO	P48047	0.3870	1.55E-03	*	-0.4235	7.41E-04	*	-0.4087	1.00E-03	*	0.2736	1.56E-02	

Figura 33 – Representação esquemática da fosforilação oxidativa. A descrição das proteínas relacionadas a cada complexo da via metabólica e sua quantificação experimental estão discriminado no quadro abaixo da representação esquemática. A cerquilha (#) indica o complexo que cada enzima pertence; O asterisco (*) indica as proteínas reguladas; Valor de $p < 0,05$ e $\log_2\text{ratio} < -0,38$ para regulação negativa (azul) e $> 0,38$ (vermelho) para regulação positiva; Reg: Regulado; MC: MCF-10A; MG: MGSO-3; MA: MACL-1; MD: MDA-231-MD.

O grupo 3 (figura 31) é composto por proteínas denominadas V-ATPases. Essas proteínas estão presentes em diversas membranas celulares e desempenham vários papéis na homeostase celular, dentre eles a acidificação de vesículas que ocorre pela troca de prótons entre compartimentos vasculares distintos. No metabolismo glicídico, essas ATPases podem participar de vários processos, como a liberação de insulina e no processo de reciclagem de vesículas do transportador de glicose GLUT, por exemplo (STRANSKY, 2016). No câncer de mama, já há descrito na literatura a importância das ATPases em vários processos tumorigênicos importantes, como proliferação e capacidade de invasão celular (COLLINS, 2018).

6.2.4 – Processos biológicos relacionados a alterações mitocondriais

Como percebemos uma grande alteração do metabolismo energético nas linhagens estudadas, resolvemos verificar se algum tipo de alteração relacionado às mitocôndrias estaria presente, do ponto de vista proteômico. Vários processos biológicos estavam regulados de formas distintas, quando avaliamos as quatro linhagens celulares estudadas.

Alguns padrões de regulação das proteínas associada a tais processos biológicos foram encontrados nas linhagens celulares estudadas. Com relação ao processo de transcrição mitocondrial, as linhagens celulares MCF-10A e MACL-1 apresentaram regulação positiva, a linhagem celular MGSO-3 apresentou regulação negativa e a linhagem celular MDA-231-MD apresentou proteínas com regulação positiva ou negativa. Já as proteínas do termo GO potencial de membrana estavam menos abundantes nas linhagens celulares MCF-10A e MACL-1, e positivamente na linhagem MGSO-3 (Figura 34).

Vários processos biológicos relacionados à organização estrutural da mitocôndria e a alteração de proteínas na sua constituição também estavam alterados em uma ou mais linhagens celulares. Porém, vale ressaltar que proteínas associadas à processos apoptóticos foram encontradas reguladas, sendo encontradas menos abundantes na linhagem celular com fenótipo normal (MCF-10A), positivamente nas linhagens celulares com fenótipo de tumor primário (MGSO-3 e MACL-1) e com regulação negativa e positiva na linhagem celular com fenótipo de tumor metastático (MDA-231-MD). Para avaliarmos melhor o padrão de regulação das proteínas associadas a apoptose, elaboramos um mapa de calor (*heatmap*) (Figura 35).

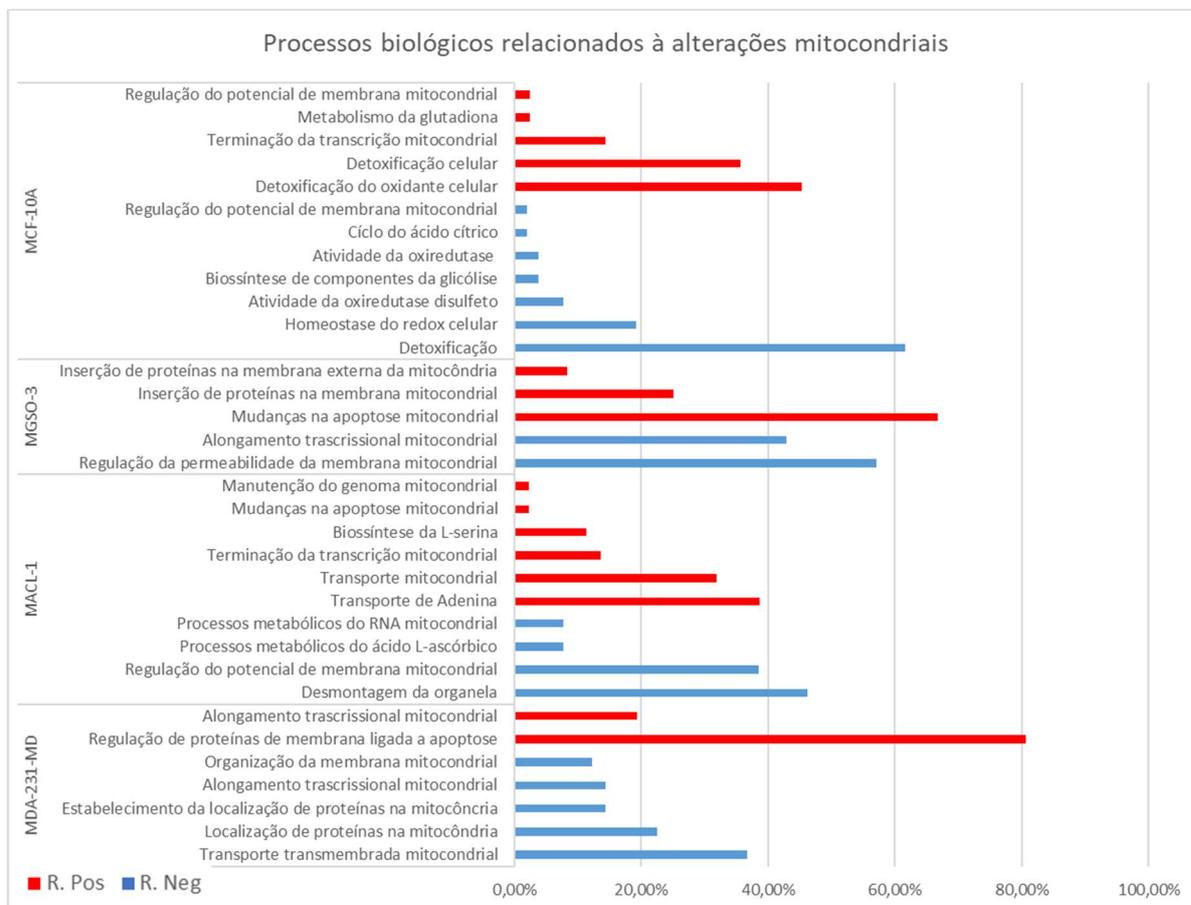


Figura 34 – Percentual de proteínas reguladas e associadas a processos mitocondriais para cada linhagem celular analisada. A porcentagem das vias metabólicas de cada linhagem celular envolvidas nos processos biológicos, descrita na representação gráfica, é dada pela sua relação com todas as proteínas mais ou menos abundante relacionadas ao processo.. R. Pos: Percentual de proteínas com regulação positiva; R. Neg: Percentual de proteínas com regulação negativa.

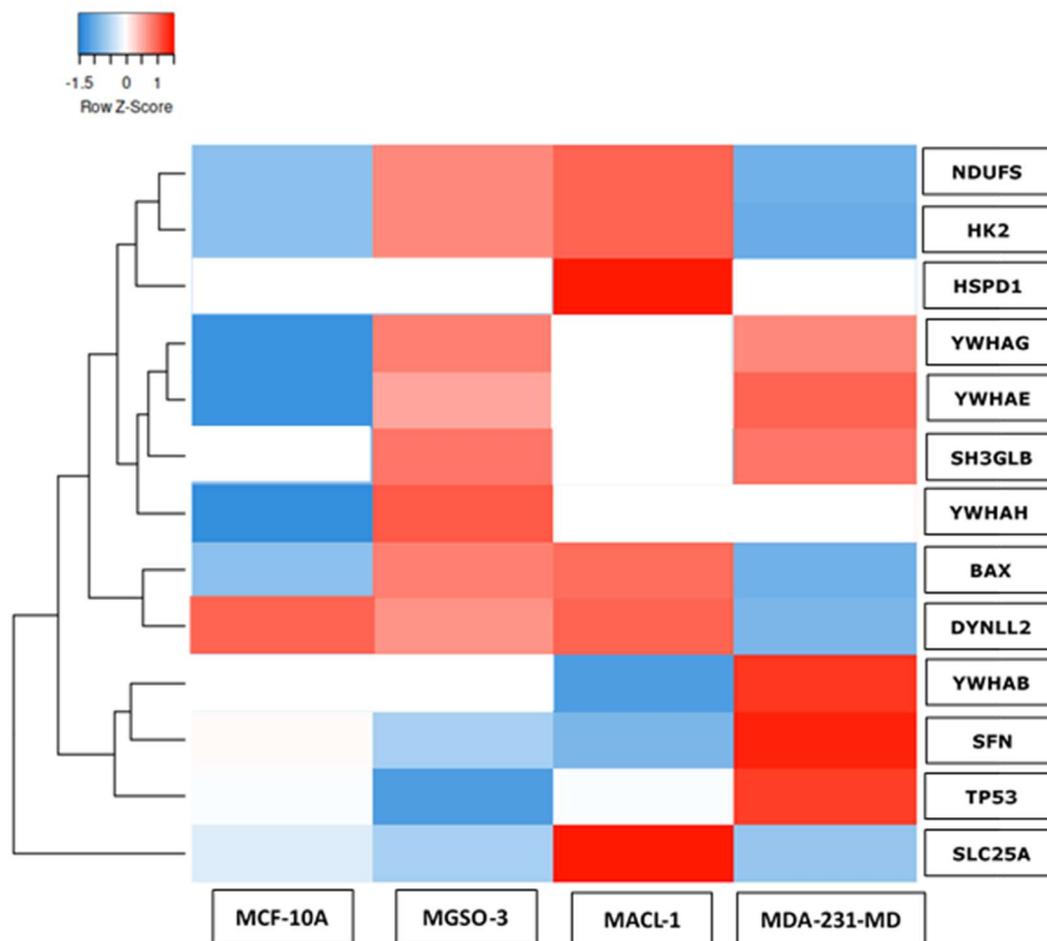


Figura 35 – Gráfico de calor (*heatmap*) das proteínas relacionadas à processos apoptóticos mitocondriais nas quatro linhagens celulares experimentais avaliadas. As variações de intensidade da cor vermelha representam proteínas mais abundantes e as variações de intensidade da cor azul representa as proteínas menos abundantes.

Dentre as proteínas reguladas, duas famílias de proteínas são muito importantes na via de sinalização apoptótica envolvendo a mitocôndria: a família de proteínas 14-3-3 e a família de proteínas Bcl-2 (Figura 36).

A Bax é uma proteína pró-apoptótica codificada pelo gene *Bax* frente a processos oxidativos celulares e pertencente à família das proteínas Bcl-2, que participam de diversas vias de sinalização mitocondriais associadas a diversas patologias, incluindo o CM (MARTINEZ-ARRIBAS, 2008). A regulação positiva de Bax tem a capacidade de inibir proteínas anti-apoptóticas mitocondriais, como a Bcl-2, acelerando a morte celular (PLUTA, 2011). A proteína Bax, quando produzida, tem a capacidade de induzir o surgimento de canais na membrana externa da mitocôndria, chamados de MOMP (da sigla em inglês *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*), alterando a permeabilidade e o potencial de ação das membranas mitocondriais e possibilitando a liberação, para o citosol, de citocromo C, que, por sua vez, tem a capacidade de ativar caspases e induzir o processo apoptótico (SARDAR, 2013).

Já as proteínas 14-3-3 são altamente conservadas em eucariotos e funcionam como adaptadores multifuncionais em diversos processos celulares, tendo a capacidade de ativar ou inibir vias de sinalização como a da insulina, mTOR, AMPK, PKA, além de estar presente em vias mais complexas, como a de proliferação e diferenciação celular, citoesqueleto, metabolismo energético, na biossíntese de catecolaminas, em processos de autofagia e da apoptose (SUZUKI, 2000).

Especificamente nas quatro linhagens celulares estudadas, nossos dados indicam que a Bax e a proteína 14-3-3 participam de um processo de auto-regulação, onde Bax e outras proteínas da família Bcl-2 tem papel apoptótico e a proteína 14-3-3 participa como molécula anti-apoptótica. A Bax inativada pode ser translocada para dentro da mitocôndria por vários estímulos, onde é ativada e induz a formação das MOMP's, que liberam para o citosol o citocromo C, também conhecido com Apaf-1 (da sigla em inglês, *Apoptotic protease activating factor 1*). A Apaf-1, por sua vez, ativa uma cascata de caspases que levam ao processo de apoptose (SARDAR, 2013). A proteína Bax foi encontrada regulada negativamente nas linhagens celulares MCF-10A e MDA-231-MD, e regulada positivamente nas linhagens celulares MGSO-3 e MACL-1, sugerindo que as células com fenótipo de tumor primário podem ser mais susceptíveis ao processo apoptótico, por uma via mitocondrial, talvez como um processo normal de controle de proliferação, enquanto a linhagem com fenótipo tumoral metastático possui um perfil de proliferação mais agressivo, como consequência do aumento da atividade anti-apoptótica.

Já a proteína 14-3-3 tem duas vias de ação anti-apoptóticas. A primeira relaciona-se com proteína 14-3-3 σ , que tem a capacidade de inibir a proteína Bax no citosol e, assim, evitar o processo de indução apoptótica (FAN, 2019). Especificamente nas linhagens celulares estudadas, essa proteína foi encontrada regulada negativamente nas linhagens celulares de fenótipo tumoral primário e regulada positivamente na linhagem celular de fenótipo tumoral metastático. Ou seja, mais uma vez, os dados proteômicos das linhagens MGSO-3 e MACL-1 indicam uma regulação mais pró-apoptótica enquanto a linhagem MDA-231-MD um efeito basal mais anti-apoptótico.

A segunda via anti-apoptótica é relacionada a proteína 14-3-3 ϵ , que tem a capacidade de se ligar e sequestrar a proteína BAD, evitando a apoptose (PLUTA, 2011). A proteína Bcl-2/xL é uma proteína anti-apoptótica que divide lugar com a proteína pró-apoptótica BAD no interior da mitocôndria. A proteína Bcl-2/xL pode ser ativada para inibir a apoptose, porém, quando ligada à proteína BAD, assume papel pró-apoptótico. Por ação de quinases

mitocondriais, a proteína BAD, já ligada à Bcl-2/xL, pode ser fosforilada, e ao chegarem ao citosol, é sequestrada do complexo Bcl-2/xL-Bad pela proteína 14-3-3ε, provocando a sua separação e, conseqüentemente, o bloqueio da via apoptótica. O complexo formado 14-3-3ε-BAD fosforilada pode sofrer ação de fosfatases no citosol, o que leva à quebra desse segundo complexo e o turnover dessas proteínas, com a BAD voltando para o interior da mitocôndria e a 14-3-3ε podendo realizar outro sequestro de BAD fosforilada no citosol (FAN, 2019). No nosso estudo, identificamos a proteína 14-3-3ε regulada positivamente nas linhagens MGSO-3 e MDA-231-MD, o que nos leva a crer que essa via apoptótica não está ativa, pelo menos para a maioria das linhagens celulares tumorais estudadas, o que também pode indica o efeito anti-apoptótico da proteína 14-3-3ε (Figura 36).

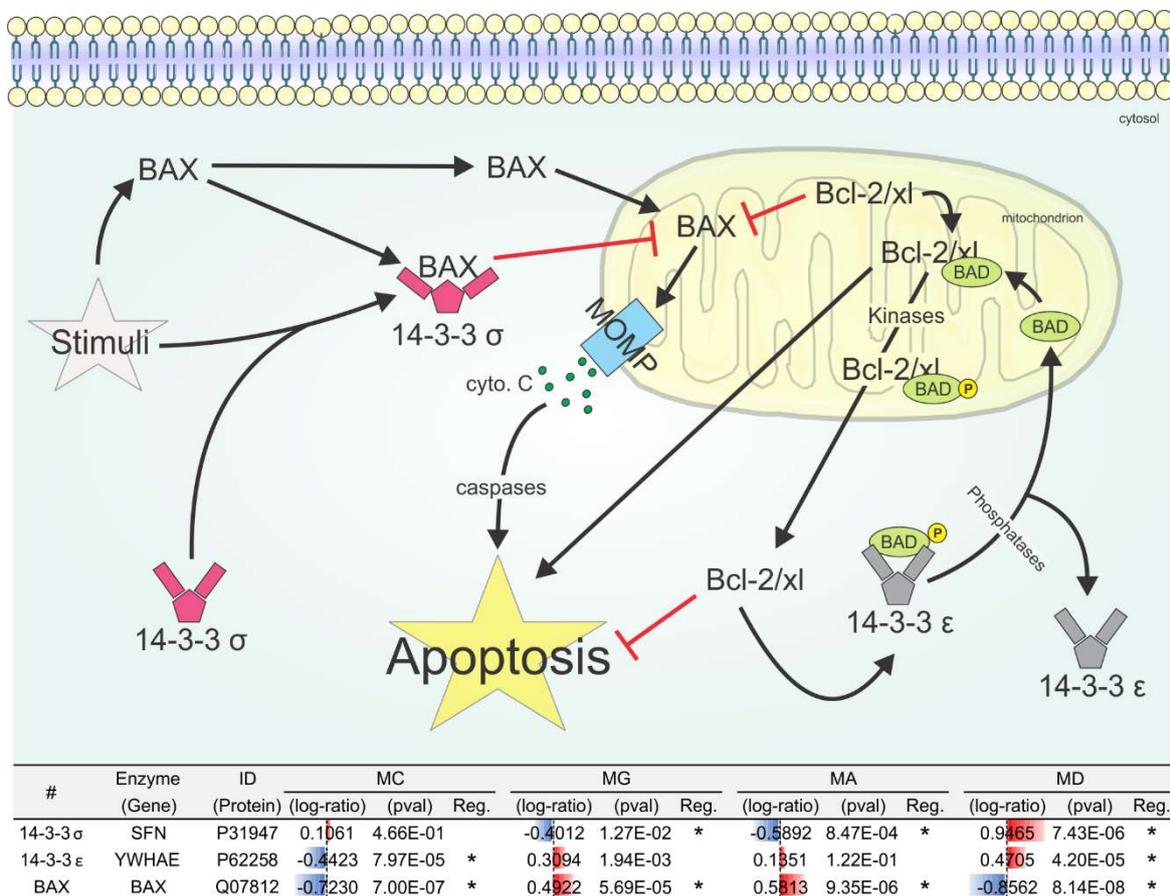


Figura 36 – Representação esquemática da via de ativação apoptótica mitocondrial através das proteínas Bax e 14-3-3. As setas pretas indicam as proteínas discriminadas na base das setas. As setas vermelhas indicam a via de inibição das proteínas na base das setas. A descrição das proteínas reguladas encontradas nessa via e sua quantificação experimental estão discriminado no quadro abaixo da representação esquemática. A cerquilha (#) indica a proteína em específico; O asterisco (*) indica as proteínas reguladas; Valor de $p < 0,05$ e $\log_2\text{ratio} < -0,38$ para regulação negativa (azul) e $> 0,38$ (vermelho) para regulação positiva; Reg: Regulado; MC: MCF-10A; MG: MGSO-3; MA: MACL-1; MD: MDA-231-MD.

Todos esses processos apresentados até aqui indicam uma grande alteração na funcionalidade mitocondrial. Para avaliarmos a densidade mitocondrial, as linhagens estudadas passaram por uma avaliação de citometria de fluxo com marcação por MITOTRACKER, um marcador fluorescente que se liga a mitocôndrias vivas, independente do seu potencial de membrana. Com esse marcador, quanto maior a fluorescência, maior será a sua ligação a membranas mitocondriais, sendo possível estimar a densidade dessa organela (Figura 37).

A maior intensidade média de fluorescência do marcador foi encontrada na linhagem celular MDA-231-MD, seguida pela linhagem celular MCF-10A e quase o dobro da fluorescência apresentada pelas linhagens MGSO-3 e MACL-1, indicando que as linhagens celulares com fenótipo de tumor primário teriam uma menor densidade de mitocôndrias, quando comparadas com as linhagens de fenótipo normal e de tumoral metastático (Figura 37). Além disso, essa diferença de densidade de mitocôndrias nas linhagens celulares estudadas, além de contribuir funcionalmente com os processos biológicos apresentados até aqui, inclusive com as vias apoptóticas das linhagens tumorais.

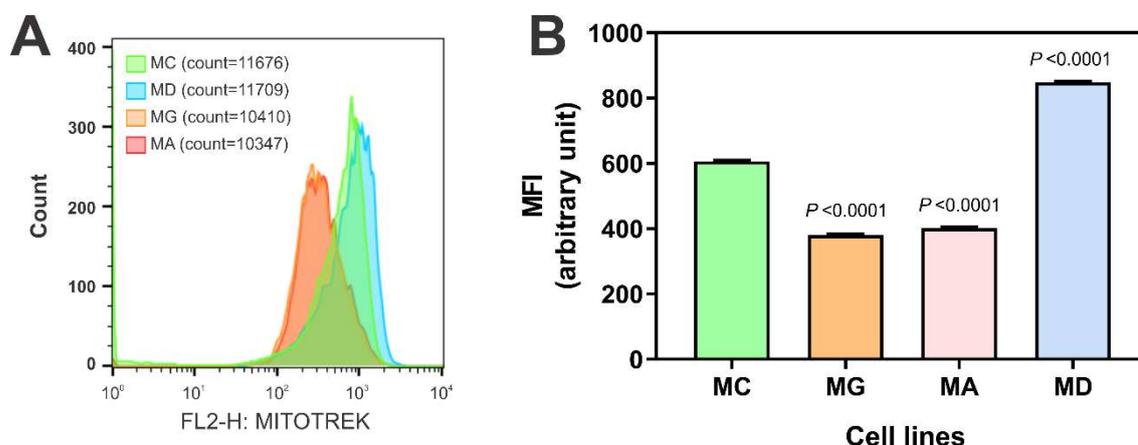


Figura 37 – Análise em citometria de fluxo das quatro linhagens celulares estudadas após marcação com MITOTRACKER. A – Fluorescência (eixo x) e contagem mínima de eventos por análise (eixo y). B – Representação gráfica do índice médio de fluorescência (MFI, sigla em inglês). Os dados estão expressos com a média \pm EPM. * $p < 0,001$ em relação a MCF10-A. Usado ANOVA seguido de teste de Tukey (vs MC). MC: MCF-10A; MG: MGSO-3; MA: MACL-1; MD: MDA-231-MD.

6.3 – Alterações relacionadas ao Ciclo Celular

A avaliação do proteoma das quatro linhagens celulares também demonstrou a potencial participação de vários processos biológicos relacionados a regulação do ciclo celular. Estudando as diferenças entre as linhagens com perfis fenotípicos tumorais distintos não e

tumorais, era de se esperar que algumas alterações relacionadas a proliferação celular estariam presentes.

Para uma primeira análise, de forma mais ampla, plotamos as proteínas reguladas e relacionadas ao ciclo celular em um mapa de calor (*heatmap*) para visualizar o perfil de regulação das mesmas nas diferentes linhagens estudadas. Verificamos que as linhagens com perfil tumoral, sejam elas com fenótipo de tumor primário ou metastático, apresentavam uma maior quantidade de proteínas mais abundantes em comparação à linhagem celular com fenótipo normal (Figura 38). Além disso, foi possível verificar que o controle do ciclo celular, entre as células tumorais, acontecer de forma distinta, já que as proteínas das linhagens celulares com fenótipo de tumor primário, MGSO-3 e MACL-1, possuíam um padrão semelhante de regulação, o que ocorre não ocorreu na linhagem com fenótipo de tumoral metastático, MDA-231-MD.

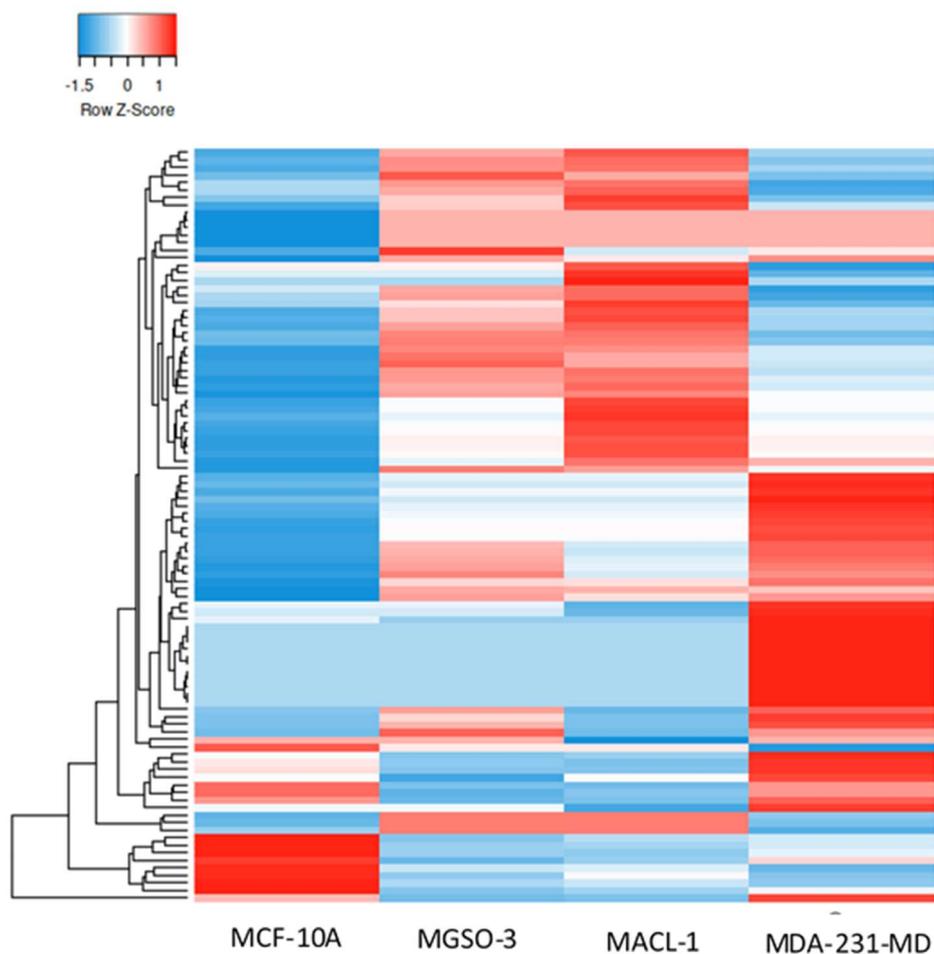


Figura 38 – Mapa de calor (*heatmap*) das proteínas reguladas e associadas à regulação do Ciclo Celular nas quatro linhagens celulares experimentais avaliadas. As variações de intensidade da cor vermelha representam proteínas mais abundantes e as variações de intensidade da cor azul representam as proteínas menos abundantes.

Posteriormente, avaliamos quais processos biológicos eram associados às proteínas representadas na figura anterior. Apesar do mapa de calor demonstrar que existiam proteínas reguladas positiva e negativamente, os processos biológicos apresentavam proteínas menos abundantes, em grande parte das linhagens celulares estudadas, principalmente nas linhagens MCF-10A, MGSO-3 e MACL-1.

Os processos biológicos estavam distribuídos de forma semelhante entre as quatro linhagens celulares estudadas. No entanto, mais de 95% deles estavam regulados negativamente nas linhagens celulares de fenótipo normal e de tumoral primário. De forma contrária, a linhagem celular com fenótipo tumoral metastático apresentou a maioria dos processos biológicos relacionados a diferenciação e ciclo celular regulados positivamente. Em conjunto, a análise desses resultados sugere que os processos relacionados ao ciclo celular estão mais ativos na linhagem celular metastática (Figura 39).

Levando em consideração a biologia de uma célula tumoral, realmente espera-se que as células metastáticas estejam mais ativas do ponto de vista mitótico, já que vários fatores estimuladores desse processo são amplamente discutidos e descritos na literatura. Contudo, esse comportamento também era esperado em células tumorais com fenótipo de tumor primário. Os resultados encontrados até aqui, então, indicam algum mecanismo de controle desse processo nas linhagens celulares com fenótipo de tumor primário.

Elaboramos um mapa de calor (*heatmap*), utilizando as proteínas reguladas e associadas a regulação do ciclo celular para as quatro linhagens. Observamos proteínas relacionadas ao proteassoma, principalmente o 26S, que está envolvido no processo de regulação e degradação de proteínas no interior das células (Figura 40).

O proteassoma participa de vários processos intracelulares que culminam na degradação de proteínas ubiquitinadas, controlando não só processos de estresse oxidativo, mas também vias de sinalização. Especificamente, o proteassoma 26s já foi descrito como fundamental no controle da regulação de sinais extracelulares que alteram a homeostase celular, na adaptação celular a mudanças do meio ambiente, no processo de função celular normal e no ciclo celular. Além disso, o proteassoma 26 s também participa no controle da quantidade de fatores de crescimento, receptores nucleares e de fatores de transcrição presentes no interior celular. Por isso ele pode agir diretamente nos processos biológicos relacionados ao ciclo celular (OKUMURA, 2018; FARARJEH, 2019). Em nosso estudo, encontramos proteínas reguladas do proteassoma relacionadas com a porção reguladora (19s) e com a porção do centro do proteassoma (20s)

Observando o gráfico de calor (Figura 40), notamos que as proteínas relacionadas ao proteossoma 2 s estavam menos abundantes na linhagem de fenótipo normal (MCF-10A) e não possuíam regulação na linhagem celular de fenótipo tumoral metastático (MDA-231-MD). Já as linhagens celulares com fenótipo de tumor primário (MGSO-3 e MACL-1) apresentavam essas proteínas mais abundantes, principalmente na linhagem celular MACL-1. Esses dados indicam que o controle dos processos biológicos relacionados a diferenciação e ao ciclo celular podem ser controlados pela atividade de proteassomas, principalmente o 26s, na linhagem com fenótipo não tumoral e nas linhagens com fenótipo tumoral primário. Já na linhagem com fenótipo tumoral metastático, os dados proteômicos indicam que tais processos não dependem da ação de proteassomas. Esse dado é de extrema importância, já que vários quimioterápicos inibem a função de proteassomas, inclusive para o tratamento de CM (OKUMURA 2018).

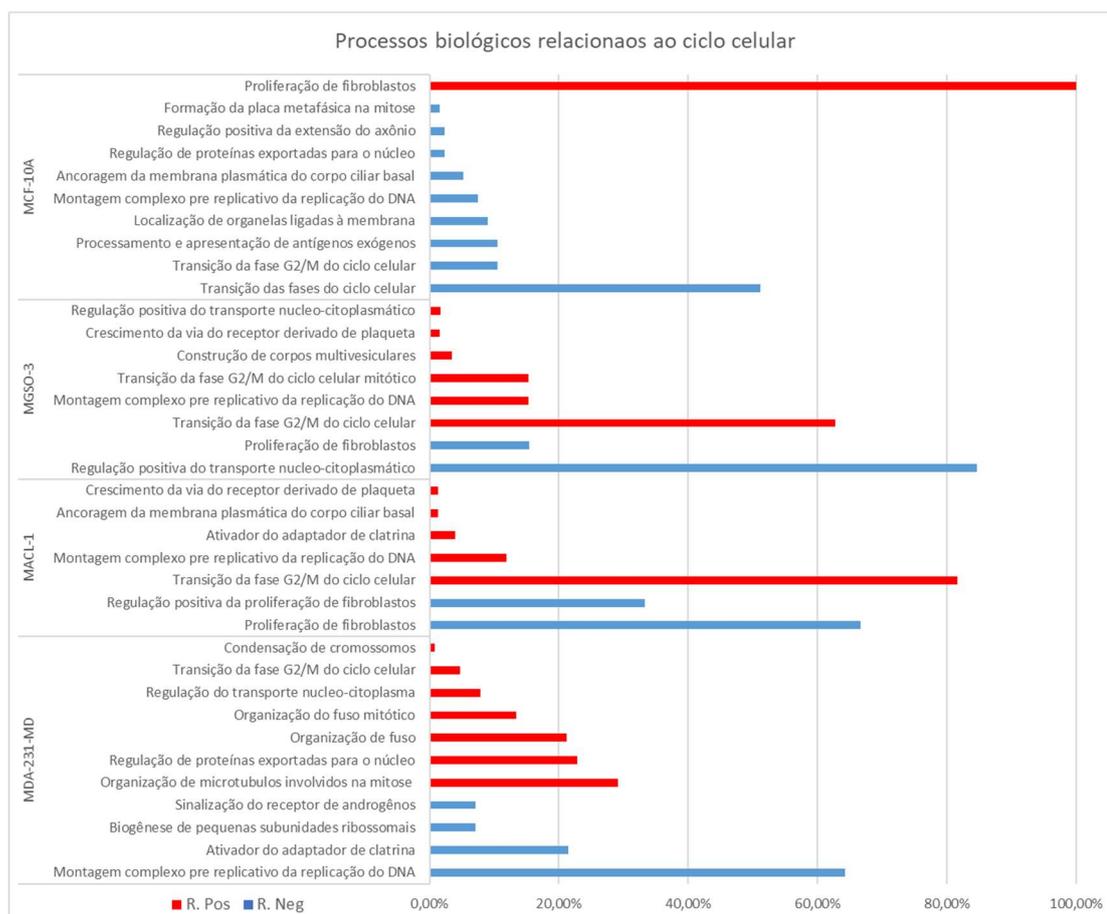


Figura 39 – Percentual de proteínas reguladas e associadas ao ciclo celular para cada linhagem celular analisada. A percentagem das vias metabólicas de cada linhagem celular envolvidas nos processos biológicos, descrita na representação gráfica, é dada pela sua relação com todas as proteínas mais ou menos abundante relacionadas ao processo. R. Pos: Percentual de proteínas com regulação positiva; R. Neg: Percentual de proteínas com regulação negativa.

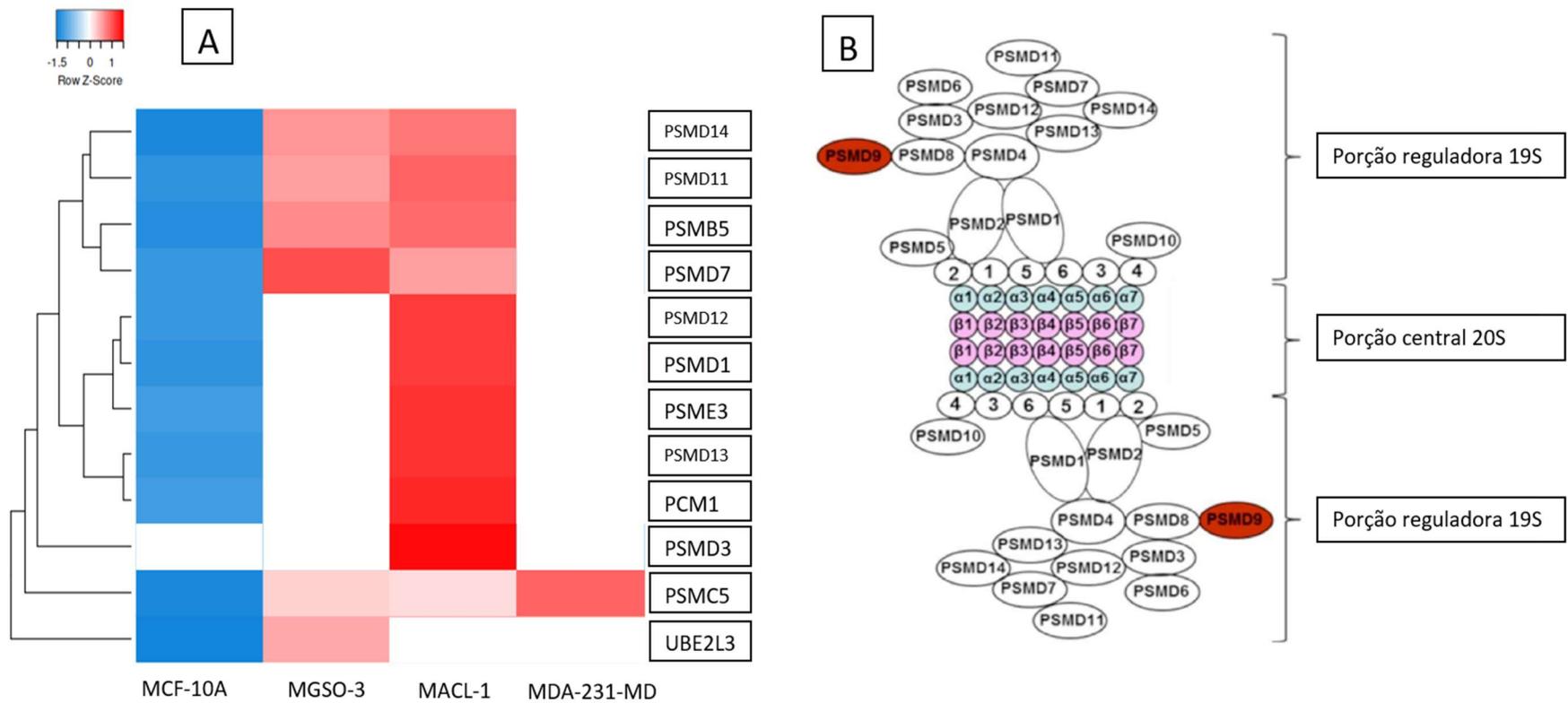


Figura 40 – Regulação de proteínas do proteassoma 26S. A) Mapa de calor (*heatmap*) do perfil de regulação das proteínas associadas ao proteassoma 26s nas quatro linhagens celulares experimentais avaliadas. Variações de intensidade da cor vermelha representam proteínas mais abundantes e as variações de intensidade da cor azul representam proteínas menos abundantes. B) Figura esquemática do proteassoma 26S modificada de HOPPER, J. L. et al, 2020. Em vermelho está indicada a proteínas PSMD9, que foi identificada neste estudo.

6.4 – Alterações relacionadas ao Citoesqueleto

A primeira análise dos nossos dados mostrava uma regulação negativa das proteínas associadas ao citoesqueleto nas células de fenótipo tumoral primário e uma regulação positiva das proteínas nas células de fenótipo tumoral metastático. Fundamentalmente, todas as células utilizadas neste estudo têm origem epitelial e, conseqüentemente, dependem da arquitetura do citoesqueleto para realizar os seus processos fisiológicos e bioquímicos. Uma análise detalhada dos processos biológicos realmente indica que MGSO-3 e MACL-1 possuem muito mais processos biológicos associados a processos menos abundantes em comparação com as linhagens celulares MCF-10A e MDA-231-MD (Figura 41).

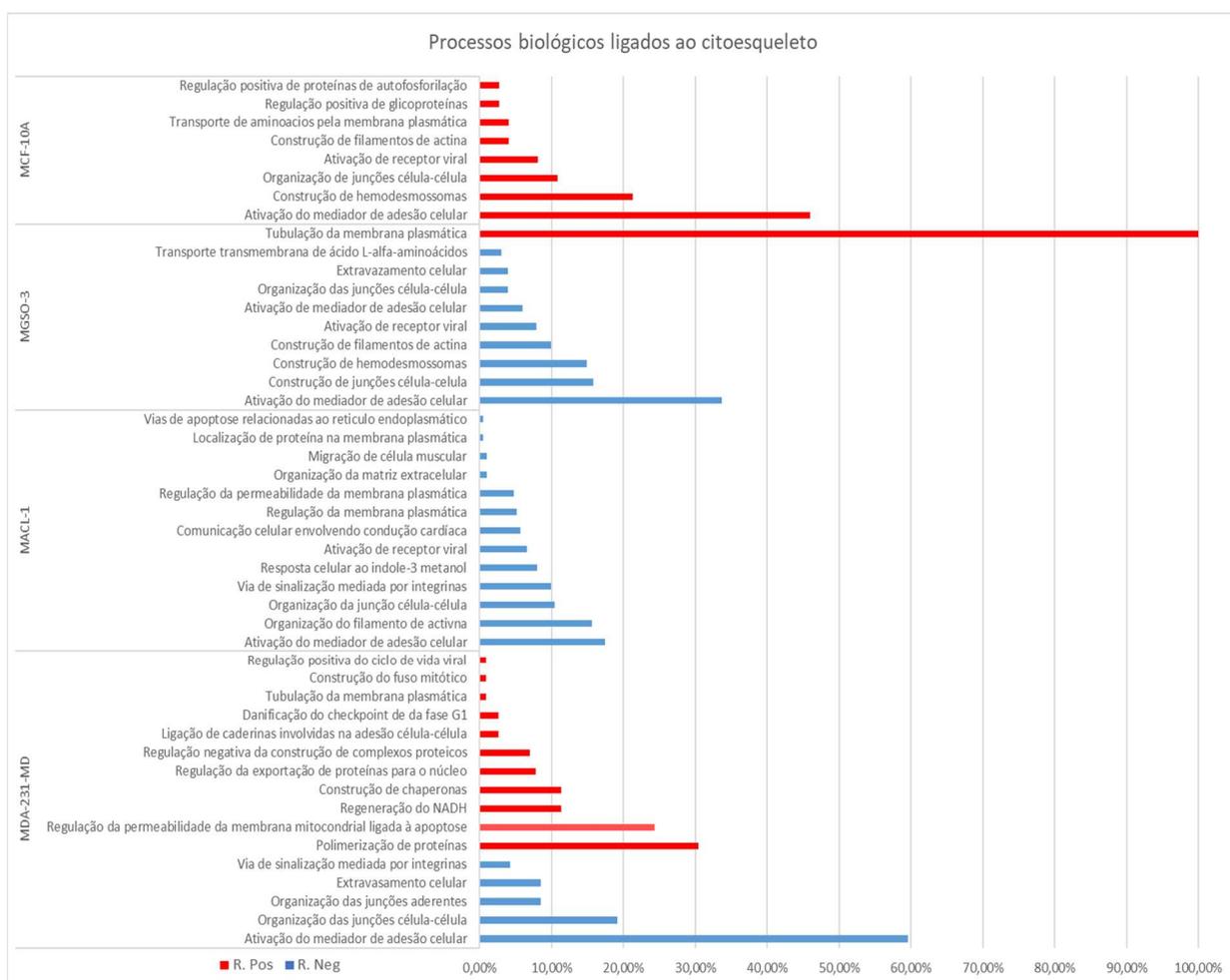


Figura 41 - Percentual de proteínas reguladas e associadas ao citoesqueleto para cada linhagem celular analisada. A porcentagem das vias metabólicas de cada linhagem celular envolvidas nos processos biológicos, descrita na representação gráfica, é dada pela sua relação com todas as proteínas mais ou menos abundante relacionadas ao processo. R. Pos: Percentual de proteínas com regulação positiva; R. Neg: Percentual de proteínas com regulação negativa.

A linhagem celular de fenótipo normal, MCF-10A, apresentou regulação negativa apenas de proteínas ligadas a estrutura de citoesqueleto interno da célula, como citoesqueleto de actina. No entanto, todos os processos biológicos relacionados a características de citoesqueleto típicas de células epiteliais, como adesão célula-célula, adesão célula-matriz, montagem de desmossomos e hemidesmossomos, estabelecimento de barreira endotelial, etc, estavam regulados positivamente.

Já as linhagens celulares de fenótipo de tumor primário, MGSO-3 e MACL-1, apresentaram majoritariamente uma regulação inversa à apresentada pela linhagem MCF-10A. Praticamente todos os processos biológicos ligados às características de citoesqueleto relacionadas a adesão e justaposição de células epiteliais estavam menos abundantes. Tais resultados podem sugerir que essa característica, tão importante nas células epiteliais, é perdida quando elas se transformam em tumores malignos.

Com relação à linhagem celular com fenótipo tumoral metastático, a MDA-231-MD, a regulação dos processos biológicos apresenta-se muito semelhante à linhagem celular MCF-10A. Esse dado, em específico, nos trouxe surpresa, já que é descrito na literatura que a desorganização do citoesqueleto e das junções aderentes é um ponto importante para o processo de metastatização e para o estabelecimento da metástase em seu sítio anatômico alvo (JIANG, 2009; ZENG, 2019). Contudo, em nosso estudo, os dados indicam que isso não aconteça, pelo menos para o estabelecimento e proliferação da célula tumoral de fenótipo metastático.

Para compreendermos melhor como as proteínas desses processos se comportam em cada linhagem celular, selecionamos todos os processos biológicos relacionados à adesão celular, célula-célula ou célula-matriz, e plotamos em um mapa de calor (Figura 42).

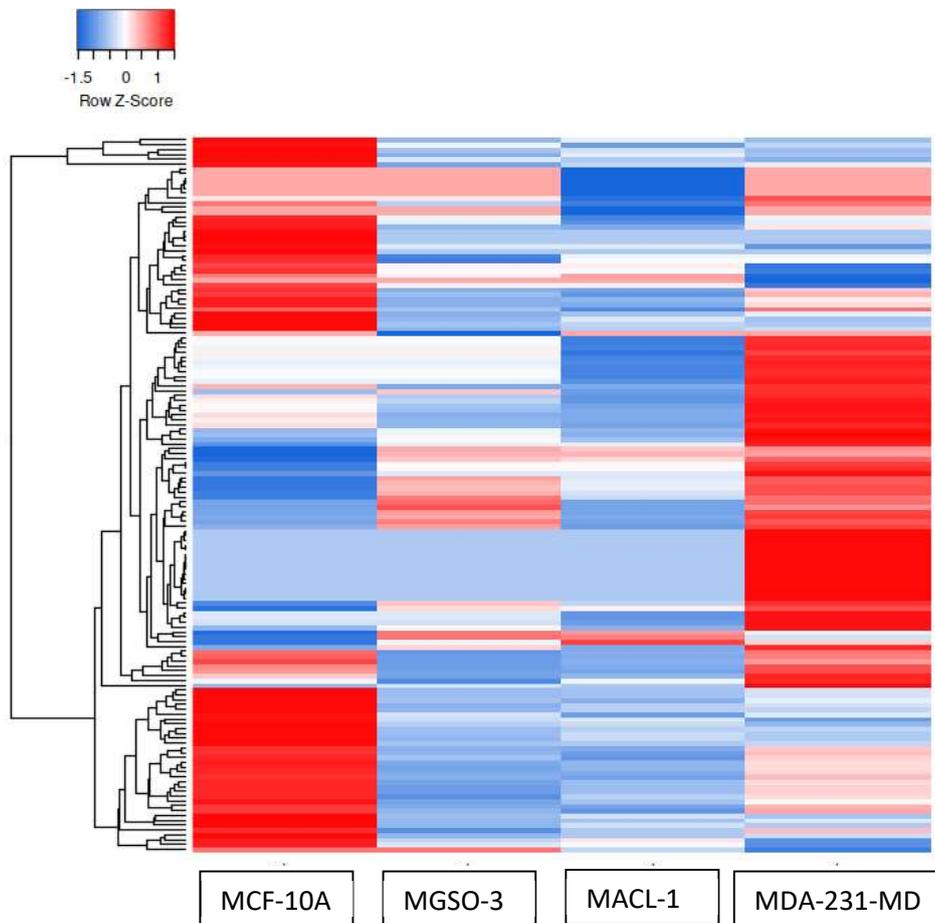


Figura 42: Mapa de calor (*heatmap*) das proteínas relacionadas à adesão celular nas quatro linhagens celulares experimentais avaliadas. As variações de intensidade da cor vermelha representam proteínas mais abundantes e as variações de intensidade da cor azul representam as proteínas menos abundantes.

Ao analisarmos o mapa de calor, percebemos que as linhagens celulares com fenótipo de tumor primário realmente apresentam um perfil de regulação negativa para a maioria das proteínas envolvidas nesses processos de adesão celular. No entanto, foi possível evidenciar que a regulação positiva entre a linhagem de fenótipo normal e a linhagem de fenótipo tumoral metastático ocorrem em proteínas distintas.

É possível observar claramente no mapa de calor um grupo de proteínas mais abundantes na linhagem celular MDA-231-MD, que apresentam uma regulação negativa para praticamente todas as proteínas das demais linhagens estudadas. Para compreendermos melhor a correlação entre essas proteínas, realizamos uma análise de redes de interação (Figura 43).

Apesar dessas proteínas terem sido retiradas de processos biológicos relacionados à adesão celular, uma parte desse grupo de proteínas não tem uma correlação direta com proteínas

de citoesqueleto. Por exemplo, foi possível identificar proteínas relacionadas à ciclo celular, proteínas de choque térmico e proteínas relacionadas ao metabolismo energético.

A presença de proteínas relacionadas ao metabolismo energético nos intrigou, já que existem poucas citações sobre a correlação entre o metabolismo energético e o citoesqueleto em células do CM. Já é descrito na literatura que o *turnover* do citoesqueleto em CM é importante para os processos tumorigênicos. Com relação aos nossos dados, as proteínas do metabolismo energético participam, principalmente, da glicólise. Anteriormente, já evidenciamos o papel delas na obtenção de energia nas células de CM. Contudo, Hu e colaboradores (2016) demonstraram que proteínas da glicólise podem estar ligadas a proteínas do citoesqueleto, como a actina. A ativação dessas proteínas do metabolismo energético, como a aldolase, aconteceria quando esses filamentos de actina estivessem livres e desorganizados no citoplasma. Já em uma situação de organização estrutural dos filamentos de actina, essas proteínas estariam inativadas, impossibilitando a sua utilização. Com isso, o turnover do citoesqueleto celular possibilitaria também, fornecimento de energia para a células.

7 – DISCUSSÃO

Diversos estudos sobre o CM trouxeram avanços significativos para o seu diagnóstico, tratamento e propeidética. A todo momento, são publicados artigos sobre novas técnicas diagnósticas, novas drogas testadas com sucesso, novas respostas com ações clínicas mais direcionadas, etc. Contudo, ainda assim, temos um número alto de mortes anuais, principalmente de mulheres, que acabaram padecendo frente a essa doença.

Quando analisamos a base experimental que fomenta esses estudos, concluímos que são feitos utilizando inúmeras estratégias de investigação, sejam elas *in vivo* ou *in vitro*. Apesar de possuírem grande valor, nem sempre a aplicabilidade do que foi elucidado no estudo necessariamente tem impacto na sua utilização no contexto da doença CM, pois são desenvolvidos em um tipo específico de tecido, tumor ou linhagem celular tumoral.

As estratégias clínicas e farmacológicas contra o CM não são direcionadas a condições compartilhadas ou exclusivas de cada etapa do processo tumoral. Isso porque ainda não compreendemos com solidez as características específicas e as diferenças entre células saudáveis e tumorais nas distintas fases tumorigênicas. Esse fato faz com que as estratégias de tratamento criadas contra o CM nem sempre sejam tão eficientes. É claro que existem diferentes tipos de CM e que, ainda dentro de um mesmo grupo, possa ser observado diferentes graus de eficiência de um determinado tratamento. Mas o estabelecimento de um tipo de CM, apesar de gerar condições fisiopatológicas únicas, também necessitam de uma base comum para o seu surgimento. E a elucidação dos mecanismos celulares dessa base em comum entre essas células tumorais de CM, e também das bases distintas, podem nos dar espaço para criação de estratégias mais assertivas independente das características individuais de cada tumor.

A proposta desse trabalho foi, então, tentar compreender as bases moleculares envolvidas no processo de tumorigênese do CM, utilizando linhagens celulares do epitélio mamário saudável e tumoral, em diferentes estágios tumorigênicos. E, para tanto, escolhemos utilizar a proteômica devido a sua eficiência para identificar proteínas que possam estar envolvidas no processo de tumorigênese. Após a identificação das proteínas reguladas em cada linhagem celular ($P < 0,05$ e $FC = 1,3$), foi possível observar que o perfil de regulação do proteoma das células com fenótipo normal (MCF-10A), de tumores primários (MGSO-3 e MACL-1) e metastáticos (MDA-231-MD) ocorria de forma distinta. Com a análise do gráfico de PCA, conseguimos visualizar claramente que existia um perfil proteômico muito distinto entre as células com perfis tumorigênicos diferentes. Nossos dados indicam que o perfil

tumorigênico das células tumorais pode ser um fator importante para o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas. Nushtaeva e colaboradores (2018), utilizando técnicas de cultura primária de CM, demonstraram que células oriundas do tumor primário de pacientes que não sofreram nenhum tratamento e células tumorais oriundas de pacientes que sofreram vários ciclos de quimioterapia apresentaram morfologia e formas distintas de sensibilidade à fármacos, em cultura. Neve e colaboradores (2006), em um estudo comparativo com 51 linhagens de células em cultura, demonstraram que grande parte da desregulação da transcrição em tumores primários é mantida nas células em cultura e que elas são essenciais para descrever os primeiros passos de ensaios clínicos. Já Jiang e colaboradores (2016) compararam 68 linhagens celulares de CM, todas de origem metastática, com 1375 tumores sólidos através de técnicas distintas como a comparação do Número de Variações de Cópias (*CNV*, em inglês), presença de mutações, expressão de RNAm e expressão de proteínas. Foi demonstrado, nesse estudo, que as linhagens celulares e os tumores sólidos possuíam semelhanças, mas também diferenças entre eles, e que nem todas as linhagens celulares refletiam as propriedades moleculares de tumores sólidos de CM, levando a um raciocínio crítico para a seleção de linhagens celulares de CM dependendo do estudo que será conduzido.

Grande parte dos estudos publicados na literatura realizaram a comparação entre células de linhagens oriundas de tumores de CM, na sua grande maioria de tumores metastáticos, ou a comparação entre tumores sólidos. Ao contrário disso, o nosso trabalho utilizou linhagens de células que representavam todo o perfil tumorigênico do CM triplo negativo, com o uso de uma linhagem de células epiteliais de mama com de fenótipo normal (MCF-10A), duas linhagens celulares provenientes de tumores primários de diferentes pacientes com CM (MGSO-3 e MACL-1) e uma linhagem com o fenótipo de CM metastático (MDA-231-MD). Essa característica do nosso estudo nos permitiu comparar, de forma mais objetiva, as semelhanças e diferenças entre os perfis proteômicos das linhagens utilizadas, possibilitando o estudo do processo tumorigênico, já que não fizemos uma comparação entre os extremos do processo tumorigênico, como a comparação entre linhagens celulares com fenótipo normal e metastático, e nem a comparação com tumores sólidos, que apresentam alta heterogeneidade no seu interior (JUNTILA, 2013).

O gráfico de PCA sustenta a reprodutibilidade entre amostras de diferentes replicatas e ainda nos permite verificar que o proteoma de linhagens provenientes de CM primários são semelhantes entre si, e diferentes das demais linhagens, o que também pôde ser verificado nos mapas de calor (*heatmap*) com clusterização hierárquica das proteínas.

O mapa de calor (*heatmap*) com todas as proteínas identificadas nos proteomas desse estudo, mais uma vez, demonstrou claramente as diferenças na regulação de proteínas dos diferentes perfis tumorigênicos, assim como as semelhanças dentro de um mesmo fenótipo tumoral, esse último exemplificado pela semelhança dos proteomas das células MGSO-3 e MACL-1. Os diagramas de Venn também evidenciam essas características, já que as linhagens celulares de tumores primários compartilharam a maior quantidade de proteínas, tanto mais abundantes quanto negativamente. Além disso, foi possível observar que todas as linhagens tumorais compartilhavam poucas proteínas quando era comparado com o total de proteínas identificadas.

Os processos biológicos, tantos das proteínas compartilhadas entre as linhagens celulares de fenótipo de tumor primário, quanto das exclusivas de cada célula, demonstraram funções e vias bem distintas. Por essa razão, resolvemos utilizar todas as proteínas reguladas para identificar os principais processos biológicos representados nas linhagens e, conseqüentemente, entender as semelhanças e diferenças funcionais das células.

Os processos biológicos foram distribuídos em oito grandes grupos. Os processos biológicos mais alterados estavam ligados à expressão gênica, seguida pelo metabolismo energético, citoesqueleto, metabolismo e sinalização de proteínas e ciclo celular. Nesse trabalho, optamos por analisar, principalmente, 3 grandes grupos de processos biológicos alterados: o metabolismo energético, o ciclo celular e o citoesqueleto que tem ligação direta com as características funcionais da célula epitelial.

7.1 – Alterações relacionadas ao metabolismo energético

A reprogramação do metabolismo energético no CM é um tema muito estudado nos últimos anos e algumas teorias postuladas são comuns para células tumorais, independentemente do tipo de câncer. É claro que a obtenção de energia está correlacionada ao potencial proliferativo, invasivo e de metastatização de um tumor, já que são ações celulares que demandam um gasto energético. Porém, a normatização dessa reprogramação metabólica pode nos impedir de olharmos mais profundamente as questões tumorigênicas e as possíveis estratégias terapêuticas contra o câncer a partir dessa visão.

Com relação ao metabolismo lipídico no CM, a lipogênese e o direcionamento de vias para a produção de lipídeos importantes para a célula, como o colesterol e lipoproteínas de

membrana são bem descritos na literatura (MONACO, 2017; AMORIM, 2018). Trabalhos experimentais demonstraram que o metabolismo glicídico e o transporte do piruvato para a mitocôndria são fundamentais para produção de citrato, no ciclo do ácido cítrico, que é usado, no citoplasma, para a produção de ácidos graxos. Esses ácidos graxos, juntamente com ácidos graxos de origem exógena, subsidiariam as funções da célula tumoral, interferindo ainda na sua capacidade de proliferação e malignidade (SZUTOWICZ, 1979; ZAID, 2012; LUCENAY, 2016; WANG, 2018). Porém, trabalhos como o de Garcia e colaboradores (2017) demonstram que a inativação da acetil-CoA carboxilase, uma importante enzima no processo de produção de novas cadeias lipídicas, é um critério fundamental para o desenvolvimento da capacidade de invasão de células metastáticas, como as linhagens MDA-231-MD e MCF-7, o que demonstra um caráter controverso, na literatura, com relação ao processo de lipogênese tumoral. No nosso trabalho, a análise dos processos biológicos é condizente com a supressão da síntese lipídica em todas as linhagens tumorais, o que não foi observado na linhagem celular de fenótipo normal. Apesar de descrito por Wang e colaboradores (2018) que a síntese lipídica é crucial para o desenvolvimento tumoral, nossos dados indicam que as células de CM triplo negativas não apresentam o processo de biogênese de lipídeos expressivamente aumentada, em relação às células não tumorais.

Ainda sobre o metabolismo de lipídeos, sabe-se que a biossíntese e armazenamento de lipídeos por células tumorais ocorre como forma de reserva de energia para situações de hipóxia ou baixa de glicose, e que a beta oxidação ocorreria apenas em células com metabolismo mais quiescente (DELGOFFE, 2015; MONACO, 2017; WANG, 2018). O nosso estudo, mais uma vez, apresentou dados conflitantes com a literatura, já que as linhagens celulares de tumor primário apresentaram uma regulação negativa e a linhagem de tumor metastático apresentou uma regulação positiva das proteínas associadas ao processo de beta oxidação mitocondrial, ou seja, uma dicotomia com relação à regulação desses processos em células supostamente com alta atividade metabólica. Apesar de dependerem de grande quantidade de energia e com rápida produção para subsidiar a sua condição tumoral, o nosso estudo sugere que apenas a linhagem celular MDA-231-MD utilize a beta oxidação para produção de energia. Luis e colaboradores (2019) demonstraram que células da linhagem celular MCF-7, de origem metastática, em um ambiente rico em glicose e lipídeos, utilizavam a beta oxidação como fonte de energia e que, nessas condições experimentais, apresentavam maior viabilidade celular, maior capacidade de proliferação e maior agressividade. Além disso, os mesmos autores verificaram que essa linhagem metastática, no ambiente experimental rico em glicose e lipídeos, produzia glicose a

partir do lactato, quando comparadas com a mesma linhagem celular em um ambiente experimental rico ou pobre em glicose, o que foi denominado de inversão do efeito Warburg. Logo, as linhagens celulares de tumor primário devem utilizar outras rotas metabólicas para produção de energia, como veremos a seguir.

Os processos biológicos relacionados às vias glicolíticas apresentaram uma predominância de proteínas mais abundantes nas linhagens MGSO-3 e MACL-1 quando comparadas às linhagens MDA-231-MD, com destaque para as vias relacionadas à produção de piruvato. O aumento da glicólise, como fonte de energia rápida para o estabelecimento e a proliferação de células tumorais, já é conhecido há muito tempo, não só no CM, mas também em outros tipos de cânceres. Desde a descoberta do efeito Warburg (WARBURG, 1927), há quase 100 anos atrás, onde se constatou uma alteração do metabolismo celular, privilegiando vias glicolíticas anaeróbicas nas células tumorais, vários cenários distintos sobre essa reprogramação metabólica já foram descritos, mas ainda não totalmente esclarecida. Apesar de alguns estudos já terem descrito que alguns tumores tem a capacidade de utilizar todas as vias do metabolismo de carboidrato para produção de energia (MORENO-SÁNCHEZ, 2007), o aumento da atividade da via glicolítica e da respiração anaeróbia pode ser explicada pela maior velocidade de produção de ATP para uma célula tão dependente de energia para realizar seus processos (HEIDEN, 2009).

Os nossos dados, no entanto, indicam que essa maior produção de piruvato não está diretamente ligada a produção anaeróbica de energia nas células tumorais, mas sim para o direcionamento desse piruvato ao ciclo do ácido cítrico, principalmente para as linhagens de tumor primário. Todas as proteínas mais abundantes nesse processo direcionam para a produção de Acetil-CoA, a partir do piruvato. Um bom exemplo desse possível direcionamento das linhagens com fenótipo de CM primário para o metabolismo aeróbico de carboidratos, contrário ao efeito Warburg, é a proteoforma da lactato desidrogenase (LDHC), que induz uma maior conversão de lactato a piruvato, e não o inverso. Já a linhagem de CM metastática, possui regulação positiva da LDHA, assim como outras enzimas envolvidas no metabolismo anaeróbico de carboidratos, sugerindo uma possível tendência para o seu metabolismo anaeróbico, corroborando um efeito Warburg.

Com a produção do Acetil-CoA, era esperado que o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa também estivessem ativas. Os dados proteômicos indicam uma regulação positiva parcial dessa via. A análise do mapa de calor da figura 29 indica que as linhagens

MGSO-3 e MACL-1 apresentam um padrão de regulação distinto da MDA-231-MD. É possível visualizar que enzimas funcionais do ciclo do ácido cítrico apresentam uma regulação positiva apenas nas linhagens celulares de fenótipo de tumor primário, o que não ocorre nas outras linhagens. Esses dados indicam que o ciclo do ácido cítrico está mais ativo nas células primárias de CM. Esse mesmo padrão de regulação também é observado quando analisamos as proteínas relacionadas à fosforilação oxidativa. Dentre as várias proteínas identificadas para esse processo a regulação positiva ocorreu apenas nas linhagens MGSO-3 e MACL-1 em detrimento das outras linhagens celulares estudadas. Nossos dados indicam que as linhagens com fenótipo de tumor primário obtêm energia através do catabolismo aeróbico da glicose, sendo que as células de CM com fenótipo metastático obtêm energia por outras vias, incluindo o catabolismo anaeróbico da glicose (efeito Warburg).

Para compreendermos melhor essas rotas metabólicas tumorais, é preciso pensarmos que o objetivo principal das células é a obtenção de energia para a realização dos processos celulares, e não da rota que seja mais importante ou mais fácil. Diers e colaboradores (2012) demonstraram usando experimentos *in vitro* com células MDA-231-MD que, apesar da rota canônica anaeróbica de obtenção de energia, apresentava uma capacidade de proliferação muito maior quando recebiam uma suplementação de piruvato, quando comparada à suplementação por lactato. Esse aumento na proliferação era seguido de um maior consumo mitocondrial de oxigênio, que também se correlacionava com essa capacidade proliferativa da célula. O simples bloqueio do transporte de piruvato para a mitocôndria provocou uma drástica diminuição proliferativa. Tais dados nos levam a supor que a obtenção de piruvato é essencial para a fisiopatologia das células tumorais e para no processo tumorigênico.

Tang e colaboradores (2019) demonstraram em linhagens celulares MCF-7 que a hipóxia era capaz de promover a proliferação celular com conseqüente atenuação do ciclo do ácido cítrico. Sendo assim, alterações do meio ambiente metabólico das células tumorais têm a capacidade de modular as vias metabólicas, o que pode estar intimamente ao processo tumorigênico. Outros elementos da via do ácido cítrico também modulam as características tumorais das linhagens celulares. Ren e colaboradores (2017) demonstraram que o excesso de citrato, via tratamento exógeno, inibia a via glicolítica e o ciclo do ácido cítrico, *in vitro* e *in vivo*, diminuindo o crescimento do tumor via inibição da fosforilação do receptor 1 para IGF (IGF-1R) em células MCF-7 e outras linhagens tumorais.

A utilização de fármacos que sequestram metabólitos da glicólise e do ciclo do ácido cítrico também tem efeito sobre essas vias metabólicas. Janzer e colaboradores (2014) demonstraram que a metformina, um hipoglicemiante de uso comum na clínica, tem a capacidade de inibir a glicólise e o ciclo do ácido cítrico em células MCF-10A, que estão em um processo forçado de transformação tumoral. Porém, em linhagens já estabelecidas de CM, o efeito da metformina já não era tão intenso, sugerindo que a modulação dessas vias iniciais do metabolismo de glicose também tem ação no processo tumorigênico. Em complementação a esse dado, Lord e colaboradores (2018) demonstraram que apesar da metformina ter ação no metabolismo de mitocôndrias e contribuir para a diminuição do crescimento e agressividade de tumores primários, em estudos clínicos com pacientes, alguns tipos de tumor tem a capacidade de controlar a expressão de proteínas da fosforilação oxidativa, o que inibiria a ação do medicamento, tornando-o ineficaz. Apesar de tais achados não terem sido observados com os mesmos tipos celulares empregados neste estudo, os nossos dados corroboram com a literatura mencionada, ou seja, células tumorais em diferentes estágios tumorigênicos utilizam vias metabólicas distintas para a obtenção de energia.

Com relação à mitocôndria, os nossos dados podem complementar as conclusões dos trabalhos de Zou e colaboradores (2016) e Jia e colaboradores (2018) que sugere que a plasticidade metabólica das células de CM direciona os cursos da patologia, e que a reprogramação mitocondrial sustenta os processos de proliferação e agressividade do câncer. Esse reprogramação poderia ocorrer seja por condições de controle do metabolismo energético ou pelo controle de vias apoptóticas dependentes de mitocôndrias, como evidenciado pelos processos distintamente regulados em estágios tumorigênicos celulares diferentes. Conhecendo melhor essa plasticidade metabólica seria possível o desenvolvimento de estratégias de tratamento mais eficientes contra o CM. Shrivastava e colaboradores (2001) avaliaram a ação promissora do canabinol com fator desestabilizante das funções mitocondriais em células de CM, com consequente regulação de processos autofágicos e apoptóticos. Já San e colaboradores (2018) demonstraram o potencial de ação do astibilin, um fármaco com propriedades anti-inflamatórias, hipoglicemiantes e anti-oxidantes, na ativação de caspases via Bcl-2. A manipulação dessa plasticidade também poderia ocorrer por controle de vias de sinalização em tumores de CM, como demonstrado por Brasó-Maristany que identificou a ação do proto-oncogene PIM1 como regulador dos níveis do fator anti-apoptótico Bcl2.

Outro fato que corrobora com a nossa hipótese de que as células com fenótipo de tumor primário metabolizam a glicose preferencialmente por vias aeróbicas se deve ao fato de termos

encontrado várias proteínas associadas a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa mitocondriais mais abundantes nas linhagens MGSO-3 e MACL-1, o que não ocorreu com a linhagem de tumor metastático (MDA-231-MD). Santidrian e colaboradores (2013) demonstraram que o aumento da expressão do complexo I da cadeia transportadora de elétrons correlacionava com a estagnação da célula tumoral, impedindo eventos metastáticos. Já a desestabilização desse complexo ou a produção de suas proteínas aumentava a capacidade proliferativa e agressividade das células *in vitro*. Outros autores, como LeBleu e colaboradores (2014) e Zacksenhaus e colaboradores (2017), descreveram que o aumento do processo de fosforilação oxidativa correlacionava diretamente com agressividade e capacidade proliferativa do tumor de CM.

Em uma análise gênica do CM, Sotgia e colaboradores (2012) demonstraram que boa parte dos transcritos mitocondriais estavam relacionados a proteínas da cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa. Nesse mesmo trabalho, os autores demonstraram que nas células epiteliais que circundam o tumor de CM, os marcadores de biogênese e tradução mitocondrial estavam regulados negativamente, quando comparados ao próprio tumor. Os autores concluíram que as células de CM exercem um efeito predatório nas células epiteliais do estroma, que circundam o tumor, que possuem uma baixa função mitocondrial, mas fornecem substâncias altamente energéticas para serem processadas nas mitocôndrias tumorais, subsidiando sua alta demanda energética das células de CM. Esses dados também podem estar relacionados com a baixa densidade mitocondrial nas linhagens de tumores primários em comparação com as células de CM metastáticas. Já no tumor primário, as células tumorais possivelmente teriam o aporte energético produzido por elas próprias, via a regulação positiva de enzimas importantes para a produção de piruvato e Acetil-CoA, como indicam os dados proteômicos, não necessitando aumentar a densidade de mitocôndrias.

Lee e colaboradores (2017) reportaram que a fosforilação oxidativa estava ligada intimamente com o processo apoptótico e a resistência tumoral a quimioterápicos. Os autores demonstraram que os proto-oncogênes MYC e MCL1 aumentavam a fosforilação oxidativa mitocondrial e mantinham a resistência a quimioterápicos via ativação do fator 1-alfa induzível por hipóxia (HIF-1- α , da sigla em inglês). O bloqueio da produção de MCL1 afetaria diretamente essa via, diminuindo a quimio-resistência sem diminuir o efeito anti-apoptótico do proto-oncogene. Com relação à apoptose, os nossos dados demonstraram uma íntima relação entre a função mitocondrial e a apoptose via proteína BAX e as proteínas da família Bcl-2/xL, nas linhagens celulares de tumor primário. Alguns autores, como Sarkar e colaboradores (2003)

e Cui e colaboradores (2016), já demonstraram a manipulação dessa via de sinalização e do balanço entre BAX/ Bcl-2/xL, utilizando produtos naturais como indutores de apoptose em células de CM.

Um importante achado do nosso estudo está relacionado a proteína 14-3-3 σ . Suzuki e colaboradores (2000) já descreveram que a perda dessa proteína está correlacionada com o CM. Os nossos dados indicaram que a regulação negativa de 14-3-3 σ ocorreu apenas nas linhagens de tumor primário, sugerindo a ativação da via apoptótica BAX. Por outro lado, na linhagem tumoral metastática essa proteína foi encontrada regulada positivamente, o que seria consistente com o bloqueio dessa via apoptótica.

7.2 – Alterações relacionadas ao ciclo celular

O controle do ciclo celular é um importante processo associado a tumorigênese, que está diretamente ligado a capacidade de proliferação e desenvolvimento de células tumorais. Por ser um mecanismo celular altamente complexo, várias alterações podem estar presentes, principalmente dependendo do tipo de tumor, o que dificulta o estudo desse processo. Os nossos dados indicam um perfil de regulação distinto de proteínas associadas ao ciclo celular nas diferentes linhagens de CM. As proteínas reguladas nas linhagens de fenótipo de tumor primário, MGSO-3 e MACL-1, apresentaram um perfil de regulação distinto da linhagem de tumor metastático, MDA-231-MD. Identificamos várias proteínas associadas ao proteassoma 26S mais abundantes nas linhagens de tumor primário, o que não foi observado nas demais (Figura 40).

Dados da literatura demonstram que a atividade do proteassoma 26S é importante para a biologia das células tumorais. Okur e colaboradores (2018) demonstraram a efetividade dos inibidores do proteassoma 26S, bortezomibe e OTSSP167, na regressão de tumores de CM humanos em modelos animais. Chang e colaboradores (2014) também demonstraram que o bortezomibe, associado a um inibidor de ATP sintase, regularam o ciclo celular de células tumorais *in vitro*. Guo e colaboradores (2016) demonstraram, também *in vitro*, que a fosforilação da porção reguladora do proteassoma 26S controlava o processo de proliferação e tumorigênese de linhagens celulares de CM. Utilizando a linhagem celular MCF-7, que é positiva para os receptores de estrógeno e progesterona, Xia e colaboradores (2018) demonstraram que ação do proteassoma 26s correlaciona a redução da proliferação celular dessa linhagem.

Como observamos proteínas do proteassoma mais abundantes em células de tumor primário (MGSO-3 e MACL-1), frente à regulação negativa das mesmas proteínas em células normais do epitélio mamário (MCF-10A), e ausência de regulação nas células metastáticas (MDA-231-MD), acreditamos que a regulação positiva de proteínas do proteassoma é uma etapa importante da tumorigênese, especificamente a transformação tumoral. Essa hipótese parece ser bem plausível, já que Tsvetkov e colaboradores (2018) demonstraram que a deleção de proteínas do proteassoma 26S impediram a transformação tumoral de células normais MCF-10A. Fararjeh e colaboradores (2019), também demonstraram que expressão da subunidade 3 não ATPase do proteassoma 26s é fundamental para a estabilidade do receptor HER2 em linhagens de CM. O tratamento com bloqueadores da atividade do proteassoma 26 também são descritos na literatura. Banerjee e colaboradores (2019) demonstraram a ação de compostos sintéticos sobre a quinase reguladora de proteassoma DYRK2 com consequente diminuição da função do proteassoma 26s e bloqueio da progressão do tumor. Já Ismail e colaboradores (2016) demonstraram a ação de alcaloides de *Murraya keoniggi* pode provocar a morte de células da linhagem MDA-231-MD através da inibição do proteassoma 26s. Desta forma, a utilização de quimioterápicos que inibem a atividade do proteassoma podem ser de grande impacto na propedêutica do paciente, mas essa regulação distinta entre linhagens de tumor primário e metastático podem ser um fator de graus de sucesso diferente nesse tipo de tratamento e devem ser estudados com maior profundidade.

7.3 – Alterações relacionadas ao citoesqueleto

O remodelamento da arquitetura celular também é um aspecto muito importante na tumorigênese. Os nossos dados demonstraram que houveram remodelamentos dos proteomas das linhagens estudadas, principalmente de proteínas envolvidas na conexão célula - célula e célula - matriz extracelular, que são características importantes do tecido epitelial, mas perdidas na tumorigênese.

Os processos biológicos relacionados ao citoesqueleto mostraram uma regulação negativa de proteínas nas linhagens de tumor primário em comparação a de fenótipo normal. Já a linhagem de tumor metastático apresentou a maioria dos processos compostos por proteínas mais abundantes, o que pode indicar uma reestruturação do citoesqueleto nessa fase tumorigênica, visando estabelecer em sítios anatômicos distintos, no processo de migração tumoral. Além disso, a remodelação do citoesqueleto celular também pode ser direcionada em outras ações de sobrevivência da célula tumoral. Absi e colaboradores (2018) demonstram que

o citoesqueleto de actina pode se acumular de forma rápida e maciça próximo à sinapse imunológica realizada com células Natural Killer (NKc), na tentativa de minimizar os efeitos citotóxicos causado na célula tumoral. Coincidentemente, a linhagem celular MDA-231-MD foi utilizada nesse estudo e apresentou essa resposta anti-tumoral. Tal constatação pode nos provoca no raciocínio de que as linhagens de tumor primário, por não terem essa remodelação do citoesqueleto ativa, podem ser mais susceptíveis a resposta citotóxicas imuno-mediadas.

Nossos dados também demonstraram um importante padrão de regulação positiva de proteínas envolvidas com citoesqueleto de células de CM metastáticas com processos glicolíticos. Hu e colaboradores (2016) demonstraram que o *turnover* das proteínas do citoesqueleto expunham proteínas aldolase, uma importante proteína do metabolismo energético. Esse *turnover* também era modulado pela necessidade energética da célula tumoral, o que condicionava o citoesqueleto da célula tumoral às suas necessidades metabólicas. Já Humphries e colaboradores (2019) evidenciaram a ligação entre o aumento de inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI 1, da sigla em inglês), um marcador comum de células migratórias e um mal prognóstico em células de CM, com a regulação do citoesqueleto tumoral, processos de fissão mitocondrial e aumento da glicólise.

Com isso, supomos que mesmo com poucas rotas metabólicas disponíveis para produção de ATP, a linhagem tumoral metastática pode alicerçar seu crescimento em outros processos metabólicos indiretos, produzindo também energia através dele.

8 – CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho produziram novas informações a respeito de características relacionadas ao CM. Porém, o dado mais importante foi a determinação da importância do estágio tumorigênico nas respostas celulares apresentadas pelas células de CM.

Ao final, com os dados proteômicos obtidos, podemos concluir que:

- Linhagens celulares de CM, em diferentes estágios tumorigênicos, apresentam vias e processos distintos que se correlacionam com o fenótipo celular;
- Linhagens celulares oriundas de pacientes distintos, porém no mesmo estágio tumorigênico, podem apresentar uma regulação semelhante de vias celulares, o que pode possibilitar a criação de estratégias terapêuticas conjuntas;
- Linhagens celulares com fenótipo de tumor primário, MGSO-3 e MACL-1, apresentaram uma regulação positiva de proteínas para as vias de catabolismo aeróbico da glicose, sugerindo um efeito Warburg inverso;
- A linhagem celular com fenótipo tumoral metastático, MDA-231-MD, apresentou uma regulação positiva de proteínas associadas à vias alternativas para obtenção de energia, como a produção de ATP por via anaeróbia (efeito Warburg), ou por vias não canônicas, como a obtenção de energia dependente do *turnover* do citoesqueleto;
- As linhagens celulares com fenótipo de tumor primário possuem uma menor densidade de mitocôndrias e apresentam vias apoptóticas ativas dependentes dessa organela;
- A linhagem celular com fenótipo de tumor metastático não apresentou uma maior densidade de mitocôndrias, em comparação com as linhagens com fenótipos normal e de tumor primário;
- A modulação do ciclo celular nas linhagens celulares de tumor primário está regulada pela ação do proteassoma 26S, o que não aconteceu com as células da linhagem tumoral metastática;
- Sugerimos uma grande desregulação da arquitetura do citoesqueleto nas linhagens celulares de tumor primário e uma remodelação desse citoesqueleto nas linhagens celulares de tumor metastático;

- Especulamos existir uma interrelação entre a modulação do citoesqueleto e outros processos biológicos nas linhagens tumorais, como a regulação do metabolismo, ciclo celular e a proteínas de choque térmico.

Por fim, o nosso trabalho possibilitou uma melhor compreensão dos fatores relacionados a cada estágio tumorigênico do CM que podem, futuramente, subsidiar o desenvolvimento de novos estudos que possibilitem a criação de estratégias diagnósticas e terapêuticas mais assertivas contra o CM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSI, A. A.; WURZER, H.; G, C.; HOFFMANN, C.; MOREAU, F.; MAO, X.; BROWN-CLAY, J.; PETROLI, R.; CASELLAS, C. P.; DIETERLE, M.; THIERY, J. P.; CHOUAIB, S.; BERCHEM, G.; JANJI, B.; THOMAS, C.: Actin cytoskeleton remodelin drives breast cancer cell escape from natural killer-mediated cytotoxicity. *Molecular Cancer Research*, vol. 78, nº 19, p. 5631-5643. 2018.

AFZALI, F.; AKBARI, P.; NADERI-MANESH, H.; GARDANEH, M.: The next generation personalized models to screen hidden layers of breast cancer tumorigenicity. *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 175. 2019.

AKRAM, J.; IPBAL, M.; DANİYAL, M.; KHAN, A. U.: Awareness and current knowledge of breast câncer. *Biological Research*, vol. 50, nº 33. 2017.

AMADOU, A.; TORRES-MEJÍA, G.; HAINAUT, P.; ROMIEU, I.: Breast cancer in Latin America: global burden, patterns, and risk factors. *Salud Publica de Mexico*, vol. 56, nº 5.2014.

AMENDOLA, L. C. B.; VIEIRA, R.: A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. *Revista Brasileira de Cancerologia*, vol. 51, nº 4. 2005

AMORIM, M. O.; VIEIRA, M. M.; GONÇALVES, I. V.; RHANA, P.; RODRIGUES, A. L. P.: Câncer de mama: Reprogramação do metabolism tumoral. *Revista Médica de Minas Gerais*, vol. 28. 2018.

ANDERSON, B. O.; JAKESZ, R.: Breast cancer issues in developing countries: an overview of the Breast Health Global Initiative. *World Journal of Surgery*, vol. 32, nº 12. 2008.

ANDSOY, I. I.; GUL, A.: Breast, cervix and colorectal cancer knowledge among nurses in Turkey. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 15, nº 5. 2014.

ASLAM, B.; BASIT, M.; NISAR, M. A.; KHURSHID, M.; RASOOL, M. H.: Proteomics: Technologies and ther applications. *Journal of Chromatographic Science*, vol. 55. 2017.

AVAGLIANO, A.; RUOCCO, M. R.; ALIOTTA, F.; BELVISO, I.; ACCURSO, A.; MASONE, S.; MONTAGNANI, S.; ARCUCCI, A.: Mitochondrial flexibility of breast cancer: A growth advantage and a therapeutic opportunity. *Cells*, vol. 8, nº 401. 2019.

BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T.: The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science*, vol. 125, nº 1. 2012.

BANERJEE, S.; WEI, T.; WANG, J.; LEE, J. J.; GUTIERREZ, H. L.; CHAPMAN, O.; WILEY, W. E.; MAYFIELD, J. E.; TANDON, V.; JUAREZ, E. F.; CHAVES, L.; LIANG, R.; SAH, R. L.; COSTELLO, C.; MESIROV, J. P.; VEJA, L. L.; COOPER, K. L.; DIXON, J. E.; XIAO, J.; LEI, X.: Inhibition of dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 2 perturbs 26s proteasome-addicted neoplastic progression. *National Academy of Science of USA*, vol. 116, nº 49, p. 24881-24891. 2019

BASSE, C.; AROCK, M.: The increasing roles of epigenetics in breast cancer: Implications for pathogenicity, biomarkers, prevention and treatment. *International Journal of Cancer*, vol. 137. 2015.

BÉRUBÉ, S.; LEMIEUX, J.; MOORE, L.; MAUNSELL, E.; BRISSON, J.: Smoking at time of diagnosis and breast cancer-specific survival: new findings and systematic review with meta-analysis. *Breast Cancer Research*, vol. 16, nº 2. 2014.

BLANCO, A.; GRANA, B.; FACHAL, L.; SANTAMARINA, M.; CAMASELLE-TEIJEIRO, J.; RUIZ-PONTE, C.; CARRACEDO, A.; VEGA, A.: BRCA1 and BRCA2 wild-type breast nas/pr ovarian cancer families: germline mutations in TP53 and PTEN. *Clinical Genetics*, vol. 77. 2010.

BOJA, E.; HILTKE, T.; RIVERS, R.; KINSINGER, C.; RAHBAR, A.; MESRI, M.; RODRIGUEZ, J. J.: Evolution of clinical proteomics and its role in medicine. *Proteomic Research*, vol. 10. 2011.

BOMBONATI, A.; SGROI, D. C.: The molecular pathology of breast cancer progression. *Journal of Pathology*, vol. 223. 2011.

BONDURANT, K. L.; HARVEY, S.; KLIMBERG, S.; KADLUBAR, S.; PHILIPS, M. M.: Establishment of a Southern Breast Cancer Cohort. *The Breast Journal*, vol. 217, nº 3. 2011.

BOSSETI, C.; BERTUCCIO, P.; LEVI, F.; CHATENOU, L.; NEGRI, E.; VECCHIA, C. L.: The decline in breast cancer mortality in Europe: An update (to 2009). *The Breast*, vol. 21. 2012.

BRASÓ-MARISTANY, F.; FILOSTO, S.; CATCHPOLE, S.; MARLOW, R.; QUIST, J.; FRANCHESCH-DOMENECH, E.; PLUMB, D. A.; ZAKKA, L.; GAZINSKA, P.; LICCARDI, G.; MEIER, P.; GRIS-OLIVER, A.; CHEANG, M. C. U.; PERDRIX-ROSELL, A.; SHAFAT, M.; NOEL, E.; PATEL, N.; MATHEW, S.; WATKINS J.; SERRA, V.; MARRA, P.; GRIGORIADIS, A.; TUTT, A. N.: PIM1 kinase regulates cell death, tumor growth and chemotherapy response in triple-negative breast cancer. *Nature Medicine*, vol. 22, nº 11, p. 1303-1313. 2016.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A.: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 68. 2018.

BRAY, F.; JEMAL, A.; GREY, N.; FERLAY, J.; FORMAN, D.: Global cancer transition according de human development index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncology*, vol 13. 2012.

BROZOVA, M.; KLEIBL, Z.; NETIKOVA, I.; SEVCIK, J.; SCHOLZOVA, E.; BREZINOVA, J.; CHALOUPKOVA, A.; VESELY, P.; DUNDR, P.; ZANIDOVA, M.; KRASMA, M.; MATOUSKOVA, E.: Establishment, growth and in vivo differentiation of a new clonal human cell line, EM-G3, derived from breast cancer progenitors. *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 103. 2007.

BRUNORO, G. V. F.; CARVALHO, P. C.; BARBOSA, V. C.; PAGNONCELLI, D.; GALLO, C. V. M.; PERALES, J.; ZAHED, R. P.; VALENTE, R. H.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.:

Differential proteomic comparison of breast cancer secretome using a quantitative paired analysis workflow. *BMC Cancer*, vol. 19. 2019.

CALDERÓN-CELIS, F.; ENCINAR, J. R.; SANZ-MENDEL, A.: Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 37. 2017.

CECILIO, A. P.; TAKAKURA, E. T.; JUMES, J. J.; SANTOS, J. W.; HERRERA, A. C.; VICTORINO, V. J.; PANIS, C.: Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, vol. 7. 2015.

CEDOLINI, C.; BERTOZZI, S.; LONDERO, A. P.; BERNARDI, S.; SERIAU, L.; CONCINA, S.; CATTIN, S.; RISALITI, A.: Type of Breast Cancer Diagnosis, Screening, and Survival. *Clinical Breast Cancer*, vol. 2, nº 4. 2014

CHAE, Y. K.; GONZALEZ-ANGULO, A. M.: Implications of Functional Proteomics in Breast Cancer. *The Oncologist*, vol. 19. 2014.

CHANG, H. Y.; HUANG, T. C.; CHEN, N. N.; HUANG, H. C.; JUAN, H. F.: Combination therapy targeting ectopic ATP synthase and 26S proteasome induces ER stress in breast cancer cells. *Cell Death and Disease*, vol. 5. 2014.

CLARK, L.; BAYANI, N.; COPPE, J. P.; TONG, F.; SPEED, T.; SPELLMAN, P. T.; DEVRIES, S.; LAPUK, A.; WANG, N. J.; KUO, W. L.; STILWELL, J. L.; PINKEL, D.; ALBERTSON, D. G.; WALDMAN, F. M.; MCCORMICK, F.; DICKSON, R. B.; JOHNSON, M. D.; LIPPMAN, M.; ETHIER, S.; GAZDAR, A.; GRAY, J. W.: A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, vol. 10, nº 6. 2006.

COLLINS, M. P.; FORGAC, M.: Regulation of V-ATPase assembly in Nutrient Sensing and function of V-ATPases in Breast cancer metastasis. *Frontiers of Physiology*, vol. 13, nº 9. 2018.

CORREA, C. R.; BERTOLLO, C. M.; GOES, A. M.: Establishment and Characterization of MACL-1 and MGSO-3 Cell Lines Derived From Human Primary Breast Cancer. *Oncology Research*, vol. 17. 2009.

CORRÊA, N. C. R.; KUASNE, H.; FARIA, J. A. Q. A.; SEIXAS, C. C. S.; SANTOS, I. G. D.; ABREU, F. B.; NONOGAKI, S.; ROCHA, R. M.; SILVA, G. A. B.; GOBBI, H.; ROGATTO, S. R.; GOES, A. M.; GOMES, D. A.: Genomic and phenotypic profiles of two Brazilian breast cancer cell lines derived from primary human tumors. *Oncology Reports*, vol. 29. 2013.

COSTA, G. G. D.; GOMIG, T. H. B. KAVISKI, R.; SOUSA, K. S.; KUKOL, C.; LIMA, R. S.; URBAN, C. D. A.; CAVALLI, I. J.; RIBEIRO, E. M. S. F.: Comparative Proteomics of Tumor and Paired Normal Breast Tissue Highlights Potential Biomarkers in Breast Cancer. *Cancer Genomics & Proteomics*, vol. 12. 2015.

COX, J.; MANN, M.: MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.p.-range mass accuracy and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, vol. 26, nº 12, p. 1367-1372. 2008.

CUI, L.; BU, W.; SONG, J.; FENG, L.; XU, T.; LIU, D.; DING, W.; WANG, J.; LI, C.; MA, B.; LUO, Y.; JIANG, Z.; WANG, C.; CHEN, J.; HOU, J.; YAN, H.; YANG, L.; JIA, X.: Apoptosis induction by alantolacton in breast cancer MDA-MB-231 cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrion-dependent pathway. *Archives of Pharmacal Research*. 2017.

DELGOFFE, G. M.; POWELL, J. D.: Sugar, fat, and protein: new insights into what T cells crave. *Currente Opinion in Immunology*, vol. 33. 2015.

DEY, N.; WILLIAMS, C.; LEYLAND-JONES, B.; DE, P.: Mutation matters im precision medicine: A future to believe in. *Cancer Treatmet Reviews*, vol. 55. 2017.

DEPPEN, S. A.; ALDRICH, M. C.; HARTGE, P.; BERG, C. D.; COLDITZ, G. A.; PETITTI, D. B.; HIATT, R. A.: Cancer Screening: The Journey from Epidemiology to Policy. *Annals Epidemiology*, vol. 22, n° 6. 2012.

DIERS, A. R.; BRONIOWSKA, K. A.; CHANG, C. F.; HOGG, N.: Pyruvate fuels mitochondrial respiration and proliferation of breast cancer cells: Effect of monocarboxylate transporter inhibition. *Biochemistry Journal*, vol. 15. 2012.

ELIZALDE, P. V.; RUSSO, R. C.; CHERVO, M. F.; SCHILLACI, R.: ErbB-2 nuclear function in breast cancer growth, metastasis and resistance to therapy. *Endocrine-Related Cancer*, vol. 23, n° 12. 2016.

FAN, X.; CUI, L.; ZENG, Y.; SONG, W.; GAUR, U.; YANG, M.: 14-3-3 protein are on the crossroads of cancer, aging, and age-related neurodegenerative disease. *International Journal of Molecular Science*, vol. 20. 2019.

FARARJEH, A. S.; CHEN, L. C.; HO, Y. S.; CHENG, T. C.; LIU, Y. R.; CHANG, H. L.; CHANG, H. W.; WU, C. H.: Proteasome 26s subunit, no-ATPASE 3 (PSMD3) regulates breast cancer by stabilizing HER2 from degradation. *Cancers*, vol. 11. 2019.

FARARJEH, A. S.; CHEN, L. C.; HO, Y. S.; CHENG, T. C.; LIU, Y. R.; CHANG, H. L.; CHANG, H. W.; WU, C. H.; TU, S. H.: proteasome 26s subunit, no-ATPase 3 (PSMD3) regulates breast cancer by stabilizing HER2 from degradation. *Cancers*, vol. 11, n° 4. 2019.

FERLAY, J.; STELIAROVA-FOUCHER, E.; LORTET-TIEULENT, J.; ROSSO, S.; COEBERGH, J. W. W.; COMBER, H.; FORMAN, D.; BRAY, F.: Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, vol. 49. 2013.

FILIPPINI, S. E.; VEGA, A.: Breast cancer genes: BRCA1 and BRCA2. *Frontiers in Bioscience*, vol. 18, n° 1. 2013.

GARCIA, M. R.; STEINBAUER, B.; SRIVASTAVA, K.; SINGHAL, M.; MATTIJSEN, F.; MAIDA, A.; CHRISTIAN, S.; HESS-STUMPP, H.; AUGUSTIN, H. G.; DECKER, K. M.; NAWROTH, P. P.; HERZING, S.; DIAZ, M. B.: Acetyl-CoA carboxylase 1-dependent protein acetylation controls breast cancer metastasis and recurrence. *Cell Metabolism*, vol 26, n° 6, p. 842-855. 2017.

GARCIA, N. D.; ROUCO, C. C.; VICH, P.; ALVAREZ-HERNANDEZ, C.; BRUSIN, B.; MARGUELLO, E. R.: Actualización del cáncer de mama en atención primaria. *Semergen*, vol. 14, nº 3. 2014.

GERLINGER, M.; ROWAN, A. J. HORSWELL, S.; LARKIN, M. M. J.; ENDESFELDER, D.; MATH, D.; GRONROOS, E.; MARTINEZ, P.; MATTHEWS, N.; STEWART, A.; TARPEY, P.; VARELA, I.; PHILLIMORE, B.; BEGUM, S.; MCDONALD, N. Q.; BUTLER, A.; JONES, D.; RAINE, K.; LATIMER, C.; SNATOS, C. R.; NOHADANI, M.; EKLUND, A. C.; SPENCER-DENE, B.; CLARK, G.; PICKERING, L.; STAMP, G.; GORE, M.; SZALLASI, Z.; DOWNWARD, J.; FUTREAL, A.; SWANTON, C.: Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *New England Journal Medical*, vol. 366, nº 10. 2012.

GEYER, P. E.; HOLDT, L. M.; TEUPSER, D.; MANN, M.: Revisiting biomarker Discovery by plasma proteomics. *Molecular Systems Biology*, vol. 13, nº 9. 2017.

GIRIANELLI, V. R.; GAMARRA, C. J.; E SILVA, G. A.: Disparities in cervical and breast cancer mortality in Brazil. *Revista de Saúde Pública*, vol. 48, nº3. 2014.

GOLDSTEIN, D.: How does homeostasis happen? Integrative physiological, systems biological, and evolutionary perspectives. *American Journal of Physiology-Regulatory, integrative and comparative physiology*, vol. 316. 2019.

GOMIG, T. H. B.; CAVALLI, I. J.; SOUZA, L. R.; VIEIRA, E.; LUCENA, A. C. R.; BATISTA, M.; MACHADO, K. C.; MARCHINI, F. K.; MARCHI, F. A.; LIMA, R. S.; URBAN, C. A.; CAVALLI, L. R.; RIBEIRO, E. M. S. F.: Quantitative label-free mass spectrometry using contralateral and adjacent breast tissues reveal differentially expressed proteins and their predicted impacts on pathways and cellular functions in breast cancer. *Journal of Proteomics*, vol. 199. 2019.

GUO, X.; WANG, X.; WANG, Z.; BANERJEE, S.; YANG, J.; HUANG, L.; DIXON, J. E.: Site-specific Proteasome Phosphorylation Controls Cell Proliferation and Tumorigenesis. *Nature Cell Biology*, vol. 18, nº 2. 2016.

HAN, P. K. J.; KLABUNDE, C. N.; NOONE, A. M.; EARLE, C. C.; AYANIAN, J. Z.; GANZ, P. A.; VIRGO, K. S.; POTOSKY, A. L.: Physicians' beliefs about breast cancer surveillance testing are consistent with test overuse. *Medical Care*, vol. 51, nº 4. 2013.

HASHIN, D.; BOFFETTAL, P.; LA VECCHIA, C.; ROTA, M.; BERTECCIO, P.; MALVEZZI, M.; NEGRI, E.: The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. *Annals of Oncology*, vol 27. 2016.

HAWKRIDGE, A. M.; GASKELL, S.: Practical considerations and current limitations in quantitative mass spectrometry-based proteomics. *Quantitative Proteomics*, p. 1-25. 2014.

HEIDEN, M. G. V.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B.: Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, vol. 324. 2009.

HOLMAN, S. W.; SIMS, P. F.; EYERS, C. E. The use of selected reaction monitoring in quantitative proteomics. *Bioanalysis*, vol. 4, nº. 14, p. 1763-86. 2012.

HONG, D.; FRITZ, A. J.; ZAIDI, S. K.; WIJNEN, A. J.; NICKERSON, J. A.; IMBALZAN, A. N.; LIAN, J. B.; STEIN, J. L.; STEIN, G. S.: Epithelia to mesenchymal transition and cancer stem cells contribute to breast cancer heterogeneity. *Cellular Physiology*. 2018.

HU, H.; JUVEKAR, A.; LYSSIOTIS, C. A.; ASARA, J. M.; CANTLEY, L. C.; WULF, G. M.: Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Glycolysis through Mobilization of aldolase from the Actin Cytoskeleton. *Cell*, vol. 164. 2016.

HU, Q.; NOLL, R. J.; LI, H.; MAKAROV, A.; HARDMAN, M.; COOKS, R. G.: The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrom*, vol. 40, nº 4, p. 430-43. 2005.

HUMPHRIES, B. A.; BUSCHHAUS, J. M.; CHEN, Y. C.; HALEY, H. R.; QYLI, T.; CHIANG, B.; SHEN, N.; RAJENDRAN, S.; CUTTER, A.; CHENG, Y. H.; CHEN, Y. T.; CONG, J.; SPINOSA, P. C.; YOON, E.; LUKER, K. E.; LUCER, G. D.: Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI1) promotes actin cytoskeleton reorganization and glycolytic metabolism in triple-negative breast cancer. *Molecular Cancer Research*, vol. 17, nº 5, p. 1142-1154. 2019.

INCA, Instituto Nacional do Câncer – Ministério da Saúde / Brasil. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama++>. Acesso em: 10 de novembro de 2020.

ISMAIL, A.; NOOLU, B.; GOGULOTHU, R.; PERUGU, S.; RAJANNA, A.; BADU, S. K.: Cytotoxicity and proteasome inhibition by alkaloid extract from murraya koenigii leaves in breast cancer cells-molecular docking studies. *Journal of Medical Food*, vol 19, nº 12, p.1155-1165. 2016

ITO, H.; MATSOU, K.: Molecular epidemiology, and possible real-world applications in breast cancer. *Breast Cancer*, vol. 33. 2016.

JANZER, A.; GERMAN, N. J.; GONZALEZ-HERRERA, K. N.; ASARA, J. M.; HAIGIS, M. C.; STRUHL, K.: Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Science (PNAS)*, vol. 111, nº 29. 2014.

JESINGER, A.: Breast anatomy for the interventionalist. *Techniques in vascular and interventional radiology*, vol. 12, nº 2. 2013.

JIA, D. PARK, J. H. JUNG, K. H.; LEVINE, H.; KAIPPARETT, B. A.: Elucidating the metabolic plasticity of cancer: mitochondrial reprogramming and hybrid metabolic state. *Cell*, vol.7, nº 21. 2016.

JIANG, G.; ZHANG, S.; YAZDANPARAST, A.; LI, M.; PAWAR, A. V.; LIU, Y.; INAVOLU, S. M.; CHENG, L.: Comprehensive comparison of molecular portraits between cell lines and tumors in breast cancer. *BMC Genomics*, vol. 17. 2016.

JIANG, P.; ENOMOTO, A.; TAKAHASHI, M.: Cell biology of the movement of breast cancer cells: Intracellular signalling and the actin cytoskeleton. *Cancer Letter*, vol. 284, nº 2, p. 122-130. 2009

JORDAN, J. H.; THWIN, S. S.; LASH, T. L.; BUIST, D. S. M.; FIELD, T. S.; HAQUE, R.; PAWLOSKI, P. A.; PETERSEN, H. V.; PROUT, M. N.; QUINN, V. P.; YOOD, M. U.; SILLIMAN, R. A.; GEIGER, A. M.: Incident Comorbidities and All-Cause Mortality among Five-Year Survivors of Stage I and II Breast Cancer Diagnosed at Age 65 or Older: A Prospective Matched Cohort Study. *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 146, n° 2. 2014.

JUNG, M. RUSSELL, A. J.; LIU, B.; GEORGE, J.; LIU, P. Y.; LIU, T.; DEFAZIO, A.; BOWTELL, D. D. L.; OBERTHUER, A.; LONDON, W. B.; FLETCHER, J.; HABER, M.; NORRIS, M. D.; HENDERSON, M. J.: A Myc Activity Signature Predicts Poor Clinical Outcomes in Myc-Associated Cancers. *Cancer Research*, vol. 15, n° 77. 2017.

JUNTILLA, M. R.; SAUVAGE, F. J.: Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, vol. 501, n° 19. 2013.

KLEIBL, Z.; KRISTENSEN, V. N.: Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. *The Breast*, vol 28. 2016.

KLUTHCOVSKY, A. C. G. C.; FARIA, T. N. P.; CARNEIRO, F. H.; STRONA, R.: Female breast cancer mortality in Brazil and its regions. *Revista da Associação Médica Brasileira*, vol. 60, n° 4. 2014.

LAM, S. W.; JIMENEZ, C. R.; BOVEN, E.: Breast cancer classification by proteomic technologies: Current state of knowledge. *Cancer Treatment Reviews*, vol 40. 2014.

LANDEGREN, U.; VÅNELID, J.; HAMMOND, M.; NOG, R. Y.; WU, D.; ULLERAS, M.; KAMALI-MOGHADDAM.: Opportunities for sensitive plasma proteome analysis. *Analytical Chemistry*, vol 84, p.1824-1830. 2012.

LATTERICH, M.; ABRAMOVITZ, M.; LEYLAND-JONES, B. Proteomics: new technologies and clinical applications. *European Journal of Cancer*, v. 44, p. 2737- 2741. 2008.

LEAO, R. R. N.; PRICE, A. J.; HAMILTON, R. J.: Germline BRCA mutation in male carriers ripe for precision oncology? *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 2017.

LEBLEU, V. S.; O'CONNELL, J. T.; HERRERA, K. N. G.; WIKMAN, H.; PANTEL, K.; HAIGIS, M. C.; CARVALHO, F. M. D.; DAMASCENA, A.; CHINEN, L. T. D.; ROCHA, R. M.; ASARA, J. M.; KALLURI, R.: PCG1- α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nature Cell Biology*, vol. 16, n° 10, p. 992-1003. 2014

LEE, K.; GILTANE, J. M.; BALKO, J. M.; SCHWARZ, L. J.; GUERRERO-ZOTANO, A. L.; HUTCHINSON, K. E.; NIXON, M. J.; ESTRADA, M. V.; SÁNCHEZ, V.; SANDERS, M. E.; LEE, T.; GÓMEZ, H.; LLUCH, A.; PÉREZ-FIDALGO, J. A.; WOLF, M. M.; ANDREJEVA, G.; RATHMELL, J. C.; FESIK, S. W.; ARTEAGA, C. L.: MYC and MCL1 cooperatively promote chemotherapy-resistant breast cancer stem cells through regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Cell Metabolic*, vol. 26, n° 4. 2017.

LEWIS, R. S.; GEORGE, A.; RUSBY, J. E.: Nipple-sparing mastectomy in women at high risk of developing breast cancer. *Gland Surgery*, vol. 7, n° 3. 2018.

LICHTENSTEIN, P.; HOLM, N. V., VERKASALO, P. K.; ILIADOU, A.; KAPRIO, J.; KOSKENVUO, M.; PUKKALA, E.; SKYTTHE, A.; HMMINKI, K.: Environmental and heritable factors in the causation of cancer: Analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark and Finland. *The New England Journal of Medicine*, vol. 343, n^a 2. 2000.

LIN, X.; CHEN, W.; WEI, F.; TING, M.; WEI, W.; XIE, X.: Night-shift work increases morbidity of breast cancer and all-cause mortality: a meta-analysis of 16 prospective cohort studies. *Sleep Medicine*, vol. 16. 2015.

LIPTON, A.; GOODMAN, L.; LEITZEL, K.; COOK, J.; SPERINDE, J.; HADDAD, M.; KOSTLER, W. J.; HUANG, W.; WEIDLER, J. M.; ALI, S.; NEWTON, A.; FUCHS, E. M.; PAQUET, A.; SINGER, C. F.; HORVAT, R.; JIN, X.; BENERJEE, J.; MUKHERJEE, A.; TAN, Y.; SHI, Y.; CHENNA, A.; LARSON, J.; LIE, Y.; SHERWOOD, T.; PETROPOULOS, C. J. WILLIAMS, S.; WINSLOW, J.; PARRY, G.; BATES, M.: HER3, p95HER2, and HER2 protein expression levels define multiple subtypes of HER2-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 141, n^o 1. 2013.

LORD, S. R.; CHENG, W. C.; LIU, D.; GAUDE, E.; HAIDER, S.; METCALF, T.; PATEL, N.; TEOH, E. J.; GLEESON, F.; BRADLEY, K.; WIGFIELD, S.; ZOINS, C.; MCGOWAN, D. R.; AH-SEE, M. L.; THOMPSON, A. M.; SHARMA, A.; BIDAUT, L.; POLLAK, M.; ROY, P. G.; AVERS, F.; SNELL, C.; ROXANIS, J.; FREZZA, C.; FENWICK, J. D.; BUFFA, F. M.; HARRIS, A. L.: Integrated pharmacodynamic analysis identifies two metabolic adaption pathways to metmorfin in breast cancer. *Cell Metabolic*, vol. 28, n^o 5, p. 679-688. 2018

LUCENAY, K. S.; DOOSTAN, I.; KARAKAS, C.; BUI, T.; DING, Z.; MILLS, G. B.; HUNT, K. K.; KEYOMARSI, K.: Cyclin E associates with the lipogenic enzyme ATP-citrate lyase to enable malignant growth of breast cancer cells. *Cancer Research*. 2016.

LUIS, C.; DUARTE, F.; FARIA, I.; JARAK, I.; OLIVEIRA, P. F.; ALVES, G. M.; SOARES, R.; FERNANDES, R.: Warburg effect inversion: Adiposity shifts central primary metabolism in MCF-7 breast cancer cells. *Life Science*, vol. 15, n^o 223, p. 38-46. 2019.

KARLSSON, R.; GONZALES-SILES, L.; BOULUND, F.; SYENSSON-STADLES, L.; SKOVBJERG, S.; KARLSSON, A.; DAVIDSON, M.; HULTH, S.; KRISTIANSOON, E.; MOORE, E. R. B.: Proteotyping: Proeomic characterization, classification and identification of microorganisms – A prospectus. *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 38. 2015.

KAUR, U.; JOHNSON, D. T.; CHEA, E. E.; DEREDGE, D. J.; ESPINO, J. A.; JONES, L. M.: Evolution of Strutural biology though the Lens of Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, vol. 91. 2019.

MAHONEY, M. C.; BEVERS, T.; LINOS, E.; WILLETT, W.; C.: Opportunities and Strategies for Breast Cancer Prevention Through Risk Reduction. *A Cancer Journal of Clinicians*, vol. 58. 2008

MAO, Y.; KELLER, E. T.; GARFIELD, D. H.; SHEN, K.; WANG, J.: Stroma cell in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 32. 2013.

MEIRA, K. C.; GUIMARÃES, R. M.; SANTOS, J. D.; CABRELLI, R.: Análise de efeito idade-período-coorte na mortalidade por câncer de mama no Brasil e regiões. *Pan American Journal of Public Health*, vol. 37, nº 6. 2015.

MELCHOR, L.; BENÍTEZ, J.: The complex genetic landscape of familial breast cancer. *Human Genetics*, vol. 132. 2013.

MITTAL, S.; BROWN, N. J.; HOLEN, I.: The breast tumor microenvironment: role in cancer development, progression and response to therapy. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 18, nº 3. 2018.

MONACO, M. E.: Fatty acid metabolism in breast cancer subtypes. *Oncotarget*, vol. 8, nº 17. 2017.

MORENO-SÁNCHEZ, R.; RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S.; MARÍN-HERNÁNDEZ, A.; SAAVEDRA, E.: Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS Journal*, vol. 6. 2007.

MUÑOZ, J.; HECK, A. J. R.: From the human genome to the human proteome. *Angewandte Chemie*, vol. 5, p.10864–10866. 2014.

NEVE, R. M.; CHIN, K.; FRIDLYAND, J.; YEH, J.; BAEHNER, F. L.; FEVR, T.; NUSHTAEVA, A. A.; STEPANOV, G. A.; SEMENOV, D. V.; JURAVLEV, E. S.; BALAHONOVA, E. A.; GERASIMOV, A. V.; SIDOROV, S. V.; SAVELYEV, E. I.; KULIGINA, E. V.; RICHTER, V. A.; KOVAL, O. A.: Characterization of primary normal and malignant breast cancer cell and their response to chemotherapy and immunostimulatory agents. *BMC Cancer*, vol. 18. 2018.

NOWSHEEN, S.; AZIZ, K.; PANAVIOTIDIS, M. I.; GEORGAKILAS, A. G.: Molecular markers for cancer prognosis and treatment: Have we struck gold? *Cancer Letters*, vol 327. 2012.

OKUMURA, T.; IKEDA, K.; UJIHIRA, T.; OKAMOTO, K.; HORIE-INOUE, K.; TAKEDA, S.; IONUE, S.: Proteasome 26s subunit PSMD1 regulates breast cancer cell growth through p53 protein degradation. *Journal of Biochemistry*, vol. 163, nº 1, p. 19-29. 2018.

OKUR, E.; YERLIKAYA, A.: A novel and effective inhibitor combination involving bortezomib and OTSSP167 for breast cancer cells in light of label-free proteomic analysis. *Cell Biology Toxicology*. 2018.

OMS, Organização Mundial da Saúde (World Health Organization). Disponível em: <https://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>. Acessado em 20 de julho de 2018.

PANIS, C.; PIZZATTI, L.; CORRÊA, S.; BINATO, R.; LEMOS, G. F.; HERRERA, A. C. S. A.; SEIXAS, T. F.; CECCHINI, R.; ABDELHAY, E.: The positive is inside the negative: HER2-negative tumors can express the HER2 intracellular domain and present a HER2-positive phenotype. *Cancer Letters*, vol. 357, nº1. 2015.

PAVIA, D. L. et al.: *Introdução à Espectroscopia*, EDITORA. Cengage Learning, 2010.

PIERCE, B. L.; KRAFT, P.; ZHANG, C.: Mendelian Randomization Studies of Cancer Risk: a Literature Review. *Cancer Epidemiology*. 2018.

PLUTA, P.; SMOLEWSKI, P.; PLUTA, A.; CEBULA-OBZUT, B.; WIERZBOWSKA, A.; VEJC, D.; ROBAC, T.; KORDEK, R.; GOTTWALD, L.; PIEKARSKI, J.; JERIORZSKI, A.: Significance of Bax expression. In breast cancer patients. Polish Journal of Surgery, vol. 83, n° 10, p. 549-553. 2011

POLAYK K.: Breast cancer: origins and evolution. Journal of Clinical Investigation, vol. 117. 2007.

PRANT, A.; KARGINOVA, O.; PARKER, J. S.; FAN, C.; HE, X.; BIXBY, L.; HARRELL, J. C.; ROMAN, E.; ADAMO, B.; TROESTER, M.; PEROU, C. M.: Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. Breast Cancer Research and Treatment, vol. 142. 2013.

QIAN, W.; WANG, J.; HOUTEN, B.: The role of dynamin related protein-1 and implication for breast cancer treatment. Expert Opinion on Therapeutic Targets, vol. 17, n° 9. 2013.

REN, J. G.; SETH, P.; YE, H.; GUO, K.; HANAI, J. I.; HUSAIN, Z.; SUKHATME, V. P.: Citrate suppresses tumor growth in multiple models through inhibition of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle and the IGF-1R pathway. Scientific Reports, vol. 7. 2017.

REN, J.; WANG, B.; LI, J.: Integrating proteomic and phosphoproteomic data for pathway analysis in breast cancer. BMC Systems Biology, vol. 12. 2018.

RIVERA-FRANCO, M. M.; LEON-RODRIGUES, E.: Delays in Breast Cancer Detection and Treatment in Developing Countries. Breast Cancer: Basic and Clinical Research, vol. 12. 2018.

RODRIGUES-RIBEIRO, L.; MELO-BRAGA, M. N.; KJELDSSEN, F.; GÓMES-MENDOZA, D. P.; VERANO-BRAGA, T.: Assessment of protein extraction and digestion efficiency of well-established shotgun protocols for heart proteomics. Analytical Biochemistry, vol. 578. 2019.

SANTIDRIAN, A. F.; MATSUNO-YAGI, A.; RITLAND, M.; SEO, B. B.; LEBOEUF, S. E.; GAY, L. J.; YAGI, T.; FELDING-HABERMANN, B.: Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression. The Journal of Clinical Investigation, vol. 123, n° 3. 2013.

SANTOS, M.; CORREIRA-GOMES, C.; MARCOS, R.; SANTOS, A.; MATOS, A.; LOPES, C.; DIAS-PEREIRA, P.: Value of the nottingham histological grading parameters and nottingham prognostic index in canine mammary carcinoma. Anticancer Research, vol. 35. 2015.

SARKAR, F. H.; RAHMAN, K. M. W.; LI, Y.: Bax translocation to mitochondria is an important event in inducing apoptotic cell death by indole-3-carbinol (I3C) treatment of breast cancer cells. The Journal of Nutrition, vol. 133. 2003.

SHRIVASTAVA, A.; KUZONTKOSK, P. M.; GROOPMAN, J. E.; PRASAD, A.: Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-

talk between apoptosis and autophagy. *Molecular Cancer Therapy*, vol. 10, n° 7, p. 1161-1172. 2011

SIKANDAR, B.; QURESHI, M. A.; MIRZA, T.; KHAN, S.; AVESI, L.: Differential immune cell densities in ductal carcinoma In-Situ and invasive breast cancer: Possible role of leukocytes in early stages of carcinogenesis. *Pakistan Journal Medical Science*, vol. 31, n° 2. 2015.

SIMS, A. H.; HOWELL, A.; HOWELL, S. J.; CLARKE, R. B.: Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nature Clinical Practice Oncology*, vol. 4, n° 9. 2007.

SOTGIA, F.; WHITAKER-MENEZES, D.; MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E.; SALEM, A. F.; TSIRIGOS, A.; LAMB, R.; SNEDDON, S.; HULIT, J.; HOWELL, A.; LISANTI, M. P.: Mitochondrial “fuel” breast cancer metabolism: Fifteen markers of mitochondrial biogenesis label epithelial cancer cells, but are excluded from adjacent stromal cells. *Cell Cycle Landes Bioscience*, vol. 11, n° 23. 2012.

STRANSKY, L.; COTTER, K.; FORGAC, M.: The function of V-ATPases in cancer. *Physiological Reviews*, vol. 93, n° 3, p. 1071-1091. 2016.

SUN, X.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; YANG, Q.; ZHAO, S.: Caspases-dependent mitochondrial apoptotic pathway is involved in astilbin-mediated cytotoxicity in breast carcinoma cells. *Oncology Report*, vol. 40, n° 4, p. 2278-2286. 2018.

SUN, Y. S.; ZHANG, Z.; YANG, Z. N.; XU, F.; LU, H. J.; ZHU, Z. Y.; SHI, W.; JIANG, J.; YAO, P. P.; ZHU, H. P.: Risk factors and preventions of breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*, vol. 13. 2017.

SUZUKI, H.; ITOH, F.; TOYOTA, M.; KIKUCHI, T.; KAKIUCHI, H.; IMAI, K.: Inactivation of the P sigma gene in associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers. *Cancer Research*, vol. 60. 2000.

SZUTOWICZ, A.; KWIATKOWSKI, J.; ANGILSKI, S.: Lipogenetic and glycolytic enzyme activities in carcinoma and non-malignant diseases of the human breast. *British Journal of Cancer*, vol. 39. 1979.

TANG, K.; YU, Y.; ZHU, L.; XU, P.; CHEN, J.; MA, J.; ZHANG, H.; FANG, H.; SUN, W.; ZHOU, LI.; WEI, K.; LI, F.; LV, J.; XIE, J.; LIU, Y.; HUANG, B.: Hypoxia-reprogrammed tricarboxylic acid cycle promotes the growth of human breast tumorigenic cells. *Oncogene*, vol. 38. 2019.

TAVERNER, T. KARPIEVITCH, Y. V.; POLPITIVA, A. D.; BROWN, J. N.; DABNEY, A. R.; ANDERSON, G. A.; SMITH, R. D.: DanteR: an extensible R-based tool for quantitative analysis of omics data. *Bioinformatics*, vol. 28, n° 8, p. 2404-2406. 2012.

TESVETKOV, P.; ADLER, J.; MYERS, N.; BIRAN, A.; REUVEN, N.; SHAUL, Y.: Oncogenic addiction to high 26s proteasome level. *Cell Death and Disease*, vol. 9, n° 773. 2018.

TERP, M. G.; LUND, R. R.; JENSEN, O. N.; LETH-LARSEN, R.; DITZEL, H. J.: Identification of markers associated with highly aggressive metastasis phenotypes using quantitative comparison proteomic. *Cancer, Genomic and Proteomic*, vol. 9. 2012.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A.: Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer Journal of Clinical*, vol. 65. 2015.

TRAINER, A. H.; LEWIS, C. R.; TUCKER, K.; MEISER, B.; FRIEDLANDER, M.; WARD, R. L.: The role of BRCA mutation testing in determining breast cancer therapy. *Nature*, vol. 7. 2010.

TYANOVA, S.; ALBRECHTSEN, R.; KRONQVIST, P.; COX, J.; MANN, M.; GEIRGER, T.: Proteomic maps of breast cancer subtypes. *Nature Communications*. 2015.

TYANOVA, S.; TEMU, T.; SINITYCYN, P.; CARLSON, A.; HEIN, M. Y.; GEIGER, T.; MANN, M.; COX, J.: The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods*, vol. 13, nº 9, p. 731-740. 2016

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERES, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G.; SMITH, H. O. et al.: The sequence of the human genome. *Science*, vol. 291. 2001.

VIEIRA, R. A. C.; BILLER, G.; UEMURA, G.; RUIZ, C. A.; CURADO, M. P.: Breast cancer screening in developing countries. *Clinics*, vol. 04, nº 09. 2017.

WANG, T.; FAHRMANN, J. F.; LEE, H.; LI, Y. J.; TRIPATHI, S. C.; YUE, C.; ZHANG, C.; LIFSHITZ, V.; SONG, J.; YUAN, Y.; SOMLO, G.; JANDIAL, R.; ANN, D.; HANASH, S.; JOVE, R.; YU, H.: JAK/STAT3-Regulated Fatty Acid β -Oxidation Is Critical for Breast Cancer Stem Cell Self-Renewal and Chemoresistance. *Cell Metabolism*, vol. 27, nº 1. 2018.

WARBURG, O.; WIND, F.; NEGELEIN, E.: The metabolism of tumors in the body. *The Journal of general physiology*, vol. 8, nº 6, p. 519-530. 1927.

XIA, X.; LIAO, Y.; GUO, Z.; LI, Y.; JIANG, L.; ZHANG, F.; HUANG, C.; LIU, Y.; WANG, X.; LIU, N.; LIU, J.; HUANG, H.: Targeting proteasome-associated deubiquitinases as a novel strategy for the treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogenesis*, vol. 7. 2018.

ZACKSENHAUS, E.; SHRESTHA, M.; LIU, J. C.; VOROBIEVA, I.; CHUNG, P. E. D.; JU, Y. NIR, U.; JIANG, Z.: Mitochondrial OXPHOS induced by RB1 deficiency in breast cancer: Implications for anabolic metabolism, stemness, and metastasis. *Trends in Cancer Cell Press Reviews*. 2017.

ZAHANG, Y. J.; CHEN, Y. Y.; CHEN, D. T.; JIANG, Y.; HAUANG, W.; OUYANG, H. D.; XING, W.: Impact of preoperative anemia on relapse and survival in breast cancer patients. *BMC Cancer*, vol. 14. 2014.

ZAIDI, N.; SWINNEN, J. V.; SMANS, K.: ATP-Citrate Lyase: A Key Player in Cancer Metabolism. *Cancer Research*, vol 72. 2012.

ZANG, F.; WEI, X.; SUN, B.: Relationship of c-FLIP(L) protein expression with molecular subtyping and clinical prognosis in invasive breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 18. 2014.

ZEIDAN, B. A.; TOWNSEND, P. A.; GARBIS, S. D.; COPSON, E.; CUTRESS, R. I.: Clinical proteomics and breast cancer. *The Surgeon, Journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland*, vol. 13. 2015.

ZENG, Y.; CAO, Y.; LIU, L.; ZHAO, J.; ZHANG, T.; XIAO, L.; JIA, M.; TIAN, Q.; YU, H.; CHEN, S.; CAI, Y.: SEPT9i1 regulates human breast cancer cell motility through cytoskeletal and RhoA/FAK signaling pathway regulation. *Cell Death and Disease*, vol. 10, n° 10. 2019.

ZOGRAFOS, E.; ANAGNOSTOPOULOS, A. K.; PAPADOPOULOU, A.; LEGAKI, E.; ZOGOURI, F.; MARINOS, E.; TASANGAR, G. T.; GAZOULI, M.: Serum Proteomic Signatures of Male Breast Cancer. *Cancer Genomics and Proteomics*, vol. 19. 2019.

ZOU, P.; LIU, L.; ZHENG, L. D.; PAYNE, K. K.; MANJILI, M. H.; IDOWU, M. O.; ZHANG, J.; SCHMELZ, E. M.; CHENG, Z.: Coordinated upregulation of mitochondrial biogenesis and autophagy in breast cancer cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016. 2016.

ANEXO 1

Manuscrito do trabalho para publicação.

Proteomic study of triple negative breast cancer cell lines at different tumorigenic stages reveals a divergent reprogramming metabolism

Fabio Henrique Guimarães Braga^{1,2}; Diana Paola Gómez-Mendoza²; Rafael Pereira Lemos²; Lucas Rodrigues-Resende²; Andréia Laura Prates Rodrigues¹; Vladimir Gorshkov³; Frank Kjeldsen³; Jader Santos Cruz^{1,#}; Thiago Verano-Braga^{2,#}

¹Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 31270-901, Brazil.

²Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 31270-901, Brazil.

³Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense, 5230, Denmark.

#Corresponding authors:

Jader Santos Cruz. Phone: +55 31 3409 2668. Email: jcruz@ufmg.br

Thiago Verano-Braga. Phone: +55 31 3409 3070. Email: tvbraga@ufmg.br

Abstract

Breast cancer is the leading type of cancer. The triple negative is the most aggressive type of breast cancer, as it is resistant to several treatments as hormone based, for example. Cell metabolism is altered in cancer cells as they favor anaerobic pathways to produce energy in a faster pace and in accordance with the hypoxic environments found inside tumor mass, which is known as the Warburg effect. In this study, we sought to investigate the molecular mechanisms behind the different cell phenotypes during tumorigenesis. To pursue this goal, we employed proteomics in four types of cells; the non-tumorigenic epithelial cell MCF-10A, two triple negative breast cancer originated from primary tumor sites (MGSO-3 and MACL-1), and the metastatic tumor cell line MDA-231-MD. Our proteomic data shown that most proteins associated with the TCA cycle and oxidative phosphorylation (aerobic metabolic phase) were upregulated in primary cells while downregulated in metastatic cell, in line with a negative regulation of the Warburg effect for the primarily cells. We also shown that these cells have lower mitochondria density and upregulation of pro-apoptotic proteins when compared with metastatic cells. Molecular differences highlighted in this study may assist the scientific community in developing new protocols to treat the triple negative breast cancer.

INTRODUCTION

Unconsolidated data from the Global Cancer Statistics 2020 estimates that the breast cancer was the leading type of cancer diagnosed in 2020, accounting for 2,261,419 new cases worldwide and 684,996 deaths [1]. A paradox in mortality associated with breast cancer is currently seen as deaths are decreasing in the higher income countries while mortality associated with this disease is increasing in the low- and mid-income countries [2]. This phenomenon is attributed to early detection and state-of-the-art treatment for patients in the European Union and North America, for example, which seem to be lacking in South America, Africa and Asia, for example, together with populational aging and changes in lifestyle [2, 3].

Breast cancer is a heterogeneous disease that can be divided based on cell molecular profile as triple negative [4] and others [5]. Triple-negative breast cancers are represented by tumor cells lacking the expression of the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2). Triple-negative cancers are aggressive, highly invasive, and difficult to treat as they are tolerant to known breast cancer treatments as endocrine therapy or trastuzumab. Chemotherapy is the only available treatment, though prognosis is usually worse than other types of breast cancer [6].

Tumor cell undergoes a metabolic remodeling favoring anaerobic rather than aerobic oxidation (Warburg effect), which is ideal for energy production in the hypoxic microenvironment in tumor mass [7]. This metabolic shift is considered an interesting target for treatment and, thus, this process deemed to be understood better, mainly at the molecular level. In this study, we sought to evaluate the molecular grounds of the metabolic remodeling during tumorigenesis of triple negative breast cancer cells. We performed a comparative proteome analysis of a non-tumorigenic epithelial cells (MCF-10A), two cell lines isolated from breast cancer primary sites [8] (MGSO-3 and MACL-1) and expressing a triple negative phenotype [9], and metastatic cells (MDA-231-MD). We were able to map most enzymes involved in the beta oxidation, citric acid cycle and oxidative phosphorylation. Our proteomic data shown a molecular signature consistent with a positive Warburg effect for the metastatic cells and a negative Warburg effect for the primary cancer cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Non-tumor cell line (MCF-10A), primary tumor cell line (MGSO-3 and MACL-1) and metastatic tumor cell line (MDA-231-MD) were grown in DMEM (Sigma Chemical Co.) supplemented with sodium bicarbonate 1.2 g/L, 10% bovine fetal serum (Cultilab) and 1% solution 5 mg/dL penicillin/streptomycin in saline 0.9%, at 37°C with 5% CO₂. After reaching a cell monolayer with >90% confluence, cells were washed 3 times with phosphate buffer (PBS), pH 7.4, subsequently washed with sterile saline solution 3 times. Each cell type was harvested and collected in low-binding tubes (Eppendorf) in the presence of 1 mL of a solution containing protease inhibitor (mini EDTA-free complement, Roche). The cells were centrifuged at 3000xg for 5 minutes, the supernatant was removed, and the cells were kept at -70°C until further use.

Cell lysis and protein digestion

Cell lysis, protein extraction, reduction and alkylation of thiol groups were achieved in a single step essentially as previously described [10]. Briefly, 50 µL of lysis buffer (urea 6M, thiourea 2M, tris hydrochloride (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) 10mM, chloroacetamide 40 mM, and triethylammonium bicarbonate (TEAB) 20 mM) was added to each sample. Tip sonication - on ice to avoid sample heating - was used to shear DNA filaments and enhance cell lysis. Then, the samples were incubated for 2h at room temperature. Protein quantification was performed by fluorescent method (Qubit, Thermo). Samples were diluted 10 times with TEAB 20 mM and incubated (1:50 enzyme/protein ratio) with Lys-C (Wako) for 2 hours in room temperature. Trypsin (Promega) was added (1:50 enzyme/protein ratio) and the samples were incubated for 16h at room temperature. Reaction was quenched with TFA (final concentration of 1%), and the samples were desalted using C18 ZipTip Pipette Tips (Millipore) using the manufacturer's protocol. A sample reference pool was prepared by combining the same amount of peptides from each cell line used in this study. Samples were kept at 20°C until further use.

Peptide labeling and sample pre-fractionation

The TMT 10plex (Thermo) was used to label 25 µg from each experimental condition (MCF-10A, MGSO-3, MACL-1, MDA-231-MD, and Samples Pool) as the manufacturer's protocol. Samples were combined in equal amount and subjected to offline high-pH reverse-phase pre-fractionation. Samples were resuspended in ammonium formate 20 mM (pH 10) and loaded in the Sep-Pak SPE (Waters) equilibrated previously with ammonium formate 20 mM (pH 10). On-column samples were washed 3 times with ammonium formate 20 mM (pH 10). Samples were eluted with acetonitrile at 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15%, 17.5%, 20%, 22.5%, 25%, 27%, 30%, 50% or 95% and collected in 8 concatenated fractions. Samples were dried down using a vacuum centrifuge and stored at -20°C until further use.

Mass spectrometry analysis

Samples were resuspended in 0.1% acid formic (solvent A) and loaded in a pre-column (3 cm long x 100 µm inner diameter) packed with the resin Reprosil-Pur C18-AQ (5µm particle size) using the EasyLC HPLC system (Thermo) at 20 µl/min. Peptide separation was achieved in the analytical (20 cm long x 75 µm inner diameter) reverse-phase column packed with the resin Reprosil-Pur C18-AQ (3µm particle size) using the following gradient, expressed as the percentage (%) of solvent B (0.1% formic acid in 95% acetonitrile): (i) 1–3% solvent B in 3 min, (ii) 3–28% solvent B in 45 min, (iii) 28–45% solvent B in 10 min, and (iv) 45–100% solvent B in 3 min. The flow was kept constant at 0.25 µL/min. Eluted peptides were analyzed online in the mass spectrometer Q Exactive HF (Thermo). The instrument was operated in the positive polarity and in the data-dependent acquisition (DDA) mode. The peptide ions were accumulated until 3×10^6 ions or 120ms, and scanned out in the orbitrap using 120,000 resolution at m/z 200 Th. The 20 most intense ions (Top20) were selected in the quadrupole (m/z 1.2 Th isolation width) for HCD fragmentation (32% normalized collision energy). Fragment ions were accumulated for up to 1×10^5 ions or 120 ms, and analyzed in the orbitrap using 60,000 resolution at m/z 200 Th. Selected ions were included in the dynamic exclusion list for 15 s.

Statistical and bioinformatic analyses

Mass spectra were researched using the MaxQuant software (version 1.6.1.0). The search parameters were as follows. Search tolerance for first peptide set at 20 ppm

and for main peptide set at 4.5 ppm. Lys-C and trypsin were selected allowing up to two missed cleavages. Carbamidomethyl (Cys) was defined as fixed modification. Oxidation (Met) and acetyl (N-terminal protein) were defined as variable modifications. Peptide FDR was defined as < 1%. We only analyzed proteins quantified in the four replicates. Protein intensity has been transformed into log₂ and normalized using median values. We used one-way ANOVA and regulated proteins were considered when $P < 0.05$) and 1.3-fold change. The Volcano plots and the heat maps were done using the DanteR (<https://omics.pnl.gov/software/danter>). Venn diagrams were done using the Biovenn (<http://www.biovenn.nl>). Gene ontology was determined using DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) and the Cytoscape (<https://cytoscape.org/>). Protein interaction maps were done using the String (<http://www.string-db.org>).

Data availability

"The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [11] partner repository with the dataset identifier PXDXXXXXX".

Western blot analysis

Cell samples were homogenized in RIPA Lysis Buffer (Millipore, Darmstadt, Germany) with protease inhibitors and centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4 °C. Lowry assay was performed for total protein quantification. Then, protein samples were fractionated in a 10% SDS-PAGE gel and transferred to PVDF membrane. Membranes were blocked in 5% non-fat milk in PBS buffer (50 mmol/l, pH 7.4) with 0.1% Tween-20 and probed with primary antibody overnight: anti-β actin, and anti-GAPDH (1:1000; respectively; Abcam, SF USA). The signal was detected using the Luminata reagent (Amersham Biosciences, Bucks, UK) and immunoreactive proteins detected by chemiluminescence (ImageQuant LAS 4000, General Electric, MA, USA).

Mitochondria density assessments

Cells were grown in T25 bottles until the 15th passage with >90% confluence. Cells were washed 3 times with PBS buffer and cultured in DMEM medium without supplementation of fetal bovine serum for 24 hours to synchronize the cell cycle at G₀ / G₁ stage. Cells were washed 3 times with PBS and incubated with the MitoTracker

green fluorophore (Thermo) at 150 mM for 30 minutes, followed by trypsinization and fixation with 4% paraformaldehyde, following the manufacturer's protocol. Cells were also fixed without adding the fluorophore to determine their size and granularity profile. The samples were analyzed in triplicate. Each time, 10,000 events were acquired, using the BD FACSCanto II with argon laser with excitation of 488 nm (15mW). The BD FACSCelquest software was used to acquire the images.

RESULTS

Experimental design used to identify the proteins associated with the cellular metabolism from cell lines at different tumorigenic steps of triple negative breast cancer

The aim of this study was to investigate key proteins involved with the metabolism of breast cancer cell lines at different tumorigenic stages. To pursue our goal, we compared the proteome of MCF-10A (normal epithelial cells), MGSO-3 and MACL-1 (both primary breast cancer cells lines) [8], and MDA-231-MD (metastatic cells) (Figure 1A). In total, our proteomic strategy allowed the identification of 3,008 proteins. As shown in the principal component analysis (PCA) plot, the pool datasets grouped nicely in the center of the plot, indicating that indeed they represent an equimolar protein composition from all four cell lines used in this study (Figure 1B). It is also possible to observe in this figure that all 4 replicates from each cell line grouped together in the PCA, indicating a good experimental reproducibility. The proteome of the primary cancer cells (MGSO-3 and MACL-1) are more similar than the proteome of the metastatic cell (MDA-231-MD) and normal cell (MCF-10A). The heat map also indicates that the regulation profile of the MGSO-3 and MACL-1 proteomes are more similar compared with the MDA-231-MD dataset, which reflects on these two datasets grouped closer in the column dendrogram (Figure 1C).

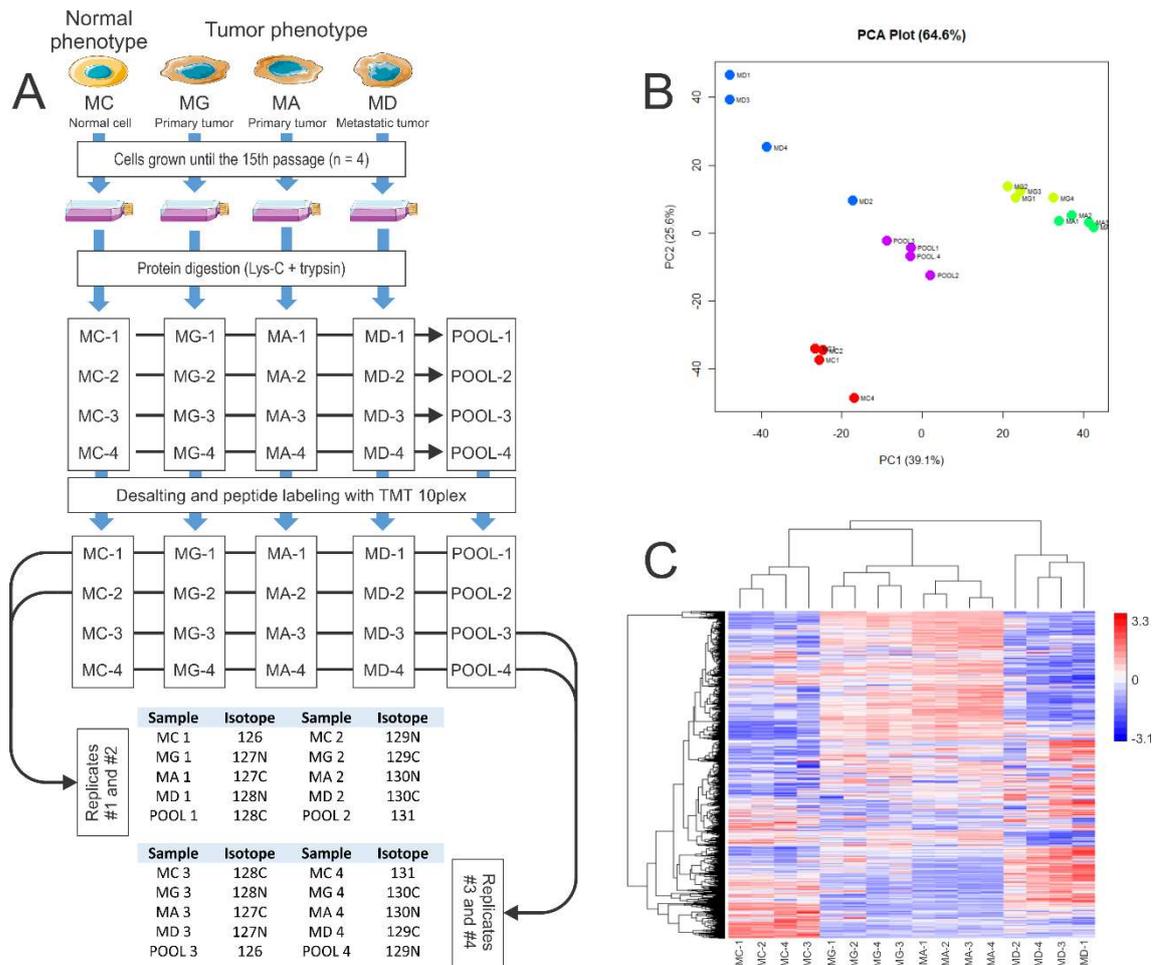


Figure 1. Proteomics workflow. (A) Schematic representation of the sample preparation (cell lysis, protein digestion and peptide labeling) for quantitative proteomics employed in this study. The pool represents an equimolar mixture of proteins from each cell line used. (B) Principal component analysis (PCA) of the datasets. Note the pool datasets in the center of the plot, which reflects their nature (equimolar mixture of all proteomes), and how MG and MA datasets grouped closer in the plot. (C) Heat map representing the log₂-transformed ratio of the proteins (rows) identified in this study. Proteins from the pool datasets were used as reference. Each column represents an experimental condition (cell line). Numbers associated with cell line abbreviations indicate the replicate number. MC: MCF-10A (non-tumorigenic epithelial cells); MG: MGSO-3 (primary breast cancer cell line); MA: MACL-1 (primary breast cancer cell line); MD: MDA-231-MD (metastatic breast cancer cell line).

Pathway analysis highlights important proteins for the breast cancer cell metabolism

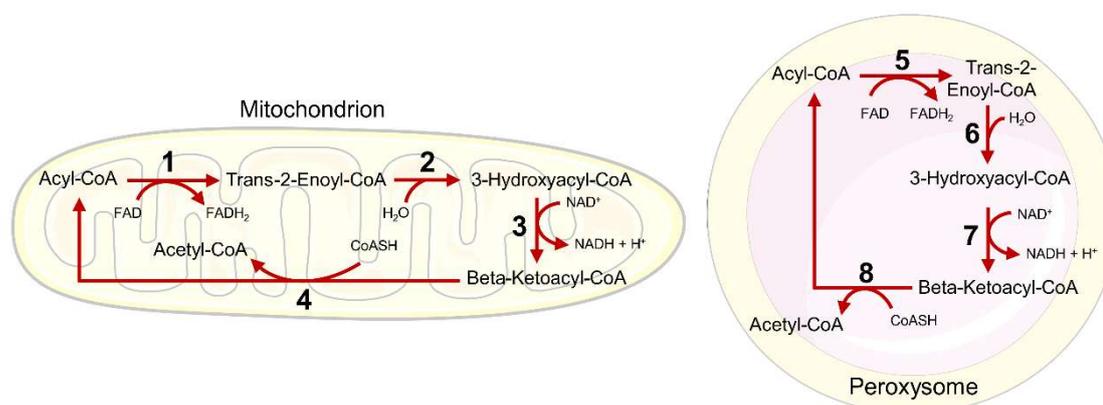
We performed a pathway enrichment analysis using the regulated proteins (ANOVA p -value < 0.05 and $-0.38 < \log_2 \text{fold-change} > 0.38$) from all datasets. Table I represents the most confident KEGG terms associated with the regulated proteins found in this study. The terms were sorted based on the p -values. As mentioned before, we were particularly interested in studying the abundance behavior of proteins associated with energy metabolism across the cell lines used in this study, which roughly reflects the triple negative breast cancer tumorigenic process. Canonical energy metabolic processes associated the most with our datasets, which we shall discuss in more details in this manuscript, were “citrate cycle (TCA cycle)” (P -value = $1.60E-11$), “oxidative phosphorylation” (P -value = $2.70E-11$), “glycolysis / gluconeogenesis” (P -value = $4.10E-07$), “fatty acid degradation” (P -value = $2.10E-04$), and “fatty acid metabolism” (P -value = $3.70E-04$). A list of all proteins associated with these KEGG terms, including their abundances across MCF-10A, MGSO-3, MACL-1, MDA-231-MD can be found in the Supporting Information. In the next sections we will present the proteomic data regarding each KEGG term in more details.

Table I – Top-scoring KEGG pathways related to the regulated datasets.

KEGG Term	Count	%	P-value	Benjamini
Ribosome	87	4.7	2.00E-38	5.40E-36
Spliceosome	65	3.5	6.30E-20	8.70E-18
Carbon metabolism	56	3.0	1.40E-17	1.30E-15
Biosynthesis of antibiotics	82	4.4	2.80E-17	1.90E-15
Protein processing in endoplasmic reticulum	69	3.7	6.10E-16	3.40E-14
Proteasome	31	1.7	1.90E-15	8.70E-14
Huntington's disease	72	3.9	2.60E-14	1.00E-12
Citrate cycle (TCA cycle)	22	1.2	1.60E-11	5.50E-10
Ribosome biogenesis in eukaryotes	40	2.1	2.30E-11	7.10E-10
Oxidative phosphorylation	52	2.8	2.70E-11	7.40E-10
Parkinson's disease	54	2.9	3.70E-11	9.20E-10
RNA transport	60	3.2	1.50E-10	3.50E-09
Biosynthesis of amino acids	33	1.8	1.90E-09	4.10E-08
Alzheimer's disease	53	2.8	9.80E-08	1.90E-06
Glycolysis / Gluconeogenesis	28	1.5	4.10E-07	7.60E-06
Protein export	14	0.7	4.90E-06	8.40E-05
Valine, leucine and isoleucine degradation	20	1.1	2.10E-05	3.30E-04
Pathogenic Escherichia coli infection	21	1.1	2.10E-05	3.30E-04
Pyruvate metabolism	18	1.0	2.60E-05	3.70E-04
Endocytosis	61	3.3	3.10E-05	4.30E-04
Metabolic pathways	230	12.3	4.60E-05	6.00E-04
Phagosome	41	2.2	1.40E-04	1.70E-03
Fatty acid degradation	17	0.9	2.10E-04	2.50E-03
Propanoate metabolism	13	0.7	3.70E-04	4.10E-03
Fatty acid metabolism	18	1.0	3.70E-04	4.10E-03
Vasopressin-regulated water reabsorption	17	0.9	3.90E-04	4.20E-03
DNA replication	15	0.8	4.10E-04	4.20E-03
mRNA surveillance pathway	27	1.4	6.40E-04	6.30E-03
Bacterial invasion of epithelial cells	24	1.3	8.00E-04	7.60E-03
Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	38	2.0	1.40E-03	1.30E-02
2-Oxocarboxylic acid metabolism	9	0.5	1.70E-03	1.50E-02
Fatty acid elongation	11	0.6	2.10E-03	1.80E-02
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	20	1.1	3.00E-03	2.50E-02
RNA degradation	22	1.2	3.80E-03	3.10E-02

Regulation profile of proteins associated with the fatty acid metabolism in MCF-10A, MGSO-3, MACL-1, MDA-231-MD cell lines

Proteins involved in the hydrolysis of fatty acids were found differentially regulated in all cell lines used in this study but we observed a distinct regulation profile, which correlates with the breast cancer cell phenotype (i.e., primary or metastatic). Figure 2 represents the β -oxidation canonical pathways. We were able to quantify most key enzymes associated with this important ATP production process. Interestingly, we observed that most proteins involved in this process were downregulated in primary cancer cells (MGSO-3 and MACL-1) while opposite regulation profile was observed for the proteins of the metastatic cell (MDA-231-MD). Data suggest that the β -oxidation in mitochondria is more active in MDA-231-MD than in MGSO-3 and MACL-1 cells.



#	Enzyme (Gene)	ID (Protein)	MC			MG			MA			MD		
			(log-ratio)	(pval)	Reg.									
1	ACADL	P28330	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
2	ECHS1	P30084	0.4337	8.95E-05	*	-0.4540	6.31E-05	*	-0.5056	2.01E-05	*	0.2818	3.93E-03	
3	HADH	Q16836	0.3028	1.92E-02		-0.4631	7.97E-04	*	-0.6904	2.52E-05	*	0.6186	7.97E-05	*
4	ACAA2	P42765	-0.3362	1.03E-01		0.6233	5.42E-03	*	-0.1463	4.61E-01		0.6557	4.05E-03	*
5	ACOX1	Q15067	0.1031	5.19E-01		-0.3146	6.22E-02		-0.2109	1.97E-01		-0.6105	1.39E-03	*
6	HSD17B4	P51659	0.5838	2.04E-09	*	-0.3003	9.70E-06		-0.1572	3.85E-03		-0.6998	1.62E-10	*
7	EHHADH	Q08426	ND	ND										
8	ACAA1	P09110	0.5407	2.75E-03	*	-0.8432	5.27E-05	*	-1.1264	2.04E-06	*	-0.5117	4.08E-03	*

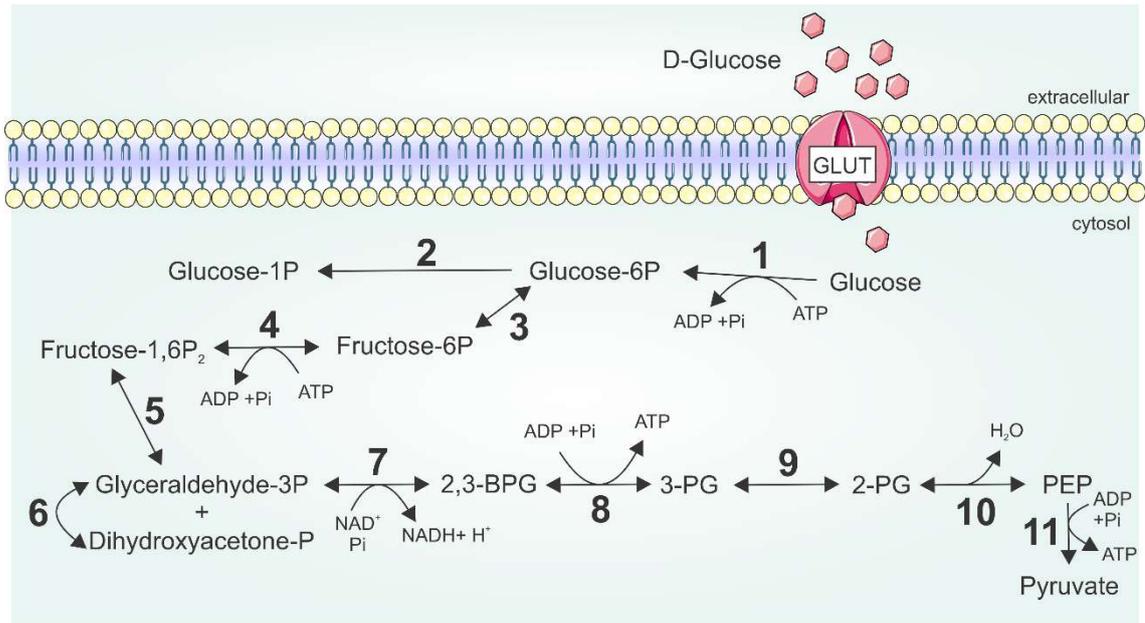
Figure 2. Regulation profile of the proteins associated with the β -oxidation across the cell lines. Schematic representations of the β -oxidation pathways in mitochondria and peroxisomes (upper panel). Each number indicates a key enzyme involved with the represented reaction. Experimental quantitative information of each enzyme represented in the pathways are provided in the table (lower panel). Asterisks (*) denote regulated proteins. Regulation cutoff is $P < 0.05$ and \log_2 -ratio < -0.38 (downregulated) or \log_2 ratio > 0.38 (upregulated). Reg.: Regulated; ND: not detected; MC: MCF-10A (non-tumorigenic epithelial cells); MG: MGSO-3 (primary breast cancer cell line); MA: MACL-1 (primary breast cancer cell line); MD: MDA-231-MD (metastatic breast cancer cell line).

Regulation profile of proteins associated with the glucose metabolism in MCF-10A, MGSO-3, MACL-1, MDA-231-MD cell lines

We mapped most key enzymes involved with the glycolysis and gluconeogenesis (Figure 3), citric acid cycle (Figure 5), and oxidative phosphorylation (Figure 6) using our proteomic approach.

Regarding the glycolysis and gluconeogenesis, most enzymes were found upregulated in the cancer cell lines, mainly in the MGSO-3 (primary cells) and the MDA-231-MD (metastatic cells), compared with the non-tumoral cells (MCF-10A). Pyruvate is the final metabolite of the glycolysis and its fate relies on oxygen availability. In anaerobic condition, the pyruvate is converted in lactate. The L-lactate dehydrogenase C chain (LDHC) was found regulated in our study. LDHC is involved in the interconversion of pyruvate and lactate. This enzyme was found upregulated in the primary breast cancer cells (MGSO-3 and MACL-1) and downregulated in non-tumoral (MCF-10A) and metastatic cells (MDA-231-MD) (Figure 5).

GAPDH is an important enzyme of the glycolysis and gluconeogenesis (Figure 3, reaction # 7). This enzyme was found upregulated in MACL-1 and MDA-231-MD, but due to stringent regulation criteria used in our study, GAPDH was not found significant regulated in MGSO-3 as $\log_2\text{-ratio} = 0.2453$ (below the 0.38 cutoff), even though $P\text{-value} = 0.044$. Thus, we decided to validate our data using western blot. As shown in Figure 4



#	Enzyme (Gene)	ID (Protein)	MC			MG			MA			MD		
			(log-ratio)	(pval)	Reg.									
1	HK1	P19367	-0.1800	5.27E-02		0.2583	6.80E-03		0.2527	9.87E-03		-0.5216	2.05E-05	*
1	HK2	P52789	-0.3077	1.97E-02		0.3380	1.17E-02		0.4280	2.46E-03	*	-0.4141	3.14E-03	*
2	PGM1	P36871	-0.3573	9.50E-07	*	0.4114	3.87E-03	*	0.1581	1.84E-01		0.2198	8.84E-02	
3	GPI	P06744	-0.0509	8.26E-01		0.0476	8.37E-01		-0.5165	3.79E-02	*	0.2532	2.64E-01	
4	PFKP	Q01813	0.1193	5.70E-01		-0.5125	2.47E-02	*	-0.6259	8.12E-03	*	0.6015	1.03E-02	*
5	ALDOA	P04075	-0.1002	5.42E-01		0.0279	8.64E-01		-0.6810	7.02E-04	*	0.4888	8.13E-03	*
5	ALDOC	P09972	-0.1330	3.24E-01		0.0512	6.46E-01		-0.3333	2.21E-02		0.4251	5.32E-03	*
6	TPI1	P60174	-0.1995	2.12E-03	*	0.2512	1.27E-01		-0.1315	4.29E-01		0.8574	8.93E-05	*
7	GAPDH	P04406	-0.1528	1.91E-01		0.2453	4.42E-02		-0.4065	2.42E-03	*	0.9434	4.36E-07	*
8	PGK1	P00558	-0.3575	3.07E-02		0.4503	8.90E-03	*	-0.0322	8.33E-01		0.4755	6.31E-03	*
9	PGAM1	P18669	-0.4891	3.72E-06	*	0.5303	1.42E-06	*	0.3291	2.50E-04		0.3242	2.87E-04	
10	ENO1	P06733	-0.3513	1.10E-03	*	0.2780	6.05E-02		-0.3552	2.03E-02		0.9868	3.04E-06	*
10	ENO2	P09104	-0.5839	4.92E-02	*	0.1183	6.71E-01		-0.4582	1.14E-01		0.9704	2.87E-03	*
10	ENO3	P13929	-0.2902	1.73E-02		0.6288	3.53E-05	*	0.5064	3.04E-04	*	-0.0270	8.07E-01	
11	PKM	P14618	-0.2990	8.20E-03		0.3870	1.31E-03	*	-0.0433	6.66E-01		0.3854	1.35E-03	*

Figure 3. Regulation profile of the proteins associated with the glycolysis and gluconeogenesis across the cell lines. Schematic representations of the glycolysis and gluconeogenesis pathways in the cytosol (upper panel). Each number indicates key enzyme(s) involved with the represented reaction. 2,3-BPG: 2,3-bisphosphoglycerate; 3-PG: 3-phosphoglycerate; PEP: phosphoenolpyruvate. Experimental quantitative information of each enzyme represented in the pathways are provided in the table (lower panel). Asterisks (*) denote regulated proteins. Regulation cutoff is $P < 0.05$ and \log_2 -ratio < -0.38 (downregulated) or \log_2 ratio > 0.38 (upregulated). Reg.: Regulated; MC: MCF-10A (non-tumorigenic epithelial cells); MG: MGSO-3 (primary breast cancer cell line); MA: MACL-1 (primary breast cancer cell line); MD: MDA-231-MD (metastatic breast cancer cell line).

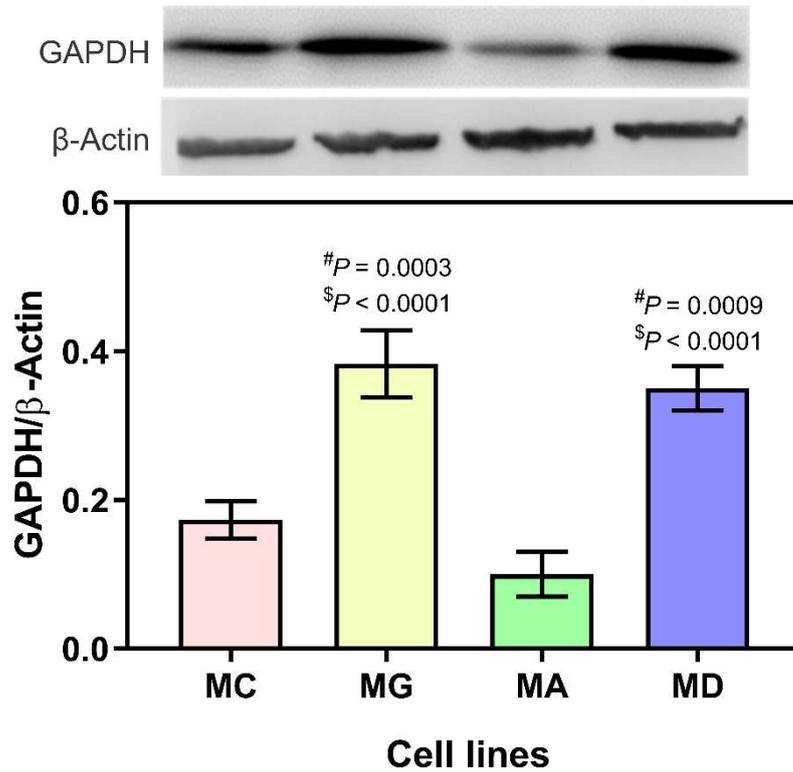
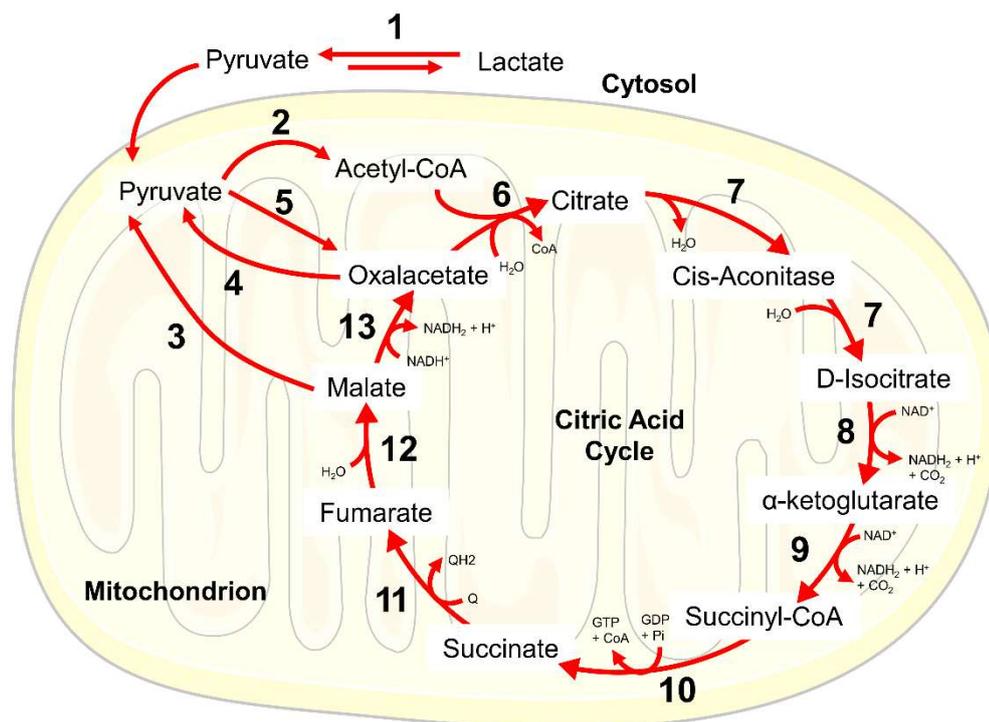


Figure 4. Validation of GAPDH abundance by western blot. Data are expressed as mean \pm standard deviation (n= 3). ANOVA corrected with Tukey, # vs. MC and \$ vs. MA. MC: MCF-10A (non-tumorigenic epithelial cells); MG: MGSO-3 (primary breast cancer cell line); MA: MACL-1 (primary breast cancer cell line); MD: MDA-231-MD (metastatic breast cancer cell line).

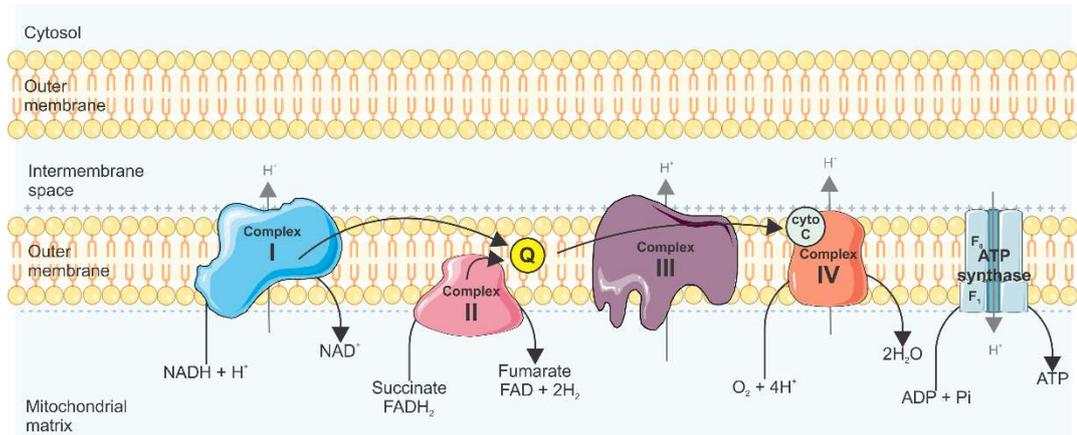
In aerobic condition, the pyruvate is translocated to the mitochondria where the citric acid cycle and the oxidative phosphorylation take place. As shown in Table I, the KEGG terms “citrate cycle (TCA cycle)” and “oxidative phosphorylation” were significantly associated with our datasets (P -values = $1.60E-11$ and $2.70E-11$, respectively). Indeed, as shown in Figure 5 and 6, a number of key enzymes from these processes were found regulated in this study. Regarding the TCA cycle, we found only upregulated enzymes from the MGSO-3 and MACL-1. On the other hand, we found only downregulated enzymes from the MDA-231-MD (Figure 5).

The oxidative phosphorylation is the final stage of the glucose oxidation and it occurs in the mitochondrial inner membrane. Most proteins from the primary cells (MGSO-3 and MACL-1) associated with the oxidative phosphorylation were found upregulated, while for the metastatic cell (MDA-231-MD) these proteins were found downregulated (Figure 6). Bearing in mind that we quantified the protein abundances and not their activity, our proteomic data may indicate that the aerobic phase of the glucose metabolism (TCA cycle and oxidative phosphorylation) is more active in the primary cancer cells (MGSO-3 and MACL-1) compared with the metastatic ones (MDA-231-MD).



#	Enzyme (Gene)	ID (Protein)	MC			MG			MA			MD		
			(log-ratio)	(pval)	Reg.									
1	LDHC	P07864	-1.5448	3.27E-08	*	0.9326	1.60E-05	*	0.6878	3.48E-04	*	-1.3961	1.23E-07	*
2	PDHA1	P08559	-0.2136	2.10E-03		0.2672	3.21E-04		0.4858	4.44E-07	*	-0.0266	6.50E-01	
2	PDHB	P11177	-0.2194	1.35E-03		0.1716	7.79E-03		0.2930	9.97E-05		0.1333	2.58E-02	
3	ME2	P23368	-0.4335	2.66E-07	*	0.4243	1.35E-06	*	0.4988	1.79E-07	*	-0.6131	1.18E-08	*
4	PCK2	Q16822	-0.1755	1.59E-01		0.2523	5.03E-02		0.5112	6.16E-04	*	-0.7991	6.61E-06	*
5	PC	P11498	0.0342	6.81E-01		0.2775	3.92E-03		0.0940	2.67E-01		-0.3684	5.20E-04	
6	CS	O75390	0.4609	2.02E-04	*	-0.0398	6.80E-01		-0.1022	2.97E-01		-0.4645	1.88E-04	*
7	ACO2	Q99798	ND	ND										
8	IDH2	P48735	-0.5053	7.66E-05	*	0.3413	2.46E-03		0.2864	8.12E-03		-1.4634	1.14E-10	*
9	OGDH	Q02218	-0.1876	1.84E-02		0.1939	1.55E-02		0.3698	1.06E-04		-0.3267	3.45E-04	
10	SUCLA2	Q9P2R7	0.0170	5.34E-01		0.2726	3.78E-08		0.3159	4.98E-09		-0.5288	3.61E-12	*
10	SUCLG2	Q96199	-0.5110	5.49E-07	*	0.4881	9.42E-07	*	0.5982	7.66E-08	*	-0.5228	4.12E-07	*
11	SDHB	P21912	-0.2433	4.65E-04		0.2901	8.76E-05		0.2404	5.17E-04		-0.1899	2.33E-03	
12	FH	P07954	ND	ND										
13	MDH2	P40926	ND	ND										

Figure 5. Regulation profile of the proteins associated with the TCA cycle across the cell lines. Schematic representations of the pyruvate pathways and the citric acid cycle (upper panel). Each number indicates key enzyme(s) involved with the represented reaction. Experimental quantitative information of each enzyme represented in the pathways are provided in the table (lower panel). Asterisks (*) denote regulated proteins. Regulation cutoff is $P < 0.05$ and \log_2 -ratio < -0.38 (downregulated) or \log_2 ratio > 0.38 (upregulated). Reg.: Regulated; ND: not detected; MC: MCF-10A (non-tumorigenic epithelial cells); MG: MGSO-3 (primary breast cancer cell line); MA: MACL-1 (primary breast cancer cell line); MD: MDA-231-MD (metastatic breast cancer cell line).

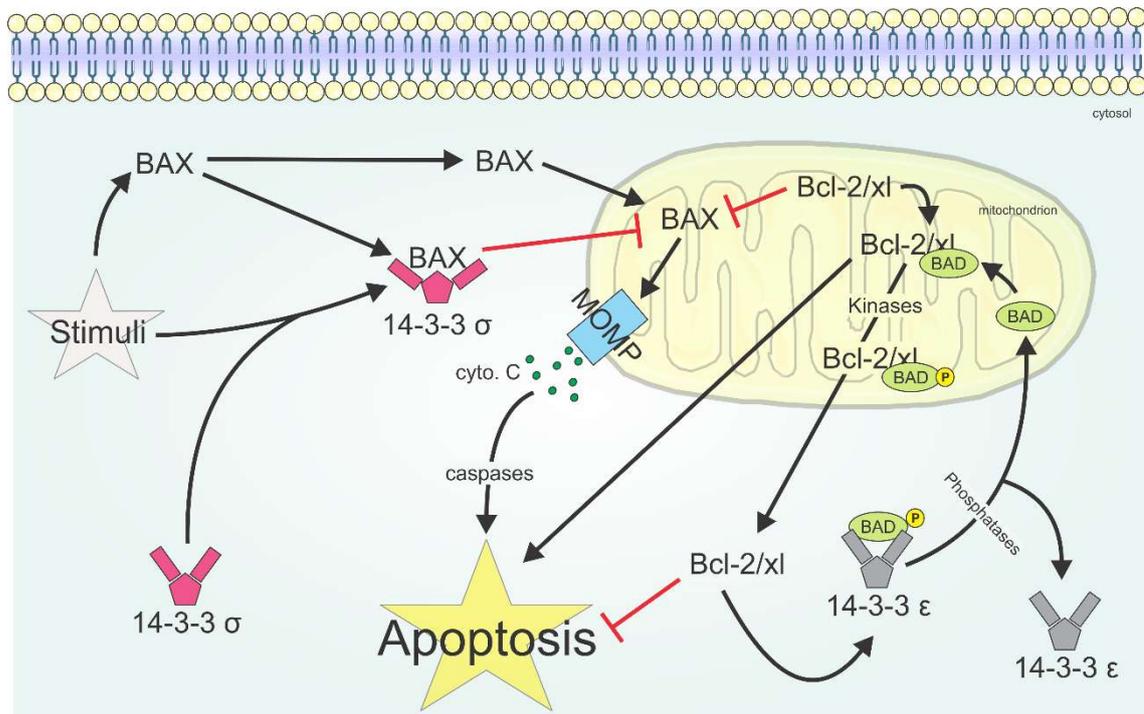


#	Enzyme (Gene)	ID (Protein)	MC			MG			MA			MD		
			(log-ratio)	(pval)	Reg.									
Complex I	ACAD9	Q9H845	0.1577	1.73E-01		0.1691	1.46E-01		0.2415	4.47E-02		-0.5164	2.94E-04	*
Complex I	NDUFA3	O95167	-0.5160	4.79E-03	*	0.4030	2.75E-02	*	0.3990	2.88E-02	*	-0.2035	2.37E-01	
Complex I	NDUFA9	Q16795	-0.1161	2.44E-01		0.3253	3.97E-03		0.4132	6.12E-04	*	-0.4931	1.18E-04	*
Complex I	NDUFS1	P28331	-0.1573	5.59E-03		0.2718	5.23E-05		0.3490	3.23E-06		-0.2120	5.64E-04	
Complex I	NDUFS2	O75306	-0.1290	1.80E-01		0.3024	4.92E-03		0.2952	5.77E-03		-0.5150	4.97E-05	*
Complex I	NDUFS3	O75489	-0.1119	8.79E-02		0.2626	6.55E-04		0.2097	3.79E-03		-0.3106	1.40E-04	
Complex I	NDUFV1	P49821	-0.0790	4.71E-01		0.2384	4.13E-02		0.4309	1.08E-03	*	-0.5626	9.47E-05	*
Complex II	SDHA	P31040	-0.2584	4.14E-03		0.2171	1.25E-02		0.1406	8.60E-02		-0.3866	1.43E-04	*
Complex II	SDHB	P21912	-0.2133	4.65E-04		0.2901	8.76E-05		0.2404	5.17E-04		-0.1899	2.33E-03	
Ubiquinone (Q)	COQ9	O75208	0.0158	8.67E-01		0.2647	1.21E-02		0.3901	7.63E-04	*	-0.4440	2.40E-04	*
Complex III	UQCRC1	P31930	0.5819	8.84E-08	*	-0.3599	2.81E-05		-0.1876	7.52E-03		-0.2196	9.34E-04	
Cyto C	COX7C	P15954	-0.1566	1.51E-01		0.2217	4.90E-02		0.2358	3.78E-02		-0.3139	8.41E-03	
Complex IV	NDUFA4	O00483	-0.7547	2.15E-09	*	0.6275	4.39E-08	*	0.7597	3.35E-09	*	-0.4419	3.56E-06	*
ATP synthase	ATP5F1A	P25705	-0.0669	9.48E-02		0.1775	2.70E-04		0.3108	5.64E-07		-0.0918	2.73E-02	
ATP synthase	ATP5F1EP2	Q5VTU8	-0.0801	5.54E-01		0.2867	4.68E-02		0.3336	2.35E-02		-0.5658	6.63E-04	*
ATP synthase	ATP5MC1	P05496	-0.0022	9.89E-01		0.0050	9.74E-01		1.0046	6.30E-06	*	-1.4629	6.02E-08	*
ATP synthase	ATP5ME	P56385	0.6323	1.94E-05	*	-0.6363	1.81E-05	*	-0.5963	1.91E-04	*	0.3412	4.80E-03	
ATP synthase	ATP5MF	P56134	0.4305	3.27E-03	*	0.0938	4.59E-01		0.0437	7.28E-01		-0.4136	4.32E-03	*
ATP synthase	ATP5PF	P18859	0.6085	3.79E-03	*	-0.8094	3.83E-04	*	-0.8671	2.02E-04	*	0.7710	5.89E-04	*
ATP synthase	ATP5PO	P48047	0.3870	1.55E-03	*	-0.4235	7.41E-04	*	-0.4087	1.00E-03	*	0.2736	1.56E-02	

Figure 6. Regulation profile of the proteins associated with oxidative phosphorylation across the cell lines. Schematic representations of the oxidative phosphorylation in mitochondria (upper panel). Experimental quantitative information of each enzyme represented in the pathways are provided in the table (lower panel). Asterisks (*) denote regulated proteins. Regulation cutoff is $P < 0.05$ and \log_2 -ratio < -0.38 (downregulated) or \log_2 ratio > 0.38 (upregulated). Reg.: Regulated; MC: MCF-10A (non-tumorigenic epithelial cells); MG: MGSO-3 (primary breast cancer cell line); MA: MACL-1 (primary breast cancer cell line); MD: MDA-231-MD (metastatic breast cancer cell line).

Regulation profile of proteins associated with cell apoptosis in MCF-10A, MGSO-3, MACL-1, MDA-231-MD cell lines

The proteomic data clearly indicate that several proteins associated with mitochondria were regulated across the four cell lines used in our study. Particularly, impairments in the electron transport chain may lead to cell apoptosis [12]. In fact, we identified two proteins related to the apoptotic process, as shown in Figure 7. BAX is a pro-apoptotic protein encoded by the *Bax* gene. It belongs to the Bcl-2 protein family and participate in several signaling pathways already associated with breast cancer. BAX inhibits the mitochondrial anti-apoptotic Bcl-2, leading to cell death. BAX can translocate into mitochondria to induce the formation of the mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMPs). MOMPs alter the permeability and the action mitochondrial potential of mitochondrial membranes, leading to the release of cytochrome C into the cytosol, leading to apoptosis via caspases activation. The 14-3-3 are adaptors that have the ability to activate or inhibit signaling pathways such as cell proliferation and differentiation. The 14-3-3 σ is a pro-apoptotic component as it inhibits BAX in the cytosol, therefore inducing an anti-apoptotic effect. The 14-3-3 ϵ binds to phosphorylated BAD, preventing the anti-apoptotic action of the Bcl-2/xL. In our study, the pro-apoptotic BAX was found upregulated in MGSO-3 and MACL-1, and downregulated in MDA-231-MD and MACL-1. The anti-apoptotic protein 14-3-3 σ was found downregulated in MGSO-3 and MACL-1, and upregulated in MDA-231-MD. The 14-3-3 ϵ was upregulated in MDA-231-MD and downregulated in MACL-1 (Figure 7). Altogether, data suggest that apoptosis is more active in the primary cancer cells compared with metastatic cells.



#	Enzyme (Gene)	ID (Protein)	MC			MG			MA			MD		
			(log-ratio)	(pval)	Reg.									
14-3-3 σ	SFN	P31947	0.1061	4.66E-01		-0.4012	1.27E-02	*	-0.5892	8.47E-04	*	0.9465	7.43E-06	*
14-3-3 ϵ	YWHAE	P62258	-0.4423	7.97E-05	*	0.3094	1.94E-03		0.1351	1.22E-01		0.4705	4.20E-05	*
BAX	BAX	Q07812	-0.7230	7.00E-07	*	0.4922	5.69E-05	*	0.5813	9.35E-06	*	-0.5562	8.14E-08	*

Figure 7. Regulation profile of the proteins associated with apoptosis across the cell lines. Schematic representations of BAX/Bcl-2-dependent apoptotic pathways (upper panel). Experimental quantitative information is provided in the table (lower panel). Asterisks (*) denote regulated proteins. Regulation cutoff is $P < 0.05$ and \log_2 -ratio < -0.38 (downregulated) or \log_2 ratio > 0.38 (upregulated). Reg.: Regulated; MC: MCF-10A (non-tumorigenic epithelial cells); MG: MGSO-3 (primary breast cancer cell line); MA: MACL-1 (primary breast cancer cell line); MD: MDA-231-MD (metastatic breast cancer cell line).

Assessing the mitochondrial density in MCF-10A, MGSO-3, MACL-1, MDA-231-MD cell lines

Our proteomic data highlighted several mitochondrial proteins regulated across the breast cancer tumorigenesis. Thus, we decided to evaluate the mitochondria density by means of flow cytometry after labeling with the fluorophore MITOTRACKER. The mean fluorescence intensity (MFI) of MDA-231-MD cells were 2-times more intense than the primary cell lines (MGSO-3, MACL-1), indicating higher mitochondrial density in the metastatic cells (Figure 8).

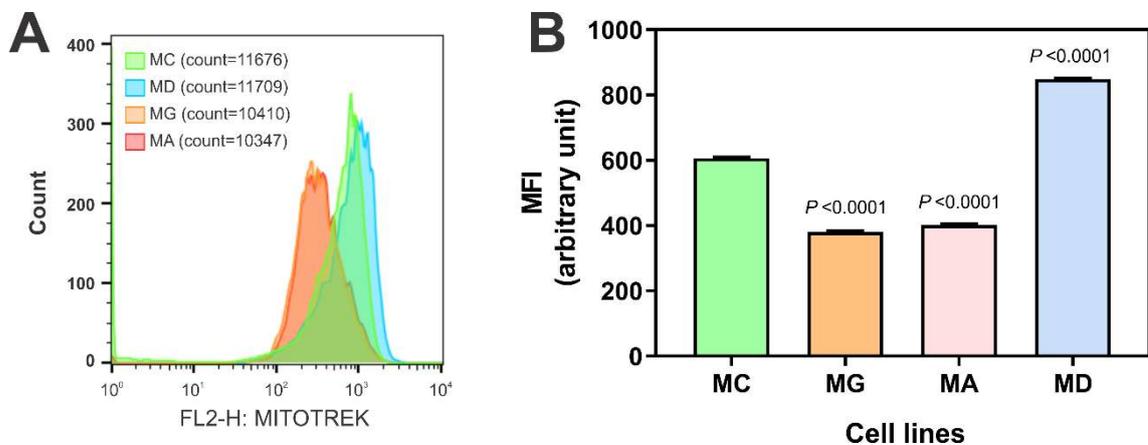


Figure 8. Mitochondrial density. (A) Cells were labeled with the MITOTRACKER and analyzed by flow cytometry. (B) Fluorescence quantification. Data are expressed as mean \pm standard deviation ($n = 3$). ANOVA corrected with Tukey (vs. MC). MFI: mean fluorescence index. MC: MCF-10A (non-tumorigenic epithelial cells); MG: MGSO-3 (primary breast cancer cell line); MA: MACL-1 (primary breast cancer cell line); MD: MDA-231-MD (metastatic breast cancer cell line).

DISCUSSION

Breast cancer cell metabolism

The energy metabolism reprogramming in breast cancer has been subjected to several studies in the last years, as energy production correlates proliferation, invasion and metastatic potential [13].

Lipid metabolism is important for breast cancer cells to produce the building blocks for the synthesis of cholesterol and membrane lipoproteins [14]. Others have shown that production of pyruvate and its translocation into mitochondria are fundamental for citrate production in the TCA cycle. Also, pyruvate in the cytosol can be used for fatty acids production. Endogenous and exogenous fatty acids are important for breast cancer cell homeostasis, affecting their proliferation and malignancy capacities [15-17]. Our data suggest that mitochondrial β -oxidation is reduced in primary breast cancer cells (MGSO-3 and MACL-1) compared with the metastatic cells (MDA-231-MD).

An increase in glycolysis rate, as a rapid energy source for the establishment and proliferation of tumor cells, is already known. The Warburg effect was postulated almost 100 years ago. It is defined as a metabolic shift that favors anaerobic pathways (fermentation) to produce energy (ATP) rather than aerobic pathways (TCA and oxidative phosphorylation). This strategy is beneficial for highly proliferative cells, like tumors, as energy is produced in a rapid pace [18, 19].

Our proteomic data suggest that the metastatic cells (MDA-231-MD) may favor the anaerobic glucose metabolism (positive Warburg effect) but the primary cells may rather favor aerobic ways to produce energy, as seen by a number of upregulated enzymes and protein complexes involved in the TCA cycle and oxidative phosphorylation (negative Warburg effect). LeBleu et al. [20] and Zacksenhaus et al. [21] reported that increased oxidative phosphorylation correlate with higher aggressiveness and proliferative capacity of breast cancer.

Mitochondrial density and apoptosis in breast cancer cells

In a genetic analysis of breast cancer tissue, Sotgia et al. [22] demonstrated that most mitochondrial transcripts were related to oxidative phosphorylation proteins. The authors identified in epithelial cells surrounding the breast cancer tumor that biogenesis and mitochondrial translation were downregulated compared with the tumor itself. The authors reported a cell parasitic effect in the tumoral environment. These data may be related to the low mitochondrial density observed in the primary breast cancer cell lines compared with the metastatic ones, as the primary cells may find energy supply in their stroma.

Lee et al. [23] also demonstrated that oxidative phosphorylation was closely associated with apoptotic process and tumor resistance to chemotherapy. The authors demonstrated that MYC and MCL1 proto-oncogenes increased mitochondrial oxidative phosphorylation and maintained resistance to chemotherapy via hypoxia-inducible factor 1-alpha activation (HIF-1- α). Blocking the production of MCL1 directly affected this pathway, decreasing chemo-resistance without decreasing the antiapoptotic effect of proto-oncogene. Our data demonstrated a relationship between potential mitochondrial function, as represented by the regulation of mitochondrial proteins, and apoptosis via BAX and Bcl-2/xL in primary cancer cell lines. Sarkar et al. [24] and Cui et al. [25] have already demonstrated that the manipulation of this signaling pathway and imbalance between BAX/ Bcl-2/xL leads to apoptosis in breast cancer cells. An important finding of our study is related to the 14-3-3 σ . Suzuki et al. [26] have already described that the loss of this protein is correlated with breast cancer. Our data show that the downregulation of 14-3-3 σ correlates with the primary cancer cell lines, suggesting a pro-apoptotic effect. In the metastatic tumor line, though, 14-3-3 σ is upregulated, which is consistent with an anti-apoptotic effect.

Conclusion

Our study is the first proteomic characterization of the primary breast cancer cells MGSO-3 and MACL-1 expressing a triple negative phenotype. Regulation profile of proteins associated with cell metabolism suggest that a negative regulation of the Warburg effect occurs in the beginning of the triple negative breast cancer. At the later stages of tumorigenesis, cells seem to express a positive Warburg effect. Bearing in mind all the limitations that a study based on cell culture offers, our data improve the current knowledge on the biology of this type of cancer and may assist in developing future treatments.

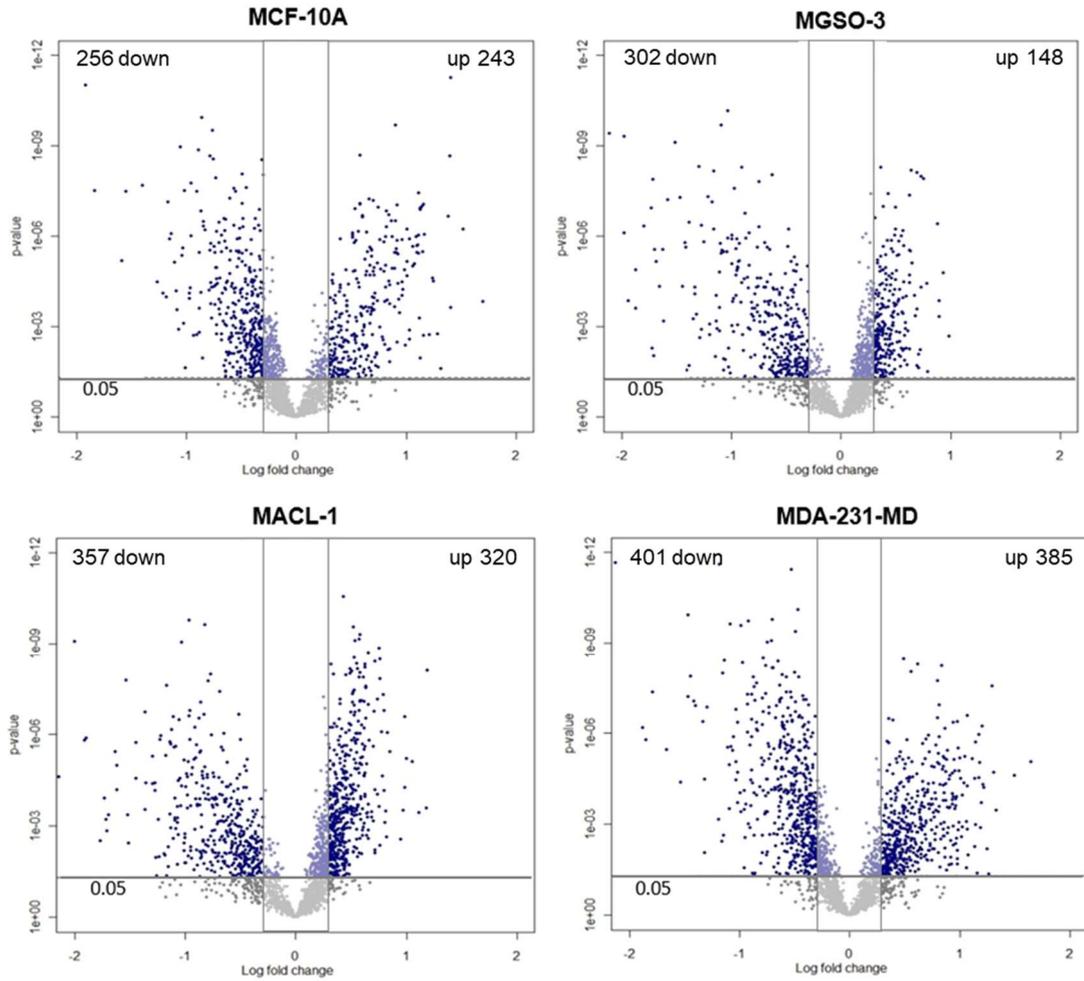
References

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA: a cancer journal for clinicians* (2021).
- [2] N. Harbeck, M. Gnant, Breast cancer, *Lancet* 389(10074) (2017) 1134-1150.
- [3] L.A. Torre, F. Bray, R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, A. Jemal, Global cancer statistics, 2012, *CA: a cancer journal for clinicians* 65(2) (2015) 87-108.
- [4] C.M. Perou, T. Sorlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lonning, A.L. Borresen-Dale, P.O. Brown, D. Botstein, Molecular portraits of human breast tumours, *Nature* 406(6797) (2000) 747-52.
- [5] N. Cancer Genome Atlas, Comprehensive molecular portraits of human breast tumours, *Nature* 490(7418) (2012) 61-70.
- [6] W.D. Foulkes, I.E. Smith, J.S. Reis-Filho, Triple-negative breast cancer, *The New England journal of medicine* 363(20) (2010) 1938-48.
- [7] O. Warburg, On the origin of cancer cells, *Science* 123(3191) (1956) 309-14.
- [8] C.R. Correa, C.M. Bertollo, A.M. Goes, Establishment and characterization of MACL-1 and MGSO-3 cell lines derived from human primary breast cancer, *Oncology research* 17(10) (2009) 473-82.
- [9] N.C. Correa, H. Kwasne, J.A. Faria, C.C. Seixas, I.G. Santos, F.B. Abreu, S. Nonogaki, R.M. Rocha, G. Aparecida Borges Silva, H. Gobbi, S.R. Rogatto, A.M. Goes, D.A. Gomes, Genomic and phenotypic profiles of two Brazilian breast cancer cell lines derived from primary human tumors, *Oncology reports* 29(4) (2013) 1299-307.
- [10] L. Rodrigues-Ribeiro, M.N. Melo-Braga, F. Kjeldsen, D.P. Gomez-Mendoza, T. Verano-Braga, Assessment of protein extraction and digestion efficiency of well-established shotgun protocols for heart proteomics, *Analytical biochemistry* 578 (2019) 51-59.
- [11] Y. Perez-Riverol, A. Csordas, J. Bai, M. Bernal-Llinares, S. Hewapathirana, D.J. Kundu, A. Inuganti, J. Griss, G. Mayer, M. Eisenacher, E. Perez, J. Uszkoreit, J. Pfeuffer, T. Sachsenberg, S. Yilmaz, S. Tiwary, J. Cox, E. Audain, M. Walzer, A.F. Jarnuczak, T. Ternent, A. Brazma, J.A. Vizcaino, The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data, *Nucleic acids research* 47(D1) (2019) D442-D450.
- [12] J.Q. Kwong, M.S. Henning, A.A. Starkov, G. Manfredi, The mitochondrial respiratory chain is a modulator of apoptosis, *The Journal of cell biology* 179(6) (2007) 1163-77.

- [13] L. Jerby, L. Wolf, C. Denkert, G.Y. Stein, M. Hilvo, M. Oresic, T. Geiger, E. Ruppin, Metabolic associations of reduced proliferation and oxidative stress in advanced breast cancer, *Cancer research* 72(22) (2012) 5712-20.
- [14] M.E. Monaco, Fatty acid metabolism in breast cancer subtypes, *Oncotarget* 8(17) (2017) 29487-29500.
- [15] K. Tang, Y. Yu, L. Zhu, P. Xu, J. Chen, J. Ma, H. Zhang, H. Fang, W. Sun, L. Zhou, K. Wei, F. Li, J. Lv, J. Xie, Y. Liu, B. Huang, Hypoxia-reprogrammed tricarboxylic acid cycle promotes the growth of human breast tumorigenic cells, *Oncogene* 38(44) (2019) 6970-6984.
- [16] N. Zaidi, J.V. Swinnen, K. Smans, ATP-citrate lyase: a key player in cancer metabolism, *Cancer research* 72(15) (2012) 3709-14.
- [17] K.S. Lucenay, I. Doostan, C. Karakas, T. Bui, Z. Ding, G.B. Mills, K.K. Hunt, K. Keyomarsi, Cyclin E Associates with the Lipogenic Enzyme ATP-Citrate Lyase to Enable Malignant Growth of Breast Cancer Cells, *Cancer research* 76(8) (2016) 2406-18.
- [18] R. Moreno-Sanchez, S. Rodriguez-Enriquez, A. Marin-Hernandez, E. Saavedra, Energy metabolism in tumor cells, *The FEBS journal* 274(6) (2007) 1393-418.
- [19] M.G. Vander Heiden, L.C. Cantley, C.B. Thompson, Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation, *Science* 324(5930) (2009) 1029-33.
- [20] V.S. LeBleu, J.T. O'Connell, K.N. Gonzalez Herrera, H. Wikman, K. Pantel, M.C. Haigis, F.M. de Carvalho, A. Damascena, L.T. Domingos Chinen, R.M. Rocha, J.M. Asara, R. Kalluri, PGC-1alpha mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis, *Nature cell biology* 16(10) (2014) 992-1003, 1-15.
- [21] E. Zacksenhaus, M. Shrestha, J.C. Liu, I. Vorobieva, P.E.D. Chung, Y. Ju, U. Nir, Z. Jiang, Mitochondrial OXPHOS Induced by RB1 Deficiency in Breast Cancer: Implications for Anabolic Metabolism, Stemness, and Metastasis, *Trends in cancer* 3(11) (2017) 768-779.
- [22] F. Sotgia, D. Whitaker-Menezes, U.E. Martinez-Outschoorn, A.F. Salem, A. Tsigos, R. Lamb, S. Sneddon, J. Hult, A. Howell, M.P. Lisanti, Mitochondria "fuel" breast cancer metabolism: fifteen markers of mitochondrial biogenesis label epithelial cancer cells, but are excluded from adjacent stromal cells, *Cell cycle* 11(23) (2012) 4390-401.
- [23] K.M. Lee, J.M. Giltane, J.M. Balko, L.J. Schwarz, A.L. Guerrero-Zotano, K.E. Hutchinson, M.J. Nixon, M.V. Estrada, V. Sanchez, M.E. Sanders, T. Lee, H. Gomez, A. Lluch, J.A. Perez-Fidalgo, M.M. Wolf, G. Andrejeva, J.C. Rathmell, S.W. Fesik, C.L. Arteaga, MYC and MCL1 Cooperatively Promote Chemotherapy-Resistant Breast Cancer Stem Cells via Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation, *Cell metabolism* 26(4) (2017) 633-647 e7.
- [24] F.H. Sarkar, K.M. Rahman, Y. Li, Bax translocation to mitochondria is an important event in inducing apoptotic cell death by indole-3-carbinol (I3C) treatment of breast cancer cells, *The Journal of nutrition* 133(7 Suppl) (2003) 2434S-2439S.
- [25] L. Cui, W. Bu, J. Song, L. Feng, T. Xu, D. Liu, W. Ding, J. Wang, C. Li, B. Ma, Y. Luo, Z. Jiang, C. Wang, J. Chen, J. Hou, H. Yan, L. Yang, X. Jia, Apoptosis induction by alantolactone in breast cancer MDA-MB-231 cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrion-dependent pathway, *Archives of pharmacal research* 41(3) (2018) 299-313.
- [26] H. Suzuki, F. Itoh, M. Toyota, T. Kikuchi, H. Kakiuchi, K. Imai, Inactivation of the 14-3-3 sigma gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers, *Cancer research* 60(16) (2000) 4353-7.

SUPPORTING INFORMATION

Figure S1



Volcano plots representing the distribution of p-values (y axis) vs. log₂ fold-change across the four cell lines. Ratios were obtained using the pool dataset, which was generated as the combination of equal proteins amounts from the four cell lines used in this study. Regulation threshold was set as ANOVA p-value < 0.05 and -0.38 < log₂-fold change > 0.38.

Table S1 – Regulated proteins related with the KEGG term “fatty acid metabolism”

ID	Gene	Protein description	MC		MG		MA		MD	
			log-ratio	pval	log-ratio	pval	log-ratio	pval	log-ratio	pval
P09110	ACAA1	acetyl-CoA acyltransferase 1	0.5407	2.75E-03	-0.8432	5.27E-05	-1.1264	2.04E-06	-0.5117	4.08E-03
P42765	ACAA2	acetyl-CoA acyltransferase 2	-0.3362	1.03E-01	0.6283	5.42E-03	-0.1463	4.61E-01	0.6557	4.05E-03
P11310	ACADM	acyl-CoA dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain	-0.2258	9.71E-04	0.2429	5.19E-04	0.1160	5.30E-02	0.0237	6.75E-01
P49748	ACADVL	acyl-CoA dehydrogenase, very long chain	0.0797	6.63E-01	-0.2532	1.78E-01	-0.5371	9.04E-03	-0.2406	1.99E-01
P24752	ACAT1	acetyl-CoA acetyltransferase 1	0.1211	3.73E-01	-0.2941	4.14E-02	-0.3821	1.10E-02	0.6789	1.18E-04
Q15067	ACOX1	acyl-CoA oxidase 1	0.1031	5.19E-01	-0.3146	6.22E-02	-0.2109	1.97E-01	-0.6105	1.39E-03
O95573	ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	0.2174	1.24E-01	0.0159	9.06E-01	0.1485	2.83E-01	-0.3907	1.03E-02
O60488	ACSL4	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	-0.1136	2.41E-01	-0.3584	1.57E-03	-0.6148	8.32E-06	-0.3975	6.67E-04
P23786	CPT2	carnitine palmitoyltransferase 2	-0.2500	1.11E-02	0.2509	1.08E-02	0.3106	2.63E-03	-0.3719	6.20E-04
P30084	ECHS1	enoyl-CoA hydratase, short chain 1	0.4387	8.95E-05	-0.4540	6.31E-05	-0.5056	2.01E-05	0.2818	3.93E-03
Q6Y1H2	HACD2	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 2	1.3172	2.42E-02	-1.7210	5.13E-03	-1.1652	4.25E-02	-0.4916	3.64E-01
Q9P035	HACD3	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	0.5351	2.23E-03	-0.0947	5.25E-01	-0.0262	8.60E-01	-0.3923	1.66E-02
Q16836	HADH	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	0.3028	1.92E-02	-0.4831	7.97E-04	-0.6904	2.52E-05	0.6186	7.97E-05
P40939	HADHA	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), alpha subunit	0.5160	9.21E-07	-0.4075	1.47E-05	-0.4370	6.66E-06	-0.0378	5.69E-01
P55084	HADHB	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), beta subunit	0.1547	3.29E-02	-0.2120	5.72E-03	-0.2889	5.28E-04	-0.2128	5.57E-03
Q53GQ0	HSD17B12	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 12	0.2064	1.79E-01	-0.4139	1.28E-02	-0.3669	2.43E-02	-0.6385	5.63E-04
P50897	PPT1	palmitoyl-protein thioesterase 1	0.3411	1.30E-02	-0.3394	1.34E-02	-0.3222	1.78E-02	0.3537	1.05E-02
Q9NZ01	TECR	trans-2,3-enoyl-CoA reductase	0.3951	6.92E-05	-0.4166	3.99E-05	-0.1523	5.37E-02	-0.3486	2.37E-04

MC, MCF-10A; MG, MGSO-3; MA, MACL-1; MD, MDA-231-MD.

Table S2 – Regulated proteins related with the KEGG term “fatty acid degradation”

ID	Gene	Protein description	MC		MG		MA		MD	
			log-ratio	pval	log-ratio	pval	log-ratio	pval	log-ratio	pval
P24752	ACAT1	acetyl-CoA acetyltransferase 1	0.1211	3.73E-01	-0.2941	4.14E-02	-0.3821	1.10E-02	0.6789	1.18E-04
P09110	ACAA1	acetyl-CoA acyltransferase 1	0.5407	2.75E-03	-0.8432	5.27E-05	-1.1264	2.04E-06	-0.5117	4.08E-03
P42765	ACAA2	acetyl-CoA acyltransferase 2	-0.3362	1.03E-01	0.6283	5.42E-03	-0.1463	4.61E-01	0.6557	4.05E-03
P11310	ACADM	acyl-CoA dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain	-0.2258	9.71E-04	0.2429	5.19E-04	0.1160	5.30E-02	0.0237	6.75E-01
P49748	ACADVL	acyl-CoA dehydrogenase, very long chain	0.0797	6.63E-01	-0.2532	1.78E-01	-0.5371	9.04E-03	-0.2406	1.99E-01
Q15067	ACOX1	acyl-CoA oxidase 1	0.1031	5.19E-01	-0.3146	6.22E-02	-0.2109	1.97E-01	-0.6105	1.39E-03
O95573	ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	0.2174	1.24E-01	0.0159	9.06E-01	0.1485	2.83E-01	-0.3907	1.03E-02
O60488	ACSL4	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	-0.1136	2.41E-01	-0.3584	1.57E-03	-0.6148	8.32E-06	-0.3975	6.67E-04
P11766	ADH5	alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide	-0.7432	4.66E-05	0.4504	3.80E-03	0.2617	6.55E-02	-0.0154	5.75E-01
P30837	ALDH1B1	aldehyde dehydrogenase 1 family member B1	-0.1303	6.49E-01	-0.4207	1.55E-01	-0.8958	6.12E-03	-0.5254	8.12E-02
P05091	ALDH2	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	-0.9549	1.68E-08	0.6341	3.03E-06	0.8025	1.65E-07	-0.4556	1.12E-04
P51648	ALDH3A2	aldehyde dehydrogenase 3 family member A2	0.6459	7.37E-07	-0.4312	7.25E-05	-0.4426	5.55E-05	-0.3844	2.24E-04
P23786	CPT2	carnitine palmitoyltransferase 2	-0.2500	1.11E-02	0.2509	1.08E-02	0.3106	2.63E-03	-0.3719	6.20E-04
P30084	ECHS1	enoyl-CoA hydratase, short chain 1	0.4387	8.95E-05	-0.4540	6.31E-05	-0.5056	2.01E-05	0.2818	3.93E-03
Q16836	HADH	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	0.3028	1.92E-02	-0.4831	7.97E-04	-0.6904	2.52E-05	0.6186	7.97E-05
P40939	HADHA	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), alpha subunit	0.5160	9.21E-07	-0.4075	1.47E-05	-0.4370	6.66E-06	-0.0378	5.69E-01
P55084	HADHB	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), beta subunit	0.1547	3.29E-02	-0.2120	5.72E-03	-0.2889	5.28E-04	-0.2128	5.57E-03

MC, MCF-10A; MG, MGSO-3; MA, MACL-1; MD, MDA-231-MD.

Table S3 – Regulated proteins related with the KEGG term “glycolysis / gluconeogenesis”

ID	Gene	Protein description	MC		MG		MA		MD	
			log-ratio	pval	log-ratio	pval	log-ratio	pval	log-ratio	pval
P11766	ADH5	alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide	-0.7432	4.66E-05	0.4504	3.80E-03	0.2617	6.55E-02	-0.0754	5.75E-01
P47895	ALDH1A3	aldehyde dehydrogenase 1 family member A3	0.8556	1.49E-02	-1.0209	5.06E-03	-0.8408	1.75E-02	-1.1194	2.32E-03
P30837	ALDH1B1	aldehyde dehydrogenase 1 family member B1	-0.1303	6.49E-01	-0.4207	1.55E-01	-0.8658	6.12E-03	-0.5254	8.12E-02
P05091	ALDH2	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	-0.9549	1.68E-08	0.6341	3.03E-06	0.8025	1.65E-07	-0.4556	1.12E-04
P51648	ALDH3A2	aldehyde dehydrogenase 3 family member A2	0.6459	7.37E-07	-0.4512	7.25E-05	-0.4526	5.55E-05	-0.3544	2.24E-04
P04075	ALDOA	aldolase, fructose-bisphosphate A	-0.1002	5.42E-01	0.0279	8.64E-01	-0.6610	7.02E-04	0.4858	8.13E-03
P09972	ALDOC	aldolase, fructose-bisphosphate C	-0.1330	3.24E-01	0.0612	6.46E-01	-0.3333	2.21E-02	0.4251	5.32E-03
P10515	DLAT	dihydrolipoamide S-acetyltransferase	-0.1080	1.24E-01	0.1394	5.27E-02	0.1956	9.63E-03	0.1193	9.22E-02
P09622	DLD	dihydrolipoamide dehydrogenase	0.2592	2.66E-02	-0.1649	1.39E-01	-0.2239	5.08E-02	0.1875	9.56E-02
P06733	ENO1	enolase 1	-0.5813	1.10E-03	0.2780	6.05E-02	-0.3552	2.03E-02	0.9858	3.04E-06
P09104	ENO2	enolase 2	-0.5839	4.92E-02	0.1193	6.71E-01	-0.4382	1.14E-01	0.9704	2.87E-03
P13929	ENO3	enolase 3	-0.2902	1.73E-02	0.6288	3.53E-05	0.5034	3.04E-04	-0.0270	8.07E-01
P06744	GPI	glucose-6-phosphate isomerase	-0.0509	8.26E-01	0.0476	8.37E-01	-0.5365	3.79E-02	0.2692	2.64E-01
P04406	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-0.1828	1.91E-01	0.2453	4.42E-02	-0.4065	2.42E-03	0.9484	4.36E-07
P19367	HK1	hexokinase 1	-0.1800	5.27E-02	0.2683	6.80E-03	0.2527	9.87E-03	-0.5216	2.05E-05
P52789	HK2	hexokinase 2	-0.3077	1.97E-02	0.3380	1.17E-02	0.4280	2.46E-03	-0.4141	3.14E-03
P00338	LDHA	lactate dehydrogenase A	-0.0896	5.71E-01	-0.3395	4.43E-02	-0.7434	1.39E-04	0.9080	3.25E-05
P07195	LDHB	lactate dehydrogenase B	-0.4159	2.29E-02	0.3997	2.78E-02	-0.1776	2.96E-01	0.2644	1.28E-01
P07864	LDHC	lactate dehydrogenase C	-1.5448	3.27E-08	0.9326	1.60E-05	0.6878	3.48E-04	-1.3961	1.23E-07
Q16822	PCK2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2, mitochondrial	-0.1755	1.59E-01	0.2583	5.03E-02	0.5112	6.16E-04	-0.7991	6.61E-06
Q01813	PFKP	phosphofructokinase, platelet	0.1193	5.70E-01	-0.5125	2.47E-02	-0.6259	8.12E-03	0.6015	1.03E-02
P36871	PGM1	phosphoglucomutase 1	-0.9573	9.50E-07	0.4114	3.87E-03	0.1681	1.84E-01	0.2198	8.84E-02
P00558	PGK1	phosphoglycerate kinase 1	-0.3575	3.07E-02	0.4503	8.90E-03	-0.0322	8.33E-01	0.4755	6.31E-03
P18669	PGAM1	phosphoglycerate mutase 1	-0.4891	3.72E-06	0.5303	1.42E-06	0.3291	2.50E-04	0.3212	2.87E-04
P08559	PDHA1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	-0.2136	2.10E-03	0.2672	3.21E-04	0.4858	4.44E-07	-0.0266	6.50E-01
P11177	PDHB	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	-0.2194	1.35E-03	0.1716	7.79E-03	0.2980	9.97E-05	0.1383	2.58E-02
P14618	PKM	pyruvate kinase, muscle	-0.2590	8.20E-03	0.3870	1.31E-03	-0.0433	6.66E-01	0.3854	1.35E-03
P60174	TPI1	triosephosphate isomerase 1	-0.5395	2.12E-03	0.2612	1.27E-01	-0.1315	4.29E-01	0.8574	8.93E-05

MC, MCF-10A; MG, MGSO-3; MA, MACL-1; MD, MDA-231-MD.

Table S4 – Regulated proteins related with the KEGG term “citrate cycle (TCA cycle)”

ID	Gene	Protein description	MC		MG		MA		MD	
			log-ratio	pval	log-ratio	pval	log-ratio	pval	log-ratio	pval
P21399	ACO1	aconitase 1	-0.3840	1.16E-03	0.2547	1.81E-02	0.3141	5.15E-03	-0.0805	4.15E-01
Q99798	ACO2	aconitase 2	-0.0714	1.04E-01	0.1164	1.29E-02	-0.0094	8.22E-01	-0.1532	2.09E-03
O75390	CS	citrate synthase	0.4609	2.02E-04	-0.0398	6.80E-01	-0.1022	2.97E-01	-0.4645	1.88E-04
P10515	DLAT	dihydrolipoamide S-acetyltransferase	-0.1080	1.24E-01	0.1394	5.27E-02	0.1956	9.63E-03	0.1193	9.22E-02
P36957	DLST	dihydrolipoamide S-succinyltransferase	0.0589	5.85E-01	-0.1600	1.57E-01	-0.3863	2.64E-03	0.4938	3.48E-04
P09622	DLD	dihydrolipoamide dehydrogenase	0.2592	2.66E-02	-0.1649	1.39E-01	-0.2239	5.08E-02	0.1875	9.56E-02
P48735	IDH2	isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2, mitochondrial	-0.5053	7.66E-05	0.3413	2.46E-03	0.2864	8.12E-03	-1.4654	1.14E-10
P50213	IDH3A	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD(+)) alpha	0.0434	6.81E-01	0.2078	6.26E-02	0.2785	1.66E-02	-0.3778	2.33E-03
O43837	IDH3B	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD(+)) beta	0.0289	5.31E-01	-0.1090	2.87E-02	0.1023	3.83E-02	-0.3484	1.30E-06
P51553	IDH3G	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD(+)) gamma	-0.3983	9.40E-05	0.4672	1.75E-05	0.4282	4.47E-05	-0.7578	4.81E-08
P40925	MDH1	malate dehydrogenase 1	-0.1202	3.87E-01	-0.0661	6.21E-01	-0.5748	6.89E-04	0.5483	1.01E-03
Q02218	OGDH	oxoglutarate dehydrogenase	-0.1876	1.84E-02	0.1939	1.55E-02	0.3698	1.06E-04	-0.3267	3.45E-04
Q16822	PCK2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2, mitochondrial	-0.1755	1.59E-01	0.2523	5.03E-02	0.5112	6.16E-04	-0.7991	6.61E-06
P11498	PC	pyruvate carboxylase	0.0342	6.81E-01	0.2775	3.92E-03	0.0940	2.67E-01	-0.3554	5.20E-04
P08559	PDHA1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	-0.2136	2.10E-03	0.2672	3.21E-04	0.4858	4.44E-07	-0.0266	6.50E-01
P11177	PDHB	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	-0.2194	1.35E-03	0.1716	7.79E-03	0.2930	9.97E-05	0.1383	2.58E-02
P31040	SDHA	succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A	-0.2584	4.14E-03	0.2171	1.25E-02	0.1406	8.60E-02	-0.3866	1.43E-04
P21912	SDHB	succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B	-0.2433	4.65E-04	0.2901	8.76E-05	0.2404	5.17E-04	-0.1999	2.33E-03
O14521	SDHD	succinate dehydrogenase complex subunit D	-0.5680	3.29E-04	0.5638	3.25E-04	0.2785	3.70E-02	-0.7861	1.08E-05
Q9P2R7	SUCLA2	succinate-CoA ligase ADP-forming beta subunit	0.0170	5.34E-01	0.2726	3.78E-08	0.3169	4.98E-09	-0.5288	3.61E-12
Q96199	SUCLG2	succinate-CoA ligase GDP-forming beta subunit	-0.5110	5.49E-07	0.4891	9.42E-07	0.5962	7.66E-08	-0.5228	4.12E-07
P53597	SUCLG1	succinate-CoA ligase alpha subunit	-0.2920	4.54E-03	0.3402	1.47E-03	0.2989	3.87E-03	-0.3698	7.42E-04

MC, MCF-10A; MG, MGSO-3; MA, MACL-1; MD, MDA-231-MD.

Table S5 – Regulated proteins related with the KEGG term “oxidative phosphorylation”

ID	Gene	Protein description	MC		MG		MA		MD	
			log-ratio	pval	log-ratio	pval	log-ratio	pval	log-ratio	pval
P00846	ATP6	ATP synthase F0 subunit 6	1.1651	8.61E-07	-1.0396	1.74E-06	-0.9672	7.86E-06	-0.1701	2.61E-01
P48047	ATP5O	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit	0.3870	1.55E-03	-0.4235	7.41E-04	-0.4087	1.00E-03	0.2786	1.56E-02
P25705	ATP5A1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subu	-0.0669	9.48E-02	0.1775	2.70E-04	0.3108	5.64E-07	-0.0918	2.73E-02
P06576	ATP5B	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polyp	-0.1671	1.75E-02	0.2120	4.08E-03	0.2063	4.91E-03	-0.0796	2.23E-01
P24539	ATP5F1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex subunit B1	0.5842	8.12E-08	-0.4200	4.83E-06	-0.2082	3.69E-03	0.0788	2.25E-01
P05496	ATP5G1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex subunit C1	-0.0022	9.89E-01	0.0050	9.74E-01	1.0046	6.30E-06	-1.4629	6.02E-08
O75947	ATP5H	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex subunit D	-0.1397	2.26E-01	-0.2565	3.50E-02	-0.3085	6.63E-03	0.0214	8.49E-01
P56385	ATP5I	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex subunit E	0.6323	1.94E-05	-0.6363	1.81E-05	-0.5063	1.91E-04	0.3412	4.80E-03
P56134	ATP5J2	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex subunit F2	0.4305	3.27E-03	0.0988	4.59E-01	0.0487	7.28E-01	-0.4136	4.32E-03
P18859	ATP5J	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex subunit F6	0.6085	3.79E-03	-0.8094	3.83E-04	-0.8671	2.02E-04	0.7710	5.89E-04
O75964	ATP5L	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex subunit G	0.9883	1.29E-05	-0.9526	1.95E-05	-0.7655	2.38E-04	-0.0602	7.04E-01
Q93050	ATP6V0A1	ATPase H+ transporting V0 subunit a1	-0.1214	2.95E-01	0.2478	4.27E-02	0.2667	3.07E-02	-0.4740	7.16E-04
P61421	ATP6V0D1	ATPase H+ transporting V0 subunit d1	0.0019	9.84E-01	0.2163	3.10E-02	0.2820	7.25E-03	-0.5053	5.43E-05
P38606	ATP6V1A	ATPase H+ transporting V1 subunit A	-0.4204	1.34E-05	0.4753	3.29E-06	0.3555	8.03E-05	-0.1781	1.81E-02
P21281	ATP6V1B2	ATPase H+ transporting V1 subunit B2	-0.2596	6.01E-04	0.4620	1.38E-06	0.4258	3.66E-06	0.0685	2.92E-01
P21283	ATP6V1C1	ATPase H+ transporting V1 subunit C1	-0.2720	9.59E-03	0.3889	6.94E-04	0.2003	4.52E-02	-0.1634	9.49E-02
P36543	ATP6V1E1	ATPase H+ transporting V1 subunit E1	-0.3660	3.01E-04	0.2659	4.00E-03	0.1294	1.19E-01	0.0589	4.79E-01
O75348	ATP6V1G1	ATPase H+ transporting V1 subunit G1	-0.6763	2.33E-04	0.2872	4.08E-02	0.1418	2.87E-01	0.2380	8.34E-02
Q9UI12	ATP6V1H	ATPase H+ transporting V1 subunit H	-0.4588	2.91E-04	0.4844	1.67E-04	0.2909	9.23E-03	-0.4446	3.73E-04
P28331	NDUFS1	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S1	-0.1373	5.59E-03	0.2718	5.23E-05	0.3490	3.23E-06	-0.2120	5.64E-04
O75306	NDUFS2	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S2	-0.1290	1.80E-01	0.3024	4.92E-03	0.2952	5.77E-03	-0.5150	4.97E-05
O75489	NDUFS3	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S3	-0.1119	8.79E-02	0.2626	6.55E-04	0.2097	3.79E-03	-0.3706	1.40E-04
P49821	NDUFV1	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit V1	-0.0790	4.71E-01	0.2384	4.13E-02	0.4309	1.08E-03	-0.5626	9.47E-05
Q95299	NDUFA10	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A10	-0.4574	1.58E-01	-0.1675	5.94E-01	-0.360	2.92E-01	-0.8064	1.93E-02
Q9P0J0	NDUFA13	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A13	0.0827	5.87E-01	0.2856	7.43E-02	0.2970	6.45E-02	-0.5453	2.31E-03
O43678	NDUFA2	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A2	0.1004	5.15E-01	-0.0436	5.44E-01	0.0697	6.50E-01	0.3582	3.23E-02
O95167	NDUFA3	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A3	-0.560	4.79E-03	0.4080	2.75E-02	0.3990	2.88E-02	-0.2035	2.37E-01
Q16718	NDUFA5	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A5	0.3414	4.58E-02	-0.2559	7.86E-02	-0.2775	1.35E-01	0.4788	8.68E-03
Q16795	NDUFA9	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A9	-0.1161	2.44E-01	0.3253	3.97E-03	0.4182	6.12E-04	-0.4931	1.18E-04
O96000	NDUFB10	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B10	0.1158	5.03E-01	-0.2713	1.29E-01	-0.5218	4.04E-03	-0.3086	3.21E-02
Q9NX14	NDUFB11	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B11	0.9323	3.76E-05	-0.8087	1.56E-04	-0.6346	1.72E-03	-0.0778	6.37E-01
O43674	NDUFB5	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B5	-1.0799	2.80E-04	-1.1017	2.32E-04	-1.6812	3.55E-06	-1.8753	6.57E-07
O43181	NDUFS4	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit S4	0.3928	6.86E-02	-0.4457	4.18E-02	-0.3611	9.15E-02	0.4926	2.65E-02
O00483	NDUFA4	NDUFA4, mitochondrial complex associated	-0.7847	2.15E-09	0.6275	4.39E-08	0.7597	3.35E-09	-0.4419	3.56E-06
P13073	COX4I1	cytochrome c oxidase subunit 4I1	0.2686	3.30E-03	-0.9021	5.13E-09	-1.0273	8.54E-10	-0.5402	3.64E-06
P20674	COX5A	cytochrome c oxidase subunit 5A	0.2760	5.01E-02	-0.3177	2.69E-02	-0.3705	1.19E-02	0.2085	1.37E-01
P10606	COX5B	cytochrome c oxidase subunit 5B	0.2597	1.12E-01	-0.2420	1.36E-01	-0.4865	1.08E-02	0.3747	2.76E-02
P12074	COX6A1	cytochrome c oxidase subunit 6A1	0.2088	1.38E-02	-0.2101	1.15E-02	-0.0324	6.64E-01	0.0995	1.93E-01
P09669	COX6C	cytochrome c oxidase subunit 6C	0.2684	1.23E-02	-0.4800	1.12E-04	-0.1895	8.72E-02	-0.3657	1.29E-03
P14406	COX7A2	cytochrome c oxidase subunit 7A2	0.6488	1.24E-02	-0.9410	8.56E-04	-1.2558	4.10E-05	-0.0583	8.07E-01
P15954	COX7C	cytochrome c oxidase subunit 7C	-0.1566	1.51E-01	0.2217	4.90E-02	0.2358	3.78E-02	-0.3139	8.41E-03
P00403	COX2	cytochrome c oxidase subunit II	0.6987	1.74E-04	-0.3819	2.17E-02	-0.2114	1.56E-01	-0.1594	2.77E-01
P08574	CYC1	cytochrome c1	0.2318	4.52E-02	0.0843	4.39E-01	0.0989	3.75E-01	-0.2636	3.04E-02
Q15181	PPA1	pyrophosphatase (inorganic) 1	-0.3660	6.05E-03	0.1751	1.47E-01	-0.0083	9.43E-01	0.3381	1.03E-02
P31040	SDHA	succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A	-0.2584	4.14E-03	0.2171	1.25E-02	0.1406	8.60E-02	-0.3866	1.43E-04
P21912	SDHB	succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B	-0.2433	4.65E-04	0.2911	8.76E-05	0.2404	5.17E-04	-0.1899	2.33E-03
O14521	SDHD	succinate dehydrogenase complex subunit D	-0.5630	3.29E-04	0.5688	3.25E-04	0.2785	3.70E-02	-0.7661	1.08E-05
P14927	UQCRCB	ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	0.4219	3.02E-02	-0.5006	1.24E-02	-0.4810	1.95E-02	0.1187	5.07E-01
O14949	UQCRCQ	ubiquinol-cytochrome c reductase complex III subunit VII	0.1213	5.93E-01	0.1005	6.58E-01	0.3494	1.37E-01	-0.5453	2.69E-02
P31930	UQCRC1	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	0.5819	8.84E-08	-0.3599	2.81E-05	-0.1876	7.52E-03	-0.2496	9.34E-04
P22695	UQCRC2	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II	0.6488	3.34E-06	-0.6701	2.28E-06	-0.6513	3.20E-06	-0.3089	4.11E-03
P47985	UQCRCF1	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	0.5119	1.12E-06	-0.4848	2.16E-06	-0.5006	1.47E-06	-0.0322	6.30E-01

MC, MCF-10A; MG, MGSO-3; MA, MACL-1; MD, MDA-231-MD.