



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

LARISSA MENEZES DOS REIS

AUMENTO DE BETA-OXIDAÇÃO CONFERE RESISTÊNCIA À
INIBIÇÃO DE GLUTAMINASE EM CÉLULAS DE CÂNCER DE
MAMA TRIPLO-NEGATIVO

*ENHANCED FATTY ACID OXIDATION CONFERS RESISTANCE
TO GLUTAMINASE INHIBITION IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST
CANCER CELLS*

CAMPINAS

2017

LARISSA MENEZES DOS REIS

Aumento de beta-oxidação confere resistência à inibição de glutaminase em Células de câncer de mama triplo-negativo

Enhanced fatty acid oxidation confers resistance to glutaminase inhibition in triple-negative breast cancer cells

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Genética e Biologia Molecular, na Área de Genética Animal e Evolução

Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Genetics and Molecular Biology, in the area of Animal Genetics and Evolution

Supervisor/Orientador: Sandra Martha Gomes Dias

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELA ALUNA LARISSA MENEZES DOS REIS E ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a. SANDRA MARTHA GOMES DIAS

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/18061-9
ORCID: <http://orcid.org/http://orcid.org/00>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R277a Reis, Larissa Menezes dos, 1990-
Aumento de beta-oxidação confere resistência à inibição de glutaminase em células de câncer de mama triplo-negativo / Larissa Menezes dos Reis. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Sandra Martha Gomes Dias.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Câncer mama triplo negativo. 2. Vias metabólicas. 3. Glutamina. 4. Ácidos graxos - Oxidação. I. Dias, Sandra Martha Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Enhanced fatty acid oxidation confers resistance to glutaminase inhibition in triple-negative breast cancer cells

Palavras-chave em inglês:

Triple negative breast neoplasms

Metabolic pathway

Glutamine

Fatty acids - Oxidation

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Sandra Martha Gomes Dias [Orientador]

Maria Cristina Rodrigues Rangel

Ariel Mariano Silber

Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira

Claudio Chrysostomo Werneck

Data de defesa: 29-08-2017

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 29 de agosto de 2017

BANCA EXAMINADORA

Dra. Sandra Martha Gomes Dias (Orientadora)

Dra. Maria Cristina Rodrigues Rangel

Prof. Dr. Ariel Mariano Silber

Prof. Dr. Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

“Um cientista, que também é um ser humano, não deve descansar enquanto o conhecimento que pode reduzir o sofrimento repousa em uma estante”.

(Albert Sabin)

Aos meus familiares e amigos que me acompanharam neste desafio e na vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Sandra Dias por me aceitar em seu grupo de pesquisa e por toda orientação que me ajudou a conduzir este trabalho.

Agradeço aos meus familiares por todas as palavras de incentivo, pelo apoio e pela paciência que tiveram comigo nos últimos anos. Em especial, agradeço aos meus pais, Adilson e Rosângela, e minha irmã, Fernanda, por todo suporte durante toda minha vida e pelo incentivo que sempre me dão quando se trata de realizar meus sonhos.

Agradeço ao grupo de Pesquisa em Metabolismo Tumoral pelas lições de convivência. Em especial, agradeço ao Douglas, Luciana, Krishina, Carolline, Camila e Grazi por serem mais que meus colegas de trabalho, serem minha família em Campinas e por contribuírem para o meu crescimento científico e pessoal. Agradeço ao Douglas pela ajuda com as análises de dados, protocolos, caronas e companhia de todos os dias e finais de semana. Agradeço as meninas Luciana, Carollzinha e Krishina por todas as conversas filosóficas, desabafos e risadas durante esses anos. Agradeço à Grazi pela serenidade de todos os dias.

Agradeço também a todos que passaram pelo grupo nos últimos anos, em especial as Amandas que foram ótimas companhias durante meu primeiro ano em Campinas.

Meus sinceros agradecimentos a todos que passaram pelo LNBio nos últimos anos pela convivência, pelas conversas de corredor, pelas dicas sobre experimentos e empréstimo de reagentes e, principalmente, a todos os funcionários do LNBio que mantêm o Centro funcionando e, por isso, contribuíram imensamente para o andamento desse trabalho. Em especial, agradeço ao Wanderley pelos sequenciamentos e manutenção dos equipamentos, a sempre paciente Eugênia no citômetro de fluxo, a Sami por sua alegria e por sempre ser tão prestativa e à equipe do LBE, principalmente a Kaliandra, pela ajuda e disponibilidade do Operetta.

Agradeço ao professor Ariel Mariano Silber por me receber em seu laboratório e a todos do Laboratório de Bioquímica de Tryps por me acolherem em suas rotinas por algum tempo. Agradeço, em especial, ao Rodolpho por disponibilizar seu tempo e conhecimento para me ajudar com os experimentos de carbono radioativo. Agradeço também imensamente à professora Maria Julia Manso Alves e ao professor Alejandro Miguel Katzin por gentilmente cederem o [¹⁴C]-ácido palmítico para realização dos experimentos de Trapping de CO₂.

Agradeço também ao professor Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira por abrir as portas de seu laboratório e disponibilizar o equipamento *seahorse* e ao mestrando Felipe pela paciência e pelo interesse em sempre ajudar com os experimentos de respiração celular.

Agradeço à Leticia por ser minha amiga nos dias fora do laboratório, por todos sorvetes e conversas sobre outras perspectivas da vida. Agradeço também a Josi, minha amiga de sempre, de infância e para a vida inteira por todos os conselhos e companheirismo.

Agradeço as meninas da época da graduação, Bia, Adelaide e Camilinha por continuarem presentes na minha vida e me encherem de orgulho o tempo todo pelas conquistas e pelas pessoas maravilhosas que estão se tornando.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos que fizeram parte da minha rotina nos últimos anos e que de alguma forma me ajudou a trilhar esse caminho de maneira mais leve.

Resumo

O câncer de mama triplo-negativo (TN) corresponde a cerca de 15% dos casos diagnosticados da doença e é caracterizado pela ausência dos receptores de hormônios progesterona e estrógeno e do receptor de membrana HER2 e, por isso, não responde aos tratamentos convencionais para o câncer de mama. Estudos recentes têm mostrado uma relação entre o câncer de mama TN e o metabolismo alterado, sugerindo que a reprogramação metabólica (com dependência do aminoácido glutamina) pode ser chave na progressão da doença e importante no desenvolvimento de novas terapias. Dado que a inibição da enzima glutaminase (GLS), primeira na via de metabolismo de glutamina, já está sendo avaliada na terapêutica de tumores de mama triplo-negativo com o composto CB-839 (Fase Clínica II), nós avaliamos quais mecanismos metabólicos alternativos poderiam ser acionados com o tratamento, causando a resistência deste subtipo tumoral ao composto. Inicialmente, confirmamos dados da literatura que mostram uma dependência variada à glutamina e sensibilidade ao composto CB-839 em linhagens celulares TN e, dessa maneira, identificamos células resistentes (inibição de proliferação menor que 50% em relação ao veículo) e sensíveis ao tratamento (morte ou inibição de proliferação maior que 50%). Em seguida, a partir da análise de dados de transcriptômica de linhagens e tecidos tumorais, observamos que genes relacionados ao metabolismo de lipídios são diferencialmente expressos entre células resistentes e sensíveis ou entre tumores com baixo e alto nível de expressão de *GLS*. Especificamente, diversos genes relacionados ao processo de beta-oxidação estão com expressão aumentada em tecidos tumorais com baixa expressão de *GLS*. Além disso, pacientes com tumores com baixa expressão de *GLS* e maior expressão de Carnitina Palmitoiltransferase (*CPT1*) apresentaram pior prognóstico. Para validar se beta-oxidação é uma via metabólica importante em linhagens resistentes ao CB-839, verificamos o nível proteico de *CPT1* e *CPT2*, atividade de *CPT1* e sensibilidade ao etomoxir (inibidor da beta-oxidação) dessas linhagens. Como resultado, verificamos que células resistentes ao CB-839 têm maior nível proteico de *CPT2*, maior atividade de *CPT1* e apresentam maior sensibilidade ao etomoxir (em relação à proliferação) do que células sensíveis. Observamos também que CB-839 impacta menos na morfologia mitocondrial e nível de ATP em linhagens resistentes em relação às células sensíveis. Além disso, o tratamento conjunto de CB-839 com etomoxir nas células resistentes tem maior impacto na respiração celular de ácidos graxos, nível de ATP intracelular e nos fenótipos de crescimento, invasão e migração celular. Por fim, observamos que os níveis de fosforilação de Tyr¹⁷² em Proteína cinase ativada por AMP (AMPK) e Ser⁷² em Acetil-CoA Carboxilase (ACC) são maiores em tumores com menor expressão de *GLS*, provendo as bases moleculares para a ativação da beta-oxidação em células resistentes ao CB-839. Em sumário, concluímos que o metabolismo de glutamina e de ácidos graxos dão plasticidade metabólica para os tumores de mama triplo-negativo e que os níveis proteicos de *CPT1* e *CPT2* devem ser usados como marcadores de resposta ao tratamento com CB-839.

Abstract

Triple-negative breast cancer accounts for about 15% of all breast cancer, characterized by a lack of estrogen and progesterone receptor expression (*ESR* and *PGR*, respectively) and the absence of human epithelial growth factor receptor (*ERBB2*) amplification. Therefore, this subtype does not respond to conventional treatments for breast cancer. Recent studies have shown a relationship between triple-negative breast cancer and altered metabolism, suggesting that metabolic reprogramming (with dependence on the amino acid glutamine) may be key to disease progression and promising in the development of new therapies. Inhibition of Glutaminase enzyme (*GLS*), first in the glutamine metabolism pathway, has been evaluated in the treatment of triple-negative breast tumors with compound CB-839 (Clinical Phase II) and, therefore, we evaluated which alternative metabolic mechanisms could be triggered with the treatment, causing tumor resistance to the compound. Initially, we confirmed literature data showing a variable dependence on glutamine and sensitivity to CB-839 in TN cell lines and, thus, identified resistant (proliferation inhibition less than 50% compared to vehicle treatment) and sensitive (death or proliferation inhibition more than 50% of that of the vehicle-treated cells) cell lines. Then, from the analysis of transcriptomic data from cell lines and tumor tissues, we observed that the genes related to lipid metabolism are differentially expressed between resistant and sensitive cells and between tumors with low or high *GLS* expression. Specifically, several genes related to the beta-oxidation process have increased expression in tumor tissues with low *GLS* expression. In addition, patients with tumors with lower *GLS* associated to higher *CPT1* expression show worse prognosis. In order to validate whether beta-oxidation is an important metabolic pathway in resistant cell lines, we evaluated *CPT1* and *CPT2* protein expression, *CPT1* activity, and etomoxir sensibility (beta-oxidation inhibitor) levels on those cells. Cells resistant to CB-839 have higher *CPT2* protein level, higher *CPT1* activity and are more sensitive to etomoxir (in relation to proliferation) than sensitive cells. We also observed that CB-839 treatment impacted less the mitochondrial morphology and ATP levels of resistant compared to sensitive cells. Combined treatment of CB-839 with etomoxir in resistant cells promoted a greater impact on cellular respiration of fatty acids, intracellular ATP level, cell proliferation, invasion and migration phenotypes. The levels of Tyr¹⁷² phosphorylation in AMPK and Ser⁷² in ACC are higher in tumors with lower *GLS* expression, providing the molecular bases for the activation of beta-oxidation in CB-839-resistant cells. In summary, we conclude that glutamine and fatty acid metabolism provide metabolic plasticity for triple-negative breast tumors and that the protein levels of *CPT1* and *CPT2* should be used as markers of response to CB-839 treatment.

Lista de Figuras

Figura 1. Subtipos de câncer de mama.	19
Figura 2. Figura representativa da glicólise no citosol, e do ciclo do TCA e cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias.	24
Figura 3. Figura representativa do metabolismo de lipídios.	28
Figura 4. Esquema do transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias.	29
Figura 5. Regulação do metabolismo por AMPK.	32
Figura 6. Esquema da reação utilizada para medir atividade de CPT1 a partir da medida da absorvância em 412 nm.	44
Figura 7. Máscaras e esquema de análise para identificar e identificar a área de Scratch.	46
Figura 8. Distribuição dos pacientes de câncer de mama de acordo com os níveis de expressão de GLS.	49
Figura 9. Avaliação de linhagens de câncer de mama TN em relação ao metabolismo de glutamina.	51
Figura 10. Medida do IC50 de linhagens TN ao inibidor de glutamina BPTES.	52
Figura 11. Relação entre sensibilidade a inibição de glutaminase e a função mitocondrial. ...	54
Figura 12. Análises de bioinformática das linhagens de câncer de mama triplo-negativas.	56
Figura 13. Análise da expressão de genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos em pacientes de câncer de mama.	58
Figura 14. Genes diferencialmente expressos em tumores de mama divididos entre alta e baixa expressão de GLS.	59
Figura 15. Expressão de genes relacionados à biossíntese de triacilgliceróis estão diminuídos em tumores de pacientes com menor expressão de GLS em relação aos tumores com maior expressão desse gene.	60
Figura 16. Avaliação da expressão de proteínas limitantes para a beta-oxidação e o efeito da inibição desta via na proliferação de linhagens TN.	61
Figura 17. Avaliação da plasticidade metabólica entre metabolismo de glutamina e beta-oxidação de ácidos graxos.	63
Figura 18. Knockdown de GLS também causa adaptação metabólica em linhagens TN resistentes.	64
Figura 19. Beta-oxidação é importante para a manutenção da produção de ATP em células resistentes tratadas com CB-839.	65
Figura 20. Combinação de CB-839 com etomoxir potencializa efeito sobre proliferação celular de células resistentes.	67
Figura 21. Fenótipo tumoral em relação aos processos de invasão e migração.	68
Figura 22. Avaliação do perfil metabólico de BT549.	70
Figura 23. Ativação de AMPK é importante para o acionamento da beta-oxidação em células resistentes ao CB-839 quando tratadas com este composto.	71
Figura 24. Estudo da relação entre expressão de MYC e o metabolismo de glutamina e oxidação de ácidos graxos.	73
Figura 25. Genes relacionados à peroxidação de lipídios aumentados em tumores baixo GLS.	75
Figura 26. Genes relacionados à glicólise, gliconeogênese e formação de corpos cetônicos diferencialmente expressos em pacientes com alta e baixa expressão de GLS.	77
Figura 27. PCR quantitativo de genes reguladores da gliconeogênese e formação de corpos cetônicos em linhagens TN.	77

Apêndice 1. Figura 1. Medida de expressão de GAC por imunofluorescência.....	99
Apêndice 1. Figura 2. Sensibilidade à inibição de etomoxir em linhagens TN	100
Apêndice 1. Figura 3. Estudo da plasticidade metabólica em linhagens TN quando submetidas ao knockdown de GLS	100
Apêndice 1. Figura 4. Avaliação adicional do metabolismo de glutamina e oxidação de ácidos graxos para o fenótipo tumoral de linhagens TN.	101

Lista de Tabelas

Tabela 1. Linhagens celulares tumorais TN utilizadas no estudo de acordo com suas características histológicas e subclassificação ⁸⁰	37
Tabela 2 . Sequências dos shRNAs utilizados.....	38
Apêndice 2. Tabela 1.Vias enriquecidas relacionadas ao metabolismo de lipídios a partir de genes DE entre linhagens sensíveis e resistentes	102
Apêndice 2. Tabela 2. Lista de genes DE entre linhagens resistentes e sensíveis relacionados ao metabolismo de lipídios	103
Apêndice 2. Tabela 3. Genes DE relacionados ao metabolismo de poliaminas entre linhagens resistentes e sensíveis.....	104
Apêndice 2. Tabela 4. Genes DE relacionados ao metabolismo de lipídios entre pacientes com baixa e alta expressão de GLS	105
Apêndice 2. Tabela 5. Lista de genes pertencentes a família Acil-CoA Sintetase e suas principais funções.....	106
Apêndice 2. Tabela 6.Lista de metabólitos identificados por análise untargeted de GC-MS	107

Lista de Abreviaturas e Siglas

ER	Receptor de Estrógeno
PR	Receptor de Progesterona
HER2	Receptor de Fator de Crescimento Epidermal Humano 2
TN	Triplo-negativo
EMT	Transição Epitélio Mesênquima
NAD	Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
NADP	Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina Fosfato
FAD	Dinucleotídeo de Flavina e Adenina
CoA	Coenzima A
PDH	Piruvato Desidrogenase
DLAT	Diidrolipoil Transacetilase
DLD	Diidrolipoil Desidrogenase
AMP	Monofosfato de Adenosina
ADP	Difosfato de Adenosina
ATP	Trifosfato de Adenosina
GTP	Trifosfato de Guanosina
TCA	Ácido Tricarboxílico
PK	Piruvato Cinase
FAC	Fibroblasto associado ao tumor
PCK	Fosfoenolpiruvato Carboxicinase
PC	Piruvato Carboxilase
GLS1	Glutaminase 1
HK	Hexocinase
GPI	Glicose Fosfato Isomerase
PFK	Fosfofrutocinase
ALDO	Aldolase
TPI	Triose Fosfato Isomerase
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
PGK	Fosfoglicerato Cinase
PGAM	Fosfoglicerato Mutase
ENO	Enolase
CS	Citrato Sintase
ACO	Aconitase
IDH	Isocitrato Desidrogenase
OGDH	Oxoglutarato Desidrogenase
SCS	Succinil-CoA Sintetase
SDH	Succinato Desidrogenase
FH	Fumarase
MDH	Malato Desidrogenase
GDH	Glutamato Desidrogenase
ME	Enzima málica
ACLY	ATP citrato liase
ACC	Acetil-CoA Carboxilase
MCAT	Malonil-CoA Proteína Carreadora Transacilase
GLN	Glutamina
GLU	Glutamato
BPTES	Bis-2-(5-fenilacetamido-1,2,4-tiadiazol-2-yl) etil sulfido

ACS	Acil-CoA Sintetase
CPT1	Carnitina Palmitoiltransferase 1
CACT	Carnitina Acil-carnitina Translocase
CPT2	Carnitina Palmitoiltransferase 2
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ACP	Proteína Carreadora de Acila
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
AMPK	Proteína cinase ativada por AMP
SFB	Soro Fetal Bovino
FCCP	Carbonil Cianeto p-Trifluormetoxifenil Hidrazona
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
PBS	Tampão Fosfato Salino
FAMES	Ácidos graxos metil-ésteres
TR	Tempo de retenção
IR	Índice de Retenção
PCA	Análise de Componente Principal
DE	Diferencialmente Expresso
PPEE	<i>Posterior Probability of Being Equally Expressed</i>
FC	<i>Fold Change</i>
ACP	Proteína Carreadora de Acila
ETO	Etomoxir
FA	Ácidos Graxos

Sumário

1. Introdução	18
1.1. Câncer de mama	18
1.2. Metabolismo Tumoral	21
1.3. Metabolismo de glutamina	25
1.4. Metabolismo de lipídios	27
1.5. Regulação Metabólica	30
1.6. Adaptação metabólica	33
1.7. Câncer de mama triplo-negativo tem metabolismo glutaminolítico aumentado.....	34
2. Objetivos	36
2.1. Objetivo Geral	36
2.2. Objetivos Específicos	36
3. Materiais e Métodos	37
3.1. Cultivo celular	37
3.2. Knockdown	37
3.3. Produção Viral	38
3.4. Proliferação Celular	39
3.5. Western Blot.....	40
3.6. Imunofluorescência	40
3.7. Consumo glutamina e produção glutamato.....	41
3.8. Medida de beta-oxidação por fluorescência.....	41
3.9. Medida de beta-oxidação por liberação de ¹⁴ CO ₂	42
3.10. Medida de respiração	42
3.11. Conjugação BSA-palmitato	43
3.12. Atividade de CPT1	43
3.13. Atividade de Glutaminase	44
3.14. Medida de ATP	45
3.15. Ensaio de invasão em câmara de Boyden	45
3.16. Ensaio de migração por Scratch	46
3.17. Análise de metabólitos por GC-MS	46
3.18. Análises de bioinformática do RNAseq da linhagens celulares e dos tumores de pacientes obtidos do projeto The Cancer Genome Atlas	48
4. Resultados	50
4.1. Dependência de glutamina e glutaminase em linhagens de câncer de mama triplo-negativo	50

4.2. Células sensíveis dependem do metabolismo de glutamina para a atividade mitocondrial	52
4.3. Transcriptoma mostra que células TN resistentes a inibição de glutaminase e tumores de mama de pacientes com menor expressão de glutaminase tem vias de metabolismo de lipídeos alteradas	55
4.4. Avaliação da beta-oxidação na plasticidade metabólica em linhagens de mama TN	60
4.5. Ativação da beta-oxidação em células resistentes ao CB-839 é importante para manter a produção de ATP via respiração mitocondrial	64
4.6. Avaliação do impacto da inibição concomitante do metabolismo de glutamina e de ácidos graxos na proliferação, migração e invasão celular	66
4.7. Perfil metabólico de BT549 muda com o tratamento duplo de CB-839 e etomoxir..	69
4.8. Avaliação do papel de AMPK na regulação da plasticidade metabólica de linhagens TN	70
4.9. Metabolismo de glutamina, ácidos graxos e o fator de transcrição MYC	72
4.10. Outras vias alteradas em tumores com baixa expressão de GLS	73
5. Discussão.....	78
6. Conclusões e Perspectivas.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
Apêndice 1: Figuras complementares.....	99
Apêndice 2: Tabelas complementares	102
Apêndice 3: Manuscrito submetido à BMC Cancer.....	109
Apêndice 4: Material Suplementar “Guanylate-binding protein-1 is a potential new therapeutic target for triple-negative breast cancer “	124
Anexo 1: Autorização da Comissão Interna de Biossegurança (CIBIO) do CNPEM.....	133
Anexo 2: Declaração de direitos autorais	135

1.1. Câncer de mama

O câncer de mama é uma doença heterogênea que corresponde a cerca de 30% dos casos diagnosticados de câncer entre as mulheres no mundo todo¹. Embora a taxa de mortalidade pela doença tenha diminuído nos últimos anos, principalmente pelo diagnóstico precoce e uso de terapias mais eficientes², os tumores de mama ainda são o segundo principal responsável pela morte de mulheres diagnosticadas com câncer, ficando atrás apenas do tumor de pulmão³. Dentre os principais fatores de risco associados ao surgimento e à progressão do câncer de mama estão os hábitos de vida adotados, como a falta de exercício físico^{4,5}, obesidade^{6,7}, consumo de álcool⁸ e fumo⁹. Outro conjunto de elementos associados a esta doença são os fatores hormonais e reprodutivos relacionados, principalmente, à menarca precoce e à menopausa tardia¹⁰, à nuliparidade¹¹ e a terapias de reposição hormonal¹².

As diferenças moleculares e histopatológicas dos tumores de mama incentivaram diversos estudos na busca do entendimento deste tipo de tumor e sua classificação em subtipos intrínsecos, facilitando seu diagnóstico, estabelecimento do prognóstico e desenvolvimento de terapias mais eficientes para cada perfil encontrado¹³⁻¹⁷. De acordo com as características moleculares, o câncer de mama foi dividido em cinco principais grupos, sendo eles: Luminal A, Luminal B, HER2 amplificado, basal-símile e, mais recentemente, baixa claudina^{15,16}. Esta classificação é baseada, principalmente, nos níveis de expressão de receptores hormonais e amplificação de HER2, além da expressão de genes relacionados ao aumento de proliferação, ao controle do ciclo celular, à transição epitélio-mesênquima, à invasão e metástase e ao controle apoptótico. De acordo com este perfil de expressão, diferentes terapias são propostas para cada um deles¹⁸⁻²⁰ (**Figura 1**).

Os tumores do tipo luminal correspondem a 65-70% dos cânceres de mama e são caracterizados, principalmente, pela expressão dos receptores hormonais de estrógeno e/ou progesterona (ER+/PR+) e a expressão de citoceratinas luminais (CK8 e CK18), comuns a células epiteliais luminais de mama não transformadas¹⁵. O subtipo Luminal B se difere por apresentar níveis elevados de Ki-67²¹⁻²³, uma proteína nuclear utilizada como marcador para a divisão celular, além de apresentar genes associados com o descontrole da proliferação celular superexpressos^{17,24}. Além disso, parte dos tumores do tipo Luminal B apresentam amplificação de HER2²³, conferindo a este um maior grau histológico, maior agressividade e, portanto, pior prognóstico em relação ao subtipo A^{17,25,26}.

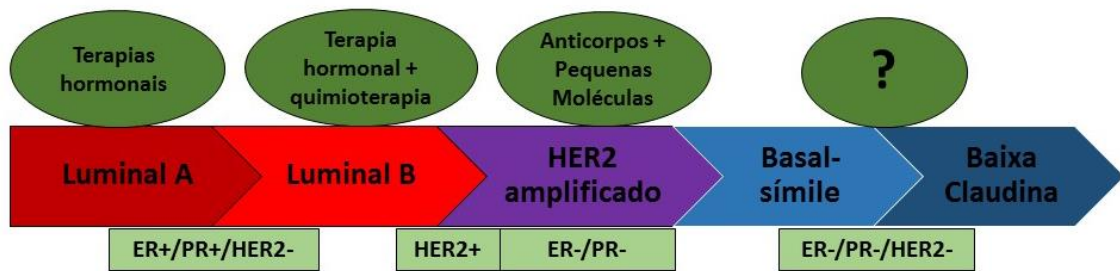


Figura 1. Subtipos de câncer de mama.

O câncer de mama é dividido em cinco principais subtipos, sendo eles: Luminal A, Luminal B, HER2 amplificado, Basal-símile e Baixa Claudina (representado como setas, no meio). Abaixo das setas estão os *status* dos subtipos em relação aos receptores hormonais de estrogênio (ER) e progesterona (PR) e à amplificação (+) ou não (-) do receptor do fator de crescimento epidermal humano (*HER2/ERBB2*). Acima estão as principais terapias para cada grupo. Em especial, os tumores do tipo Basal-símile e Baixa Claudina que, em sua maior parte, são negativos para a expressão dos receptores hormonais ER e PR e não apresentam amplificação de HER2 ainda não possuem tratamentos direcionados e específicos.

Os receptores de estrogênio pertencem à superfamília de receptores nucleares e são importantes para o processo tumorigênico por seu papel na ativação de vias de controle de proliferação²⁷⁻²⁹ e regulação da transição do ciclo celular de G0 para fase S³⁰. Pela presença aumentada de receptores de hormônios, os tipos luminais de câncer de mama são muito responsivos a terapias hormonais e, por isso, possuem como estratégia terapêutica mais efetiva o bloqueio da dimerização ou diminuição de expressão do receptor de estrogênio ou ainda a inibição da produção deste hormônio³¹. Os principais tratamentos são os inibidores de aromatase, que bloqueiam a produção de estrogênios³², e o antineoplásico tamoxifeno, um modulador seletivo dos receptores de estrogênio que funciona como antagonista deste hormônio, considerado como o tratamento ouro para os casos de câncer de mama positivos para receptor hormonal³³⁻³⁶.

Outro subtipo de câncer de mama corresponde aos casos que apresentam HER2 amplificado com baixa expressão dos receptores hormonais (ER-/PR-/HER2+), englobando aproximadamente 20% dos tumores invasivos de mama e caracterizados por apresentar baixa sobrevida e pior prognóstico em relação ao subtipo luminal^{15,37,38}. HER2 é uma proteína pertencente à família dos receptores dos fatores de crescimento epidérmico (EGFR/ErbB), sendo o único considerado um receptor órfão por não ter nenhum ligante conhecido. Porém, esta proteína é capaz de se heterodimerizar com os outros três receptores ErbB, resultando na autofosforilação de resíduos de tirosina no interior do domínio citoplásmico dos receptores e iniciando uma variedade de vias de sinalização responsáveis pela promoção de proliferação e inibição de apoptose, como as vias MAPK, PI3K/Akt, phospholipase C, PKC e STAT^{39,40}. A amplificação de HER2 permite que estas vias de sinalização fiquem constitutivamente ativas,

possibilitando o desencadeamento do processo tumorigênico^{41,42}. As principais estratégias terapêuticas para este subtipo de câncer de mama é o uso de anticorpos monoclonais, como *Trastuzumab*⁴³, e pequenas moléculas inibidoras de tirosinas cinases, como o *Lapatinib*^{44,45}. Enquanto os anticorpos monoclonais se ligam ao receptor e provocam sua internalização, impedindo que se heterodimerize com seus parceiros e, por consequência, inibindo os sinais de proliferação e sobrevivência⁴⁶⁻⁴⁸, as pequenas moléculas inibidoras de tirosinas cinases impedem a autofosforilação de HER2 por se ligarem em seus domínios cinases catalíticos^{44,49}.

O subgrupo Basal-símile é caracterizado pela expressão aumentada de citoceratinas basais (CK5, CK6, CK14 e CK17)⁵⁰, p-caderinas⁵¹, p63⁵² e expressão de Ki-67^{15,23,53}. Este subtipo de tumor tem origem em células progenitoras luminiais⁵⁴ e está associado à instabilidade do genoma⁵⁵, alto grau histológico⁵⁶, prognóstico ruim⁵⁷, alta taxa de proliferação celular e metástase preferencialmente para o cérebro e pulmão^{58,59}. Dentre os principais *drivers* deste subgrupo estão mutação de p53 após perda de PTEN^{60,61}, inativação de pRb^{62,63} e mutação ou perda de BRCA1/2^{24,64,65}. Embora os tumores basal-símiles possam apresentar expressão de receptor de estrógeno (ER+) ou amplificação de HER2 (HER2+), cerca de 80% é avaliado como negativo para os três principais marcadores (ER-/PR-/HER2-).

O último subgrupo a ser caracterizado corresponde aos tumores que apresentam baixa expressão de proteínas de junções celulares, principalmente claudinas e E-caderina e, por isso, foram denominados como tumores Baixa Claudina^{66,67}. Estes tumores são do tipo mesenquimal originados de células progenitoras basais⁵⁴ e apresentam aumento na expressão de genes relacionados ao perfil de células-tronco e de células-tronco tumorais, além de apresentarem como assinatura a superexpressão de genes relacionados com a transição epitélio-mesênquima (EMT)^{16,67}.

Parker e colaboradores (2009)⁶⁸, utilizando 320 tumores de mama e 17 amostras de tecidos mamários normais com uma lista de cerca de 1900 genes, realizaram uma análise de clusterização hierárquica não supervisionada e mostraram que os subtipos basal-símile e baixa claudina estão relacionados, sugerindo um perfil gênico semelhante entre ambos. Apesar da grande heterogeneidade entre os dois grupos, que possibilitou a divisão destes tumores em dois grupos distintos, uma importante característica em comum entre eles é a predominância de tumores com ausência de expressão de receptores hormonais e falta de amplificação de HER2 (ER-/PR-/HER2-), caracterizando um perfil denominado câncer de mama triplo-negativo (TN).

Os tumores triplo-negativos correspondem a cerca de 15% dos casos diagnosticados de câncer de mama e apresentam como característica um pior prognóstico em relação aos

subtipos luminais e HER2 amplificado, um aumento no tamanho do tumor, aumento na agressividade⁶⁹ e maiores taxas de recorrência⁷⁰. A ausência de receptores hormonais e de amplificação de HER2 impede que os tratamentos convencionais para o câncer de mama sejam eficientes para este subtipo do tumor e, por isso, as principais estratégias terapêuticas para estes tumores são o uso de quimioterapia, radioterapia e cirurgia.

Entre os principais marcadores moleculares para o câncer de mama triplo-negativo estão a superexpressão do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR)⁷¹⁻⁷³ e a presença de BRCA1 mutado⁷⁴ e, por isso, foram estudados como alvos terapêuticos para esta doença. A utilização de anticorpos anti-EGFR não tem se mostrado eficaz e estudos apontam que a translocação nuclear de EGFR⁷² e a superexpressão de proteínas tirosinas cinases⁷⁵ podem estar entre os principais mecanismos de resistência a estes inibidores. Em contrapartida, tumores triplo-negativos com deficiência de BRCA1, correspondendo a cerca de 20% dos casos, são muito responsivos à inibição das proteínas da família Poli(ADP-ribose) polimerases (PARPs) pela ativação do mecanismo de letalidade sintética, em que as duas vias redundantes de reparo de DNA controladas por BRCA1 e PARPs deixam de ser funcionais, ocasionando a morte destas células^{76,77}. Embora muitos estudos já tenham sido feitos⁷⁸⁻⁸⁰, a busca por marcadores moleculares e alvos terapêuticos promissores para os tumores triplo-negativos continuam sendo muito importantes para o entendimento da doença e propostas de estratégias de tratamentos.

Estudos recentes têm mostrado uma relação entre o câncer de mama triplo-negativo e o metabolismo alterado⁸¹⁻⁸⁷, sugerindo que a reprogramação metabólica pode ser chave na progressão da doença e importante no desenvolvimento de novas terapias^{88,89}.

1.2. Metabolismo Tumoral

Durante anos, muitos estudos foram feitos e trabalhos foram publicados buscando entender qual a origem e quais são os processos necessários para o desenvolvimento do câncer. Em uma revisão feita por Hanahan e Weinberg (2011)⁹⁰, foi proposto que a instabilidade do genoma, causando mutações e rearranjos cromossômicos, e um *status* inflamatório, que pode causar modificações no microambiente celular, são os responsáveis por controlar oito principais fatores para a origem e a progressão do processo tumoral, sendo eles: resistência à apoptose, resistência aos supressores de crescimento, sinalização induzindo a proliferação, indução de angiogênese, imortalidade celular, ativação de invasão e metástase, fuga do sistema imune e, por fim, reprogramação do metabolismo energético.

O metabolismo alterado é importante para que as células cancerosas obtenham a energia necessária para garantir que os outros processos ocorram e, ao mesmo tempo, possuam

biomassa suficiente para um crescimento e proliferação acelerados (**Figura 2**). A utilização da glicose é uma das principais modificações metabólicas sofridas pelas células cancerosas, possibilitando o uso de tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET/CT) utilizando 2-desoxi-2- (^{18}F) fluoro-D-glicose (^{18}F -FDG) (um análogo de glicose com isótopo radioativo que se acumula em regiões com alta taxa de consumo deste nutriente) na identificação de tumores e suas metástases⁹¹⁻⁹³.

Em células quiescentes, cada molécula de glicose é essencialmente oxidada no citoplasma pela glicólise, formando duas moléculas de piruvato, duas moléculas de ATP e duas moléculas de cofator NADH. O piruvato formado é transportado para as mitocôndrias, onde é convertido em acetil-CoA por um processo denominado de descarboxilação oxidativa que é catalisado pelo complexo Piruvato Desidrogenase, formado pelas enzimas Piruvato Desidrogenase (PDH), Diidrolipoil Transacetilase (DLAT) e Diidrolipoil Desidrogenase (DLD). Este acetil-CoA formado, condensa-se ao oxaloacetato, intermediário do Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA), formando o citrato e garantindo o funcionamento do ciclo para a produção de uma molécula de GTP e a redução de três moléculas de NAD^+ e de uma molécula de FAD. As moléculas de NAD^+ e FAD reduzidas são então reoxidadas na cadeia transportadora de elétrons durante a fosforilação oxidativa, possibilitando o bombeamento de prótons para fora da membrana interna da mitocôndria para formar um gradiente eletroquímico e, no final deste processo, o O_2 é reduzido à H_2O . O retorno dos prótons para o interior da mitocôndria ocorre através do complexo ATP sintase, localizado na membrana mitocondrial interna, liberando energia que é acumulada na forma de ATP (**Figura 2**). Porém, em situações de hipóxia, ou seja, na ausência do oxigênio, como ocorre durante a fadiga muscular, o piruvato é reduzido a lactato via oxidação de uma molécula NADH.

Nos tumores, mesmo na presença de oxigênio, o piruvato é preferencialmente reduzido a lactato através do processo denominado Efeito Warburg^{94,95}. Embora a glicólise pareça desvantajosa em relação à fosforilação oxidativa mitocondrial por render um menor saldo energético aparente, ela pode ser benéfica para o processo tumorigênico. Uma possível vantagem é que, se o fluxo glicolítico for alto o suficiente, o saldo final de ATP pode exceder ao produzido pela fosforilação oxidativa⁹⁶. Além disso, os intermediários da via glicolítica gerados podem ser desviados para a via das pentoses fosfatos, contribuindo para a síntese de ácidos nucleicos e aminoácidos e a produção de NADPH, que é requerido para a síntese de ácidos graxos e também no controle de espécies reativas⁹⁷. Os intermediários glicolíticos também podem ser desviados para a produção de glicerol e açúcares que são usados como substrato na síntese de glicoproteínas e glicolipídios, contribuindo para o aumento da biomassa,

necessário para manutenção de alta taxa de proliferação celular^{98,99} (**Figura 2**). A enzima Piruvato Cinase (*PK*) é a principal reguladora da glicólise, determinando o destino dos intermediários glicolíticos¹⁰⁰. Em tumores, esta enzima tem um aumento na expressão da isoforma *PKM2*, isoforma expressa em células altamente proliferativas e em células embrionárias¹⁰¹. Esta isoforma se difere da *PKM1* por não assumir apenas a conformação tetramérica, conformação ativa da enzima, podendo estar na forma dimérica e inativa, bloqueando a conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato e, por isso, causando o acúmulo dos intermediários glicolíticos que são desviados para a biossíntese¹⁰¹⁻¹⁰³. Dessa maneira, o Efeito Warburg é capaz de beneficiar tanto a necessidade bioenergética quanto biossintética das células^{95,96}.

Um estudo realizado por Pavlides e colaboradores (2009)¹⁰⁴ mostrou que tumores que perdem a expressão de Caveolina-1, uma proteína de membrana importante no controle da proliferação celular, são capazes de induzir o Efeito Warburg nos fibroblastos associados ao tumor (FACs), que formam o estroma do microambiente tumoral. O lactato produzido por essas células estromais é captado pelas células tumorais e utilizado para a produção de piruvato, utilizado pelas mitocôndrias como fonte de ATP. Assim, os tumores podem desviar os intermediários glicolíticos para processos biossintéticos e ainda manter o saldo energético via fosforilação oxidativa. Esse processo recebeu o nome de Efeito Warburg Reverso.

Nas mitocôndrias, o ciclo do TCA é formado por um *pool* constante de metabólitos intermediários que sustentam os processos de oxirredução necessários para a geração de energia nas células. Além disso, estes intermediários são capazes de contribuir para a biossíntese de blocos constituintes celulares (proteína, lipídios e ácidos nucleicos) através de sua evasão do ciclo do TCA em um processo chamado cataplerose¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Entre as principais vias catapleróticas está a evasão da mitocôndria de malato que, no citoplasma, pode ser oxidado a oxaloacetato que é descarboxilado e fosforilado via enzima Fosfoenolpiruvato Carboxicinas (PCK) para a produção de fosfoenolpiruvato, sendo este o primeiro passo regulador para a gliconeogênese¹⁰⁸. O acetil-CoA não pode ser usado durante a cataplerose uma vez que, em animais, a atividade do Complexo da Piruvato Desidrogenase é irreversível. A evasão de citrato, outro intermediário do ciclo do TCA, é importante por sua conversão em acetil-CoA que é carboxilado em malonil-CoA, passo limitante para a biossíntese de ácidos graxos *de novo*, que podem ser acumulados na forma de triglicerídeos ou utilizados na síntese de membranas, sendo essenciais em células altamente proliferativas¹⁰⁷. O oxaloacetato também é formado pela quebra do citrato citoplasmático, sendo convertido em malato e, em seguida, em piruvato pela ação da Enzima Málica (ME) e redução de uma molécula de NADP⁺, voltando para a mitocôndria.

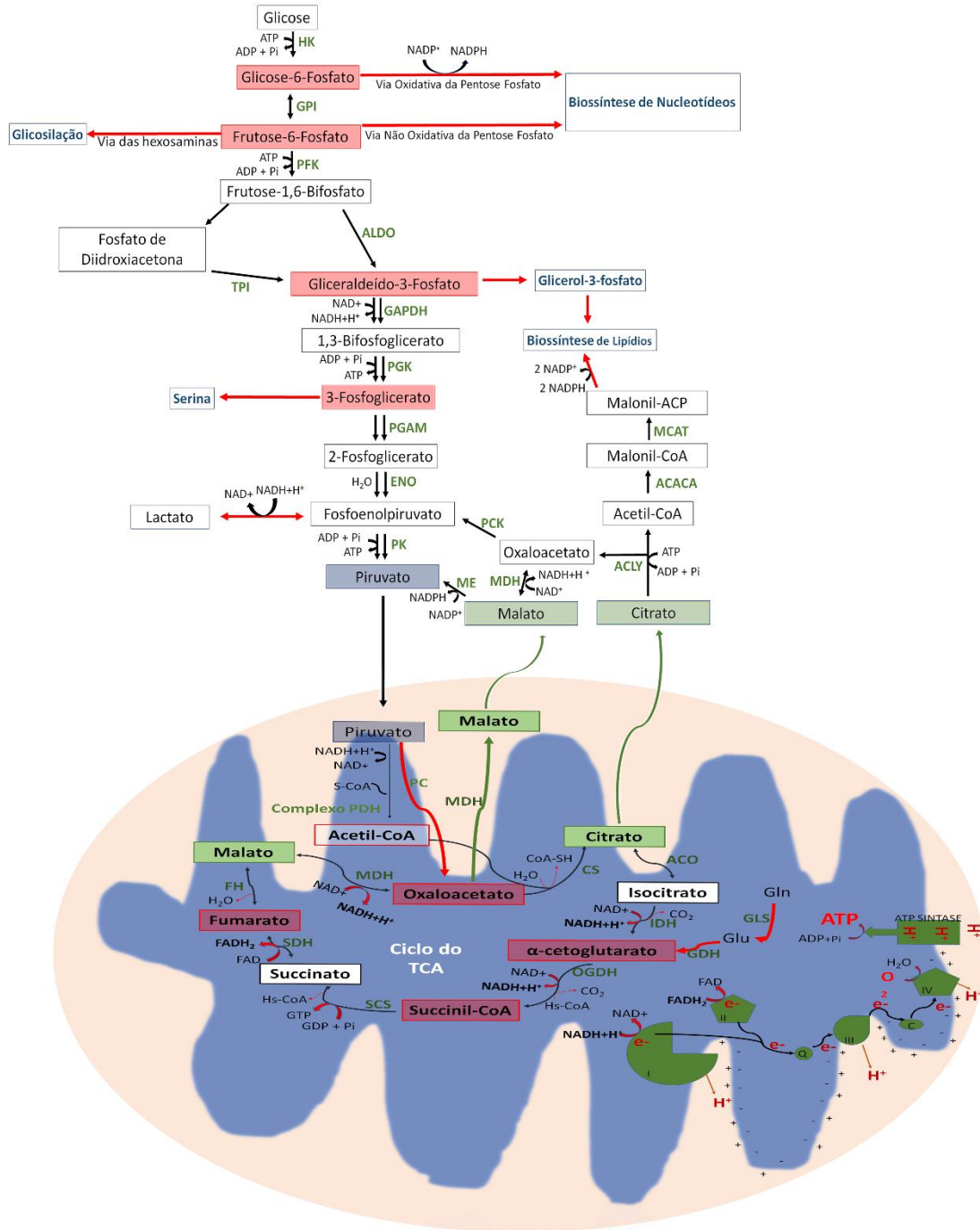


Figura 2. Figura representativa da glicólise no citosol, e do ciclo do TCA e cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias.

Nos tumores, a glicólise é utilizada, preferencialmente, para a biossíntese de macromoléculas. Os quadros em vermelho estão destacando os intermediários que podem ser desviados para as vias de pentose fosfato, hexosaminas e síntese de lipídios. As setas vermelhas grossas estão destacando as vias que são aumentadas em tumores. O ciclo do TCA sofre cataplerose, necessitando, por isso, de fontes anapleróticas para manter o *pool* dos metabólitos intermediários. No ciclo do TCA estão marcados em vermelho os intermediários que podem ser repostos por anaplerose, e em verde estão marcados os intermediários que podem evadir da mitocôndria para biossíntese no citosol. Em verde estão anotados as siglas correspondentes aos genes responsáveis pelas reações, sendo eles: HK (Hexocinase), GPI (Glicose Fosfato Isomerase), PFK (Fosfofrutocinase), ALDO (Aldolase), TPI (Triose Fosfato Isomerase), GAPDH (Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase), PGK (Fosfoglicerato Cinase), PGAM (Fosfoglicerato Mutase), ENO (Enolase), PK (Piruvato Cinase), PDH (Piruvato Desidrogenase), DLAT (Diidrolipoil Transacetilase), DLD (Diidrolipoil Desidrogenase), CS (Citrato Sintase), ACO (Aconitase), IDH (Isocitrato Desidrogenase), OGDH (Oxoglutarato Desidrogenase), SCS (Succinil-CoA Sintetase), SDH (Succinato Desidrogenase), FH (Fumarase), MDH (Malato Desidrogenase), PC (Piruvato Carboxilase), GLS (Glutaminase), GDH (Glutamato Desidrogenase), PCK (Fosfoenolpiruvato Carboxicinas), ME (Enzima málica), ACLY (ATP citrato liase), ACACA (Acetil-CoA Carboxilase), MCAT (Malonil-CoA Proteína Carreadora Transacilase). As siglas Gln corresponde ao aminoácido Glutamina e Glu, ao glutamato.

A evasão dos intermediários do ciclo do TCA pode resultar em um ciclo truncado impedindo seu funcionamento correto¹⁰⁵. Dessa forma, a reposição destes intermediários é necessária e ocorre a partir de um processo conhecido como anaplerose^{109,110}. As principais fontes anapleróticas são os aminoácidos, especialmente a glutamina, e o piruvato que, a partir de reação de carboxilação, catalisada pela enzima Piruvato Carboxilase (PC), produz oxaloacetato para reposição no ciclo do TCA (**Figura 2**).

Em tumores, o aumento da cataplerose faz com que ocorra um aumento na mesma proporção da anaplerose e, por isso, estas vias tem sido muito estudadas para o entendimento do processo tumoral^{96,109} e na busca de novos alvos terapêuticos^{111,112}. De fato, diversos trabalhos tem mostrado o aumento na expressão da PC em diversos tipos de tumores, como no câncer de pulmão^{113,114}, câncer de mama^{115,116}, leucemia¹¹⁷ e glioma¹¹⁸. Além disso, o aumento da utilização de glutamina em tumores é relacionado principalmente com o seu papel anaplerótico na reposição de α -cetogluturato (**Figura 2**). A dependência de glutamina para o processo tumoral também é relatada para diferentes tipos de tumores¹¹⁹⁻¹²¹, como em câncer de pâncreas¹²², mielomas¹²³, câncer de próstata¹²⁴ e câncer de mama^{125,126}. Wise e colaboradores (2008)¹²⁷ mostraram por espectroscopia de ressonância magnética nuclear na presença de substratos marcados com C¹³ que a glutamina é a principal precursora anaplerótico em células proliferativas de glioma. A superexpressão de MYC na linhagem celular de glioma SF188 causou um processo de reprogramação genética que culminou com a expressão de genes relacionados com o catabolismo de glutamina e tornou as células dependentes deste nutriente.

Tomados em conjunto, estas observações sugerem que o metabolismo da glutamina permite às células proliferativas manter um fluxo anaplerótico compatível com o uso dos intermediários metabólicos do ciclo TCA como precursores biossintéticos e coloca esta enzima como importante alvo a ser explorado no combate ao câncer.

1.3. Metabolismo de glutamina

As células podem oxidar a glutamina de uma maneira análoga à oxidação parcial da glicose na glicólise. Esta via, conhecida como glutaminólise, usa diversos passos do TCA, tornando a glutamina uma fonte energética para as células em proliferação^{96,128-131}. Além da oxidação, a glutamina pode ser submetida a um processo de redução em mitocôndrias defeituosas. Um estudo publicado por Mullen e colaboradores (2012)¹³² mostrou que mutações em isocitrato desidrogenase 1 e 2 (*IDH1* e *IDH2*, respectivamente) podem favorecer a redução do α -cetogluturato a citrato por um processo denominado carboxilação redutiva. Este processo tem sido descrito por ocorrer concomitantemente com a oxidação de α -cetogluturato no ciclo

do TCA¹³³ e contribuir tanto para o aumento da síntese de lipídios^{134,135} quanto para o crescimento independente de ancoragem pela manutenção do balanço redox¹³⁶.

Além da anaplerose, o metabolismo da glutamina está envolvido em diversos outros processos que contribuem para o fenótipo maligno, tais como a ativação da via de sinalização de crescimento mTORC1^{137,138}, homeostase redox da célula pela produção de glutatona^{126,139} e como fonte de nitrogênio para biossíntese de aminoácidos não essenciais, ácidos nucleicos e hexosaminas¹⁴⁰⁻¹⁴². Gaglio e colaboradores (2009)¹⁴³ sugeriram que a síntese de DNA pode ser dependente da disponibilidade de glutamina e, por isso, na ausência do aminoácido ocorre parada do ciclo celular e, conseqüentemente, da proliferação. Um outro estudo mostrou que a glutaminase é regulada durante o ciclo celular, estando mais expressa durante a fase S, síntese de DNA, diminuindo com a progressão para fase G2/M¹⁴⁴. Recentemente, diversos estudos tem mostrado a importância da glutamina e seu metabolismo para manutenção do perfil de célula embrionária¹⁴⁵⁻¹⁵¹, podendo ser importante para o aumento da agressividade dos tumores.

A glutaminase (GLS) é a enzima responsável por catalisar a desamidação hidrolítica de glutamina em glutamato e amônio¹⁵², iniciando o catabolismo desse aminoácido para suas atividades bioenergéticas e biossintéticas descritas acima. Em humanos, as isoenzimas da glutaminase são codificadas por dois genes localizados em dois cromossomos diferentes. O gene localizado no cromossomo 2 codifica a isoenzima *kidney-type* (K), que pode sofrer *splicing*, apresentando duas isoformas, uma formada pela junção dos exons 1-14 e 16-19 (*kidney-type glutaminase, KGA*)¹⁵³ e a outra formada pelos 15 primeiros exons (*glutaminase C, GAC*)¹⁵⁴. Já o gene presente no cromossomo 12 (L) codifica a isoenzima *liver-type* (LGA)¹⁵⁵. Pela importância da glutaminase no metabolismo da glutamina, esta enzima é alvo de extensos estudos e tem sido utilizada como um importante alvo terapêutico contra o câncer^{112,156-159}.

Em 2007, através de uma busca em biblioteca de compostos químicos que poderiam ser utilizados como inibidores efetivos da glutaminase, o composto bis-2-(5-fenilacetamido-1,2,4-tiadiazol-2-yl) etil sulfido (BPTES) foi identificado. Este composto foi descrito como específico e potente em inibir as isoformas KGA e GAC^{156,160}. A eficiência deste composto foi comprovada em estudo que demonstrou que na presença de *IDH1* mutado, comumente encontrada em gliomas e leucemia aguda mielogênica e que torna a enzima incapaz de gerar α -cetoglutarato a partir de isocitrato, são particularmente sensíveis ao *knockdown* ou inibição pelo composto BPTES da enzima glutaminase¹²⁹. Em outro estudo, Le e colaboradores (2012)¹²⁰ verificaram que sob hipóxia e em condições de privação de glicose, células de linfoma B são particularmente sensíveis à inibição da glutaminase por BPTES. Embora este composto não tenha sido validado para uso clínico, um estudo recente propôs que a combinação de

nanopartículas de BPTES combinado com metformina foi eficiente em controlar a progressão de tumores de pâncreas¹⁶¹.

O composto CB-839, outro inibidor de GLS, foi descrito inicialmente para câncer de mama triplo-negativo e atualmente está em fase clínica II, apresentando resultados promissores em combinação com paclitaxel para este tipo de tumor¹⁶². Em câncer de pâncreas, este inibidor foi descrito como uma eficiente terapia adjuvante, sensibilizando estes tumores ao tratamento com β -lapachone, composto que leva a depleção de NADPH por excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS)¹⁶³. Além disso, CB-839 tem se mostrado eficiente no combate a leucemias pelo sinergismo ao ABT-199¹⁶⁴, no combate ao câncer de pulmão, quando utilizado com inibidores de EGFR¹⁶⁵, e no tratamento de mielomas múltiplos, em conjunto com carfilzomib, um inibidor seletivo de proteassoma¹⁶⁶.

1.4. Metabolismo de lipídios

Em adição à glicose e à glutamina, lipídios são uma fonte energética e biossintética extremamente importante para as células, especialmente os tumores¹⁶⁷. Existem diferentes classes de lipídios que são responsáveis por diferentes funções nas células¹⁶⁸ e seu metabolismo pode ser dividido em degradação e biossíntese (**Figura 3**).

Os triglicerídeos são lipídios neutros formados por três moléculas de ácidos graxos, podendo apresentar diferentes tamanhos e níveis de saturação, ligados em glicerol por ligações do tipo éster, sendo a principal forma de armazenamento de energia proveniente de lipídios nas células. Os triglicerídeos ficam dispostos no centro das estruturas denominadas gotas lipídicas (*lipids droplets*)¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Desta maneira, estes triglicerídeos ficam acessíveis a ação de lipases, que agem liberando ácidos graxos livres quando as células precisam recorrer a estas reservas para a produção de energia. Os ácidos graxos podem produzir energia a partir da sua oxidação nas mitocôndrias.

Para isso, ácidos graxos livres são ativados em acil-CoA pela ação das enzimas Acil-coA sintetases (ACS). Estas moléculas de acil-CoA são submetidas a ação da enzima *Carnitina Palmitoyltransferase 1* (CPT1), responsável por transferir uma cadeia longa de ácido graxo do grupo CoA para uma carnitina, formando uma acilcarnitina que, pela ação da enzima *Carnitina Acilcarnitina Translocase* (CACT), passam pela membrana interna da mitocôndria.

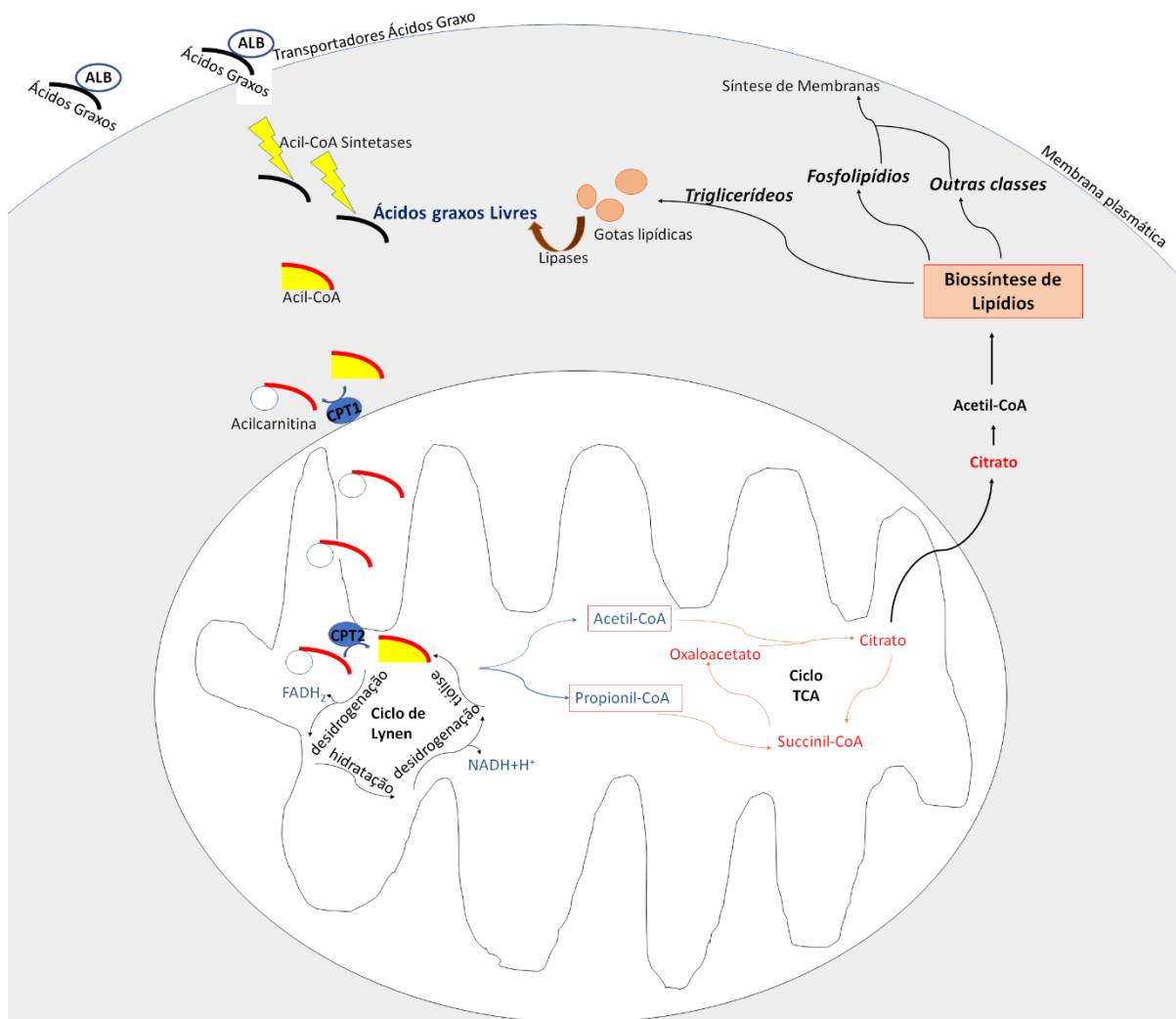


Figura 3. Figura representativa do metabolismo de lipídios.

Os lipídios de diferentes classes podem ser obtidos do meio extracelular ou sintetizados *de novo* pelas células a partir do citrato que evade do ciclo do TCA. No citoplasma, os ácidos graxos podem ser armazenados na forma de triglicerídeos em gotas lipídicas, principal reserva energética intracelular, ou os lipídios podem participar da biossíntese de membranas, importante para a proliferação celular. Em situações de privação de nutrientes, os triglicerídeos podem sofrer a ação de lipases, liberando ácidos graxos que recebem uma molécula de CoA, formando um acil-CoA. Estas moléculas são transportadas para o interior das mitocôndrias pela ação das enzimas *Carnitina Palmitoyltransferases* (CPT1 e CPT2), onde passam pelo Ciclo de Lynen, liberando acetil-CoA para alimentar o ciclo do TCA.

Na matriz mitocondrial, a acilcarnitina é submetida a ação de uma nova transferase, a *Carnitina Palmitoyltransferase 2* (CPT2) que é responsável pelo processo inverso, removendo a carnitina e adicionando uma coenzima A ao ácido graxo de cadeia longa (**Figura 4**). Na matriz mitocondrial, os ácidos graxos são oxidados em moléculas de acetil-CoA a partir de um processo denominado beta-oxidação ou Ciclo de Lynen¹⁷², contribuindo para o funcionamento do ciclo do TCA e produção de energia via fosforilação oxidativa. A primeira etapa da beta-oxidação consiste na desidrogenação catalisada por acil-CoA desidrogenases, formando uma dupla ligação entre C2 e C3 e liberando uma molécula de enoil-CoA e uma

molécula de FADH₂, um importante acceptor de elétrons utilizado na cadeia respiratória para geração de ATP. A molécula de enoil-CoA é, em seguida, hidratada por enoil-CoA hidratase, produzindo hidroaxil-CoA. Esta molécula é novamente desidrogenada por 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase liberando 3-cetoacil e uma molécula de NADH, outro acceptor de elétrons. A molécula de 3-cetoacil sofre então tiólise liberando uma molécula de dois carbonos (acetil-CoA) a cada ciclo até que toda cadeia do ácido graxo original seja quebrada. Cadeias ímpares de ácidos graxos produzem também uma molécula de propionil-CoA que pode ser uma fonte anaplerótica para o ciclo do TCA pela reposição do intermediário succinil-CoA¹⁷³.

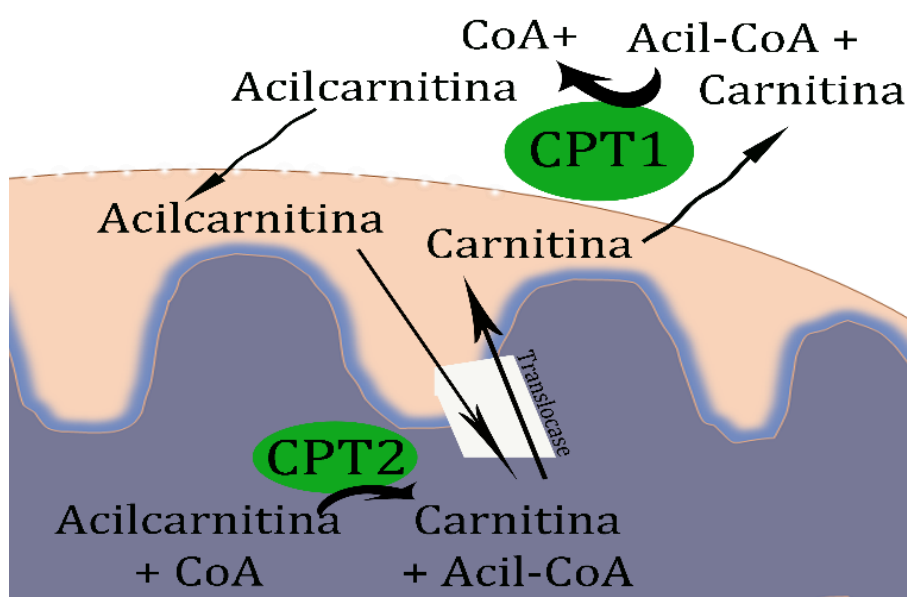


Figura 4. Esquema do transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias.

Para que as cadeias de acil-CoA sejam oxidadas nas mitocôndrias, elas são transferidas do grupo CoA para uma carnitina pela ação da enzima *Carnitina Palmitoyltransferase 1* (CPT1), formando uma molécula de acilcarnitina que é capaz de passar pela membrana interna das mitocôndrias pela ação de uma translocase. Uma vez na matriz mitocondrial, estes acilcarnitinas são transferidos novamente para um grupo CoA pela atividade de *Carnitina Palmitoyltransferase 2* (CPT2), formando o acil-CoA que será metabolizado pela beta-oxidação.

A oxidação de ácidos graxos é reportada como importante para o processo tumorigênico e está associada a diferentes tipos de tumores¹⁷⁴⁻¹⁷⁷. Em tumores de pulmão, o metabolismo de ácidos graxos pode ser alterado via KRAS mutado por seu papel na regulação da enzima Acetil-CoA Sintetase 3 (ACSL3), responsável pela ativação da cadeia acil em acil-CoA, possibilitando que os ácidos graxos sejam metabolizados e utilizados nas mitocôndrias como substrato na produção energética¹⁷⁸. A inibição de ACSL3 foi eficiente em controlar o metabolismo energético e a proliferação celular, sendo considerado um promissor alvo terapêutico para este tipo de tumor¹⁷⁹. Em outro estudo, Nomura e colaboradores (2010)¹⁸⁰ mostraram que a expressão da enzima Monoacilglicerol lipase (MAGL), responsável pela

liberação de ácidos graxos para serem oxidados, é elevada em tumores agressivos. Mostraram também que ácidos graxos são essenciais na promoção de migração, sobrevivência e crescimento do tumor *in vivo*. Além disso, estudos recentes têm mostrado que tumores metastáticos apresentam como assinatura o aumento de genes relacionados ao metabolismo de lipídios, apresentando um balanço entre a captação de lipídios exógenos (provenientes da dieta), biossíntese *de novo* e a oxidação destes nutrientes^{181,182}.

Outra classe de lipídios são os fosfolipídios, colesterol e esfingolipídios, os principais constituintes das membranas celulares¹⁶⁸. Além dos triglicerídeos, as gotas lipídicas armazenam também lipídios polares, como os fosfolipídios, que formam a superfície da organela e podem ser mobilizados para contribuir com a síntese de membranas celulares¹⁷¹. Estes lipídios podem ser captados do meio ou podem ser produzidos *de novo* pelas células a partir da evasão de citrato do ciclo do TCA para o citosol e a ação das enzimas ATP Citrato Liase (ACLY), Acetil-CoA Carboxilase (ACC) e enzimas do Complexo Ácido Graxo Sintase (FAS), utilizando o cofator NADP⁺ como doador de elétrons e ACP (Proteína Carreadora de Acila) contendo um grupamento (coenzima) 4- fosfopanteteína, como grupo carreador da molécula de acil formada (**Figura 3**).

Ao contrário da beta-oxidação de ácidos graxos, o processo de síntese de lipídios apresenta gasto energético, fazendo com que o mesmo ocorra quando as células possuem um excedente energético que pode ser utilizado para aumento da biomassa e consequente divisão celular¹⁸³. Em tumores, a síntese de lipídios *de novo* tem sido caracterizada como importante fator para o fenótipo tumoral. Diversos tipos de cânceres apresentam uma expressão elevada das enzimas limitantes do processo, além de ser observado que a principal fonte de lipídios para síntese de membranas e manutenção da homeostase celular não são provenientes de fontes externas e sim da síntese *de novo*, assim como observado em células embrionárias¹⁸⁴. Por seu papel na progressão tumoral, e a alta expressão das enzimas que regulam a síntese *de novo* ser específica de células tumorais, uma vez que células não tumorais tem como principal fonte de lipídios o meio externo, estas enzimas têm sido avaliadas como promissores alvos terapêuticos para o câncer¹⁸⁵⁻¹⁹⁰.

1.5. Regulação Metabólica

O balanço entre a síntese de macromoléculas e a produção de ATP é essencial para a sobrevivência celular¹⁹¹. O sensor de nutriente mTOR (Proteína alvo de rapamicina em mamíferos, do inglês, *Mammalian target of rapamycin*) e o sensor energético AMPK (Proteína cinase ativada por AMP, do inglês, *AMP-activated protein Kinase*) são inversamente

correlacionados e responsáveis pelo controle das principais vias biossintéticas e bioenergéticas celulares (**Figura 5**)^{192,193}.

A proteína mTOR é uma cinase serina/treonina altamente conservada, pertencente à família de cinases relacionadas a PI3K (Fosfoinosítídeo 3-cinase, do inglês, *Phosphoinositide 3-kinase*)¹⁹⁴. Esta proteína está presente em dois tipos de complexos¹⁹⁵, sendo eles mTORC1, sensível à rapamicina e um importante sensor de nutrientes^{137,196,197} e mTORC2, insensível à inibição por rapamicina e associado, principalmente, à organização de citoesqueleto¹⁹⁸.

A proteína AMPK forma um complexo heterotrimétrico muito conservado e expresso em todos eucariotos¹⁹⁹. Sua principal função é monitorar mudanças nos níveis intracelulares de ATP, regulando negativamente vias de biossíntese e positivamente vias catabólicas para manutenção da homeostase celular^{199,200}. Em condições de estresse energético ocorre acúmulo de AMP, que se liga à AMPK, desencadeando sua fosforilação e ativação. Esta proteína é composta por três subunidades: uma subunidade catalítica α (com as variantes $\alpha 1$ e $\alpha 2$), uma subunidade regulatória β (com as variantes $\beta 1$ e $\beta 2$) e uma subunidade de ligação de AMP γ (com as variantes $\gamma 1$, $\gamma 2$ e $\gamma 3$)²⁰¹. A subunidade catalítica α possui domínio serina/treonina, típica de proteína cinase, sendo fosforilada na posição Thr¹⁷² principalmente por duas cinases, o supressor de tumor LKB1 (Cinase do fígado B1, do inglês, *Liver kinase B1*)^{202,203} e a cinase dependente de cálcio CAMKK β (do inglês, *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase β*)^{204,205}. A subunidade β apresenta domínio de ligação ao glicogênio CBM (Módulos de ligação à carboidrato) e domínios de fosforilação descritos como autofosforilativos ou sem proteínas cinases conhecidas. Estas fosforilações aparentam não ter interferência na atividade da proteína²⁰⁶. Por fim, a subunidade γ contém domínios CBS (cistationina- β -sintase) que formam a região de ligação de AMP, responsável pela ativação alostérica da proteína²⁰⁷.

O complexo mTORC1 é um importante regulador de crescimento e metabolismo celular por promover processos anabólicos importantes²⁰⁸, como a atividade e biogênese de mitocôndrias²⁰⁹, biossíntese de proteínas e lipídios²¹⁰, além de limitar processos catabólicos, como a autofagia²¹¹. A regulação de sua atividade é em parte feita por GTPases (trifosfatases de guanosinas) da família Rag, promovendo a localização de mTORC1 nos lisossomos em resposta à disponibilidade de glicose, glutamina e outros aminoácidos^{137,138,212}. Nos lisossomos, mTORC1 é ativado por sua ligação com Rheb-GTP (do inglês, *GTP-bound Ras homolog enriched in brain*), que ocorre quando o complexo do tipo GAP (Proteína ativadora de GTPase) TSC1-TSC2 (Complexo esclerose tuberosa) está inativado²¹³.

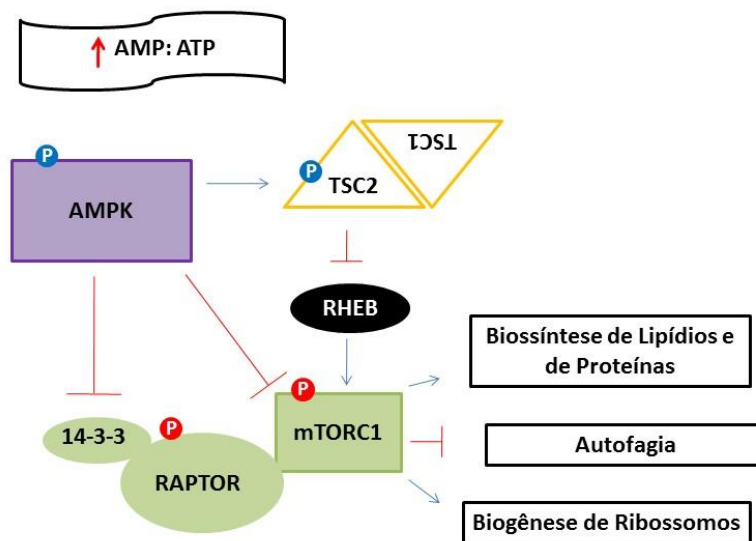


Figura 5. Regulação do metabolismo por AMPK

Com o acúmulo de AMP nas células, AMPK é ativada e inibe a atividade de mTORC1 de três diferentes maneiras: fosforilação direta de mTOR; fosforilação de Raptor, permitindo a ligação de proteínas da família 14-3-3, impedindo a formação do complexo mTORC1; fosforilação de TSC2, ativando o complexo TSC1-TSC2 que impede o acúmulo de Rheb ativada (ligada a GTP), importante ativador de mTORC1. Após inativação do complexo mTORC1, vias biossintéticas, como produção de lipídios e proteínas, são inativadas e vias catabólicas, como a autofagia, são ativadas. Ativação é representada pela cor azul e inativação, pela cor vermelha. Adaptado de Carling (2016)¹⁹⁹

Quando ativada, AMPK pode regular negativamente a atividade de mTORC1¹⁹⁹ (**Figura 4**) por fosforilação direta de mTOR no resíduo Ser²⁴⁴⁶ e de Raptor nos resíduos Ser⁷²² e Ser⁷⁹². A fosforilação de Raptor facilita a ligação de membros da família 14-3-3²¹⁴, proteínas que reconhecem sítios serinas treoninas fosforilados e desencadeiam modificações estruturais, inativando a proteína alvo²¹⁵. Além disso, AMPK pode agir indiretamente, ativando o complexo TSC1-TSC2 por fosforilação dos resíduos Ser¹³⁸⁷ e Thr¹²⁷¹ de TSC2, formando Rheb-GDP, incapaz de ativar o complexo mTORC1²¹⁶. Dessa maneira, a regulação entre AMPK e mTORC1 controla as vias biossintéticas e catabólicas de acordo com a disponibilidade de nutrientes e necessidades energéticas das células.

Outro importante papel de AMPK no balanço energético das células é o controle da via de biossíntese de lipídios via fosforilação do resíduo Ser⁷⁹ da enzima ACC²¹⁷. Esta enzima é limitante no processo de síntese de lipídio *de novo* por ser responsável pela conversão de acetil-CoA em malonil-CoA, substrato inicial para o processo (**Figura 2**). Além disso, malonil-CoA é responsável pela inibição da enzima CPT1, limitante para que ácidos graxos sejam oxidados nas mitocôndrias²¹⁸ (**Figura 4**). Sendo assim, quando ativado, ACC é responsável tanto pela síntese de ácidos graxos quanto por impedir que estes sejam oxidados.

Em condições de estresse energético, quando os níveis de ATP estão baixos e AMPK está ativada, ela é capaz de fosforilar ACC, inativando a enzima. Esse processo é

importante tanto para inibir a biossíntese quanto para ativar a oxidação de ácidos graxos para a produção de energia como recurso para manutenção da viabilidade celular^{217,219-221}. Além disso, esta proteína é capaz de bloquear a síntese de lipídios pela repressão transcricional de SREPB (Proteína de ligação à elementos regulatórios de esteróis, do inglês, *Sterol regulatory element-binding protein*)²⁰¹, principal fator de transcrição de genes envolvidos nos passos da biossíntese. Outra importante contribuição de AMPK para ativação de beta-oxidação é sua ação na fosforilação de PPAR α ²²², tornando este fator de transcrição ativo e, assim, aumentando a expressão de genes envolvidos no processo.

Sendo assim, o estudo de proteínas metabólicas como alvos terapêuticos para o câncer devem levar em conta os processos de adaptação metabólica que estas células podem ser submetidas.

1.6. Adaptação metabólica

A adaptação metabólica é uma ferramenta disponível para células tumorais sobreviverem a estresses causados pela falta de nutrientes e oxigênio^{109,132,223,224}. A busca por alvos metabólicos para desenvolvimento de quimioterápicos é emergente^{89,225-227}, porém, o conhecimento do perfil molecular e de possíveis estratégias de resistência que as células tumorais podem desenvolver é necessário²²⁸⁻²³⁰. Como exemplo, um estudo recente mostrou que depleção de serina exógena, normalmente convertida em glicina para síntese de purinas, glutatona e outros metabólitos, causa uma ativação na via de síntese desse nutriente a partir do intermediário glicolítico 3-fosfoglicerato. O desvio de 3-fosfoglicerato para a síntese de serina, entretanto, causa uma diminuição nos níveis de ATP que é compensada pelo aumento de fluxo de piruvato para o ciclo do TCA, aumentando a taxa de fosforilação oxidativa e diminuindo a produção de lactato nestas células. Além disso, pela diminuição da disponibilidade de serina e, conseqüentemente, de glicina, p21 é ativado por p53, bloqueando a síntese de purinas, dando preferência para a síntese de glutatona, importante para o balanço redox das células²²⁴.

A oxidação de ácidos graxos tem sido proposta como uma importante via de adaptação metabólica em células submetidas a estresse energético²³¹⁻²³³ e também relacionada a mecanismo de resistência a terapias. Staubert e colaboradores (2015)²³⁴ mostraram que os mecanismos de resistência em leucemias estão intimamente ligados a uma reprogramação metabólica dependente do aumento da captação de glicose e da taxa de oxidação de ácidos graxos. Em outro estudo, Hermanová e colaboradores (2015)¹⁷⁵ mostraram que a utilização de L-asparaginase (ASNase), um componente essencial no tratamento de crianças com leucemia linfoblástica aguda (ALL), causa depleção de nutrientes e reprogramação metabólica que ativa

vias de sobrevivência e proliferação celulares. Dessa maneira, o tratamento com esta enzima levou ao aumento dos níveis de beta-oxidação, autofagia, respiração mitocondrial, causando a seleção de células resistentes a esse tratamento. Os autores propuseram o tratamento sinérgico de L-asparaginase com etomoxir, composto inibidor de beta-oxidação, como promissor para inibir a progressão desse tipo de leucemia.

Em outro exemplo do processo de adaptação, um estudo mostrou que linhagens tumorais de mama, próstata e pulmão que apresentavam alta expressão de CPT1C eram resistentes à rapamicina, um potente inibidor de mTORC1, além de apresentarem ativação de beta-oxidação por AMPK e maior resistência à depleção de nutrientes²²¹. Os autores também mostraram que o *knockdown* de CPT1C levou a redução do crescimento de tumores em modelos xenográficos.

1.7. Câncer de mama triplo-negativo tem metabolismo glutaminolítico aumentado

O consumo aumentado de glicose^{87,235-238} e de glutamina^{84,125,126} e o metabolismo de lipídios^{174,239-242} são amplamente estudados para o câncer de mama triplo-negativo, sugerindo uma relação entre sua agressividade e o metabolismo desses nutrientes. Recentemente, Louie e colaboradores (2016)²⁴³ identificaram a enzima Glutathione-S-transferase Pi 1 (GSTP1) como importante no processo tumorigênico de tumores triplo-negativos por seu papel na ativação de Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Neste trabalho, os autores mostraram que a inibição farmacológica de GSTP1 e, conseqüente inibição de GAPDH foi eficiente em controlar o processo tumorigênico em linhagens celulares e em modelo xenográfico pela inibição da glicólise e redução da biossíntese de lipídios e aminoácidos.

Em outro estudo, Pelicano e colaboradores (2015)²³⁷ mostraram que linhagens de câncer de mama triplo-negativas exibiam uma diminuição no consumo de oxigênio e aumento no consumo de glicose e produção de lactato quando comparadas com células positivas para receptores hormonais, sugerindo um aumento no efeito de Warburg nessas células. Além disso, demonstraram que mTOR é importante para regular fosforilação oxidativa e que manipular a expressão de genes metabólicos chaves, como p70S6K, poderia alterar respiração e metabolismo de glicose, tornando as células menos resistentes a terapias e mais propensas à morte celular.

Nos últimos anos, o metabolismo de lipídios tem se mostrado importante para a progressão de tumores triplo-negativos^{174,239,242,244}. Um estudo realizado por Camarda e colaboradores (2016)²⁴² mostraram que tumores triplo-negativos com alta expressão do fator de

transcrição MYC é extremamente dependente da oxidação mitocondrial de ácidos graxos para manutenção do metabolismo energético desse tipo de tumor, e mostraram que a inibição desta via é eficiente em reduzir a produção de energia e inibir a proliferação celular, sugerindo que a inibição da oxidação de ácidos graxos em tumores com alta expressão de MYC pode ser uma importante estratégia terapêutica.

Em outros estudos^{174,239,244}, a oxidação de ácidos graxos tem se mostrado importante para o perfil agressivo desses tumores. Park e colaboradores (2016)¹⁷⁴ mostraram em linhagens celulares e modelos xenográficos que o processo de invasão em triplo negativo é dependente da autofosforilação em Y419 de Src e que a oxidação de ácidos graxos contribui para que Src seja fosforilado em um mecanismo de *feedback*.

O metabolismo de glutamina também tem sido descrito como limitante para a progressão tumoral em câncer de mama triplo-negativo. Geldermalsen e colaboradores (2016)¹²⁵ mostraram que linhagens de câncer de mama apresentam alta expressão do transportador de glutamina ASCT2, mas que a inibição desta proteína é eficiente em reduzir a proliferação e induzir a apoptose especificamente das linhagens triplo negativas, além de reduzir o crescimento do tumor em xenográficos. Em outro estudo, a ação do composto inibidor de glutaminase CB-839 foi caracterizado em linhagens de mama triplo negativas, e foi demonstrado que este inibidor é um antiproliferativo promissor em linhagens celulares, além de apresentar uma resposta farmacodinâmica tumor-específica em modelos xenográficos, sugerindo que sua ação na inibição de glutaminase em pacientes com câncer de mama triplo-negativo pode ser uma importante estratégia contra o tumor¹¹². Atualmente, a combinação de CB-839 e paclitaxel está em testes clínicos Fase II para pacientes de câncer de mama triplo-negativo¹⁶².

Em 2013, Timmerman e colaboradores mostraram que linhagens celulares deste subtipo de câncer de mama apresentam alto consumo e dependência de glutamina para a proliferação, manutenção da viabilidade celular e controle de espécies reativas¹²⁶. Mostraram também que embora linhagens celulares triplo-negativas utilizam glutamina para manutenção da proliferação celular e inibição de apoptose, a dependência entre as linhagens é variada, sugerindo a existência de mecanismos de adaptação metabólica alternativos ao uso de glutamina nestas células. Uma vez que o composto CB-839 tem se mostrado promissor no tratamento deste tipo de tumor de mama, nós buscamos entender quais seriam os possíveis mecanismos de adaptação e resistência que linhagens triplo-negativas poderiam ativar para sobrevivência e manutenção do fenótipo tumoral.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Entender os processos envolvidos na adaptação metabólica sofrida em linhagens celulares de câncer de mama triplo-negativo dependentes de glutamina após a inibição do metabolismo deste aminoácido, assim como o metabolismo alternativo de células não dependentes deste nutriente.

2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a dependência de glutamina e da atividade de GLS para a proliferação celular nas linhagens TN MDA-MB-231, BT549, Hs578T, MDA-MB-157, MDA-MB-436, MDA-MB-468, MDA-MB-453, HCC38, HCC70, HCC1143, HCC1806, HCC1937.

2. Avaliar a sensibilidade destas linhagens à inibição de glutaminase por BPTES ou CB-839 em relação proliferação, morfologia mitocondrial e níveis de ATP;

3. Avaliar o nível proteico e de mRNA de glutaminase entre as diferentes linhagens;

4. Analisar dados de transcriptômica disponíveis no laboratório (sequenciamento *in house* ou de banco públicos) tanto de linhagens celulares quanto de tumores de pacientes de câncer de mama e investigar, pela busca de vias diferencialmente expressas entre linhagens sensíveis e resistentes a inibição de glutaminase e entre tumores de mama com maior e menor expressão de *GLS*

5. Avaliar o impacto da inibição de glutaminase e da via alternativa encontrada na respiração celular, níveis de ATP e nos fenótipos tumorais de proliferação, migração e invasão;

6. Entender as vias de sinalização responsáveis pela alternância entre as diferentes vias metabólicas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultivo celular

Neste trabalho utilizamos 12 linhagens celulares de mama triplo-negativas (BT549, Hs578T, MDA-MB157, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB453, MDA-MB-468, HCC38, HCC70, HCC1143, HCC1806, HCC1937) (**Tabela 1**). Todas as linhagens foram cultivadas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Tabela 1. Linhagens celulares tumorais TN utilizadas no estudo de acordo com suas características histológicas e subclassificação⁸⁰

Linhagem	Histologia/fonte	Subtipo Molecular
BT549	Carcinoma ductal invasivo	Baixa Claudina
Hs578T	Carcinosarcoma	Baixa Claudina
MDA-MB-157	Câncer de mama medular	Baixa Claudina
MDA-MB-231	Carcinoma ductal invasivo	Baixa Claudina
MDA-MB-436	Carcinoma ductal invasivo	Baixa Claudina
MDA-MB-453	Adenocarcinoma/metástase	Luminal
MDA-MB-468	Carcinoma ductal	Basal
HCC38	Carcinoma ductal	Baixa Claudina
HCC70	Carcinoma ductal	Basal
HCC1143	Carcinoma ductal	Basal
HCC1806	Carcinoma de células escamosas	Basal
HCC1937	Carcinoma ductal	Basal

3.2. Knockdown

Com a finalidade de estudar os efeitos do *knockdown* dos genes codificantes das proteínas glutaminase (GLS), *Carnitina Palmitoyltransferase 1A* (CPT1A) e *AMP-activated protein kinase* (AMPK) subunidade α , realizamos a clonagem de sequência codificante para shRNA em vetor lentiviral pLKO com resistência ao agente de seleção purimicina para a sequência de shGLS e em vetor lentiviral TET-pLKO (vetor induzível por doxiciclina) com resistência ao agente de seleção neomicina para as sequências de shCPT1A e shAMPK. Como controle utilizamos sequências para as proteínas não humanas *green fluorescent protein* (shGFP) e luciferase (shLUC).

Os oligonucleotídeos para a construção dos shRNAs foram desenhados a partir de sequências depositadas na plataforma TRC (The RNAi Consortium) e contém, no sentido 5' – 3', as extremidades coesivas para as enzimas AgeI e EcoRI, região de reconhecimento do alvo, seis nucleotídeos para a formação de um *hairpin* e novamente a região de reconhecimento do alvo, complementar à anterior (**Tabela 2**).

Tabela 2 . Sequências dos shRNAs utilizados.

Alvo	Sequência
GFP	5'-CAAGCTGACCCTGAAGTTCAT-3'
LUC	5'-CTTACGCTGAGTACTTCGAC-3'
GLS	5'- CAACTGGCCAAATTTCAGTC-3'
CPT1A	5' -CGATGTTACGACAGGTGGTTT-3'
AMPK α	5' -ATGAGTCTACAGCTATACCAA- 3'

Os oligonucleotídeos *forward* e *reverse* foram submetidos a uma reação de anelamento com utilização de 2,5 μ M de cada oligonucleotídeo, tampão NEB 2 (New English Biolabs) 1X e água, em um volume final de 50 μ L. A reação foi aquecida em termociclador a 95°C por 5 min e em seguida a 70°C por 10 min. Depois disso foi mantida em um decaimento de temperatura de 0,1°C/s até atingir a temperatura de 25°C. Os oligonucleotídeos anelados foram subsequentemente ligados ao vetor pLKO previamente digerido com AgeI e EcoRI. Para a reação de ligação, foram utilizados oligonucleotídeos anelados (2,5nM), T4 DNA ligase (40000 U.mL⁻¹) (NEB), T4 polinucleotídeo cinase (1000 U.mL⁻¹) (NEB), tampão de T4 DNA ligase (NEB) 1X e 100 ng de pLKO digerido e água em um volume final de 10 μ L. A reação foi incubada por 3 horas a TA e, então, utilizada na transformação de *Escherichia coli* termocompetentes previamente preparadas. Realizamos a confirmação dos clones positivos por PCR de colônia e, então, escolhemos algumas colônias para confirmação da integridade da sequência por sequenciamento. As análises de sequenciamento foram realizadas pelo *software* SnapGene.

3.3. Produção Viral

A linhagem HEK293 mantida em meio DMEM alta glicose foi plaqueada em uma densidade de 700 células/ mm² em placa de 60 mm. Após 24 horas, o meio foi trocado e as células foram transfectadas com 15 ng de PEI em solução salina de NaCl 150 mM e uma taxa de DNA de 3,5 ng/mm² na proporção de 4:3:1 de DNA de transferência (sequência do shRNA de interesse), DNA de empacotamento do vetor (psPAX2) e DNA de formação do envelope VSV-G lentiviral (pMD2.G), respectivamente. Após 8 horas o meio contendo os reagentes de transfecção foi retirado e 3 mL de meio foi adicionado. A cada 12 horas durante três dias o meio foi coletado e centrifugado a 1000g por 5 minutos e mantidos a 4°C. No final das cinco coletas, o meio coletado foi alíquotado e congelado.

Para estimar a concentração de partículas virais infectantes, a linhagem NIH3T3 foi plaqueada na densidade de 500 células/mm² em seis poços de uma placa de 24 poços. Após aderidas, o meio foi trocado por 500 μ L de meio contendo 8 μ g/mL de polibreno e 0,001 , 0,01,

0,1, 1 e 10 μL de meio com vírus. O meio foi trocado após 24 horas contendo o agente de seleção do plasmídeo empacotado. A cada dois dias o meio foi trocado e após sete dias as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa (*Bioclin*). O número de colônias formadas multiplicado pelo fator 10^4 foi usado para estimar o número de unidades formadoras de colônias por mL, ou UFC/mL (título viral).

3.4. Proliferação Celular

As células foram contadas e plaqueadas na densidade de 62,5 células/ mm^2 em quadruplicata em placas de 96 poços. Após as células aderirem (cerca de 24hs), uma placa controle foi fixada com formaldeído 3,7% e as células tiveram os núcleos marcados com 0,5 $\mu\text{g/mL}$ DAPI (*Invitrogen, #D1306*). Esta placa foi utilizada para definição de número de células inicial e foi considerada como tempo 0 (T0). Outra placa teve o meio trocado para que os poços tivessem as diferentes condições testadas. Após 96 horas, a placa foi fixada e os núcleos foram marcados com DAPI e considerada como tempo 1 (T1). A leitura da placa foi realizada pelo microscópio Operetta (*Perkin Elmer*). Algoritmos internos do programa Harmony foram responsáveis pela determinação do número de núcleos. A taxa de proliferação (número de células em 96 horas $>$ número de células inicial) e de morte celular (número de células em 96 horas $<$ número de células inicial) foram calculadas das seguintes maneiras: Proliferação: $100 * \{[\text{condição teste (T1/T0)}] / \text{condição controle (T1/T0)}\}$, Morte celular: $100 * (1 - [\text{condição teste (T1/T0)}])$. As condições testadas foram:

- a) Experimento retirada de glutamina: as células foram mantidas em meio RPMI completo (2 mM de glutamina, 11 mM de glicose, condição controle) suplementado com 10% de soro fetal bovino dialisado. Alternativamente, as células foram mantidas em um meio idêntico, mas sem adição de glutamina (condição teste).
- b) Experimento sensibilidade ao CB-839: As células foram tratadas com 1 μM CB-839 (condição teste) ou com 0,1% DMSO (condição controle) em meio completo suplementado com 10% de soro fetal bovino.
- c) Sensibilidade à CB-839 e etomoxir: As células foram tratadas em meio completo com 10% de SFB adicionado de 0,5% DMSO (condição controle), 1 μM CB-839 + 0,4% DMSO (condição teste), 200 μM etomoxir + 0,1% DMSO (condição teste) ou 200 μM etomoxir + 1 μM CB-839 (condição teste). Os tratamentos foram preparados para que a concentração final de DMSO sempre fosse de 0,5%.
- d) Tratamento com composto C: As células foram tratadas em meio completo com 10% de SFB adicionado de 0,15% DMSO (condição controle), 1 μM CB-839

+0,05% DMSO (condição teste), 0,1% DMSO + 3 μ M composto C (condição teste), 1 μ M CB-839 + 3 μ M composto C (condição teste).

3.5. Western Blot

Lisados celulares foram quantificados pelo método de Bradford, utilizando BSA na construção da curva-padrão (BioRad). Cerca de 30 μ g de lisado foi separado pela técnica de SDS-PAGE utilizando-se gel gradiente 3-15%. As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF empregando-se transferência semi-seca em solução 250 mM Tris Base e 192 mM glicina, a 25V, 1.3 mA por 7 minutos. Após essa etapa, a membrana foi bloqueada com 3% de leite em TBS/0.05% Tween 20 por 1 hora. Para a detecção das proteínas de interesse, a membrana foi incubada com anticorpo primário por 16 horas a 4°C, seguida de incubação com anticorpo secundário acoplado a *horseradish peroxidase* por 3 horas à temperatura ambiente. A presença da banda protéica foi detectada adicionando-se reagente Luminol (*ECL Detection Reagent* – Pierce) à membrana seguido do contato da mesma com filme autoradiográfico (*BioMaxlight film* – Kodak) pelo tempo julgado necessário. Os anticorpos utilizados foram: anti-GLS (abcam, #ab156876), anti-pACC Ser79 (Abcam, #ab68191), anti-CPT1A (abcam, #ab128568), anti-vinculina (abcam, #ab18058), anti-actina (abcam, #ab3280).

3.6. Imunofluorescência

As células foram contadas e plaqueadas na densidade de 187,5 células/mm² em triplicata em placa de 96 poços CellCarrier (PerkinElmer, #6005558). Após aderidas, as células foram tratadas com 1 μ M de CB-839 ou 0,1% DMSO por 48 horas. Fixamos as células com paraformaldeído 3,7% por 20 minutos e permeabilizamos por 5 minutos com 0,2% Triton X-100 em PBS 1X. Para bloqueio de interações inespecíficas, utilizamos solução de Heparina com Dextran Sulfato (5mg/mL Heparina Sódica 5000UI/mL, 5mg/mL, 0,1% Tween 20 em água, 0,05% Azida de sódio em água. Solução feita em PBS 1x, pH 7,4) por 30 minutos. Em seguida, incubamos com solução de bloqueio e permeabilização por 1 hora em câmara úmida (1% BSA, 0,1% Triton X-100, 50mM Glicina, 10% Soro Goat, solução feita em PBS 1x, pH 7,4), e lavamos três vezes com tampão de trabalho (solução de bloqueio e permeabilização, 5x diluída). Incubamos *overnight* a 4°C em câmara fria com o anticorpo primário anti CPT1-A (Abcam, 1:1000) diluídos em solução de trabalho. Após três lavagens com solução de trabalho, incubamos por 1 hora em câmara úmida a temperatura ambiente o anticorpo secundário Alexa 488 mouse (1:400, Invitrogen, #A11017), diluído em solução de trabalho. Por último,

marcamos núcleo com 1 $\mu\text{g/mL}$ DAPI por 10 minutos. A leitura da placa foi realizada pelo microscópio Operetta (*Perkin Elmer*) em modo confocal com a objetiva 40X *High Numerical aperture*. Algoritmos internos do software *Columbus* foram responsáveis pelas análises de intensidade de fluorescência. Em nossas análises, utilizamos a média (por condição avaliada) dos valores de somatório de fluorescência por célula.

3.7. Consumo glutamina e produção glutamato

As células foram contadas e plaqueadas na densidade de 937,5 células/ mm^2 em triplicata em placa de 96 poços. Após as células aderirem, o meio foi retirado e as células foram mantidas por 12 horas em 50 μL de meio RPMI com 10% de SFB. Após este período, 10 μL de meio foi misturado com 180 μL de tampão de reação (50 mM Tris-acetate, pH 8.6, 2 mM NAD^+ e 50 mM K_2HPO_4) e o *background* de absorção a 340 nm foi medido. Em seguida, para quantificar a concentração de glutamato no meio, 0,3 U de glutamato desidrogenase (GDH) em 10 μL de tampão de reação foi adicionado à mistura e a placa foi incubada à temperatura ambiente por cerca de 40 minutos (ou até que a reação atingisse o platô) e lida para absorbância em 340 nm. Em seguida, para quantificação de glutamina, 12 pmol de glutaminase C recombinante em 10 μL de tampão de reação foi adicionada a mistura e novamente incubada a temperatura ambiente por cerca de 40 minutos, até que a reação atingisse novamente o platô, quando, então, foi lida para absorbância 340 nm. Todas as leituras foram realizadas no leitor de placas EnSpire (*Perkin Elmer*). Os valores obtidos após adição das enzimas foram subtraídos do valor do *background* e as concentrações de glutamina e glutamato no meio foi encontrado através de curvas-padrões construídas para cada ensaio.

3.8. Medida de beta-oxidação por fluorescência

Para quantificar beta-oxidação em nossas linhagens, utilizamos BODIPY 558/568 C_{12} (*Life Technologies*) (Red C_{12}) de acordo com protocolo descrito por Rambold (2015)²⁴⁵. As células foram contadas e plaqueadas na densidade de 125 células/ mm^2 . Após 24 horas, o meio foi trocado por RPMI suplementado com 2 mM de glutamina, 11 mM de glicose e 5% SFB com adição de 1 μM de BODIPY 558/568 C_{12} por 16 horas. Após esse período, o meio foi substituído por meio contendo 2,5 μM HOESCHT (*Life Technologies*, #H3570) por três horas, para que o análogo de ácido graxo incorporado fosse utilizado pelas células e o núcleo fosse marcado. Alternativamente, neste período de três horas, as células foram mantidas com 50 μM etomoxir como controle do experimento. Imediatamente após o tratamento, as imagens foram capturadas pelo microscópio Operetta com a objetiva 20X

Long WD. A intensidade de fluorescência foi quantificada por algoritmos internos do programa *Columbus*. Em nossas análises, utilizamos a média (por condição avaliada) dos valores de somatório de fluorescência por célula.

3.9. Medida de beta-oxidação por liberação de $^{14}\text{CO}_2$

Os experimentos de *trapping* de CO_2 foram realizados em colaboração com o professor Ariel Mariano Silber e o auxílio do doutorando Rodolpho Ornitz, do Laboratório de Bioquímica de Trypiz, ICB, USP. Para medida de CO_2 proveniente da beta-oxidação, utilizamos (^{14}C)-ácido palmítico uniformemente marcado (atividade específica = 57 mCi/mmol) (Amersham, GE) de acordo com protocolo descrito anteriormente²⁴⁶ com algumas alterações. As células foram plaqueadas em uma densidade de 2000 células/ mm^2 em garrafa de 12,5 cm^2 sem filtro. Após 24 horas, as células foram lavadas 1x com PBS e mantidas em meio RPMI suplementado com 2,5 mM glicose, 1 mM glutamina, 1 mM carnitina, 25 mM HEPES e 1% soro fetal bovino. Neste meio foi adicionado 100 μM BSA-palmitato contendo 0,25 μCi de (^{14}C)-ácido palmítico por amostra. Na tampa das garrafas foi colocado filtro Whatman 4 cm^2 embebido com 30 μL de 2 M KOH. Após incubação de três horas, os filtros foram colocados em 1 mL de líquido de cintilador e foram avaliadas pelo número de cintilações por minuto (CPM) através do cintilador Beckman Coulter LS6500 *Multipurpose Scintillation Counter* (Beckman).

3.10. Medida de respiração

Para medir a respiração celular, utilizamos o equipamento Seahorse (*Agilent*) em colaboração com o professor Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira e o mestrando Felipe Corrêa da Silva do Laboratório de Imunometabolismo, UNICAMP. Para medir a capacidade de respiração das células, utilizamos o kit XF Cell Mito Stress Test composto pelos inibidores Oligomicina A, Carbonil Cianeto p-Trifluorometoxifenil Hidrazona (FCCP), Rotenona e Antimicina A.

A oligomicina A é um composto que se liga à ATP sintase bloqueando a entrada de prótons e, portanto, impedindo que o gradiente eletroquímico formado se desfaça para a produção de ATP. A manutenção do alto gradiente impede que a cadeia respiratória continue funcionando, diminuindo o consumo de O_2 .

O FCCP é um desacoplador mitocondrial por desfazer o gradiente eletroquímico, fazendo com que a energia acumulada que seria utilizada na síntese de ATP seja liberada para formar calor e o consumo de O_2 seja o máximo da capacidade da mitocôndria. Essa propriedade

é devido ao caráter altamente hidrofóbico deste inibidor, garantindo que consiga passar pela membrana interna mitocondrial, onde libera seu próton dissociável, desfazendo o gradiente eletroquímico.

A Rotenona bloqueia o Complexo I da cadeia respiratória, enquanto que a Antimicina A bloqueia o complexo III. O uso conjunto destes dois inibidores garante o bloqueio da cadeia respiratória e o consumo de O₂ mitocondrial.

Para avaliar o impacto da inibição de glutaminase e de beta-oxidação na respiração celular, utilizamos a linhagem BT549 apresentando *knockdown* de *GLS* (shGLS) e/ou de *CPT1A* (shCPT1A). Avaliamos o perfil do consumo de oxigênio destas sublinhagens a partir do tratamento com os reguladores da atividade mitocondrial descritos acima.

3.11. Conjugação BSA-palmitato

Inicialmente, preparamos uma solução 7,5% BSA pela diluição de 750 mg de BSA livre de ácidos graxos em 10 mL em água milliQ e mantivemos esta solução a 37°C até que a diluição fosse completa. Enquanto isso, preparamos uma solução de 76 mM palmitato de sódio, adicionando 10,7 mg em 500 µL de água milliQ e mantivemos esta solução a 70°C até sua completa diluição. Para obter a solução 7% BSA conjugado com 2,5 mM palmitato, nós adicionamos 162,5µL de palmitato 76mM a 4,675mL de BSA 7,5%. Essa solução foi mantida sob agitação a 37°C por cerca de 1 hora até que estivesse translúcida. A solução foi alíquotada e mantida a -80°C.

3.12. Atividade de CPT1

A medida da atividade de CPT1 foi realizada como descrito anteriormente²⁴⁷ com adaptações. Cerca de 2500 células/mm² foram sedimentadas em placas de 60 mm. Após 24 horas estas células foram lisadas com tampão Tris-HCl 100 mM e 0,1% Triton-X100, pH 8, adicionado de inibidores de proteases e fosfatases (10 mM Pirofosfato de sódio, 20 mM Fluoreto de sódio, 10 mM Ortovanadato de sódio, 1 mM PMSF, 10 mM β-glicerofosfato, 10 µM Leupeptina, 1 µM Pepstatina e 4 mM Benzamidina). Para a lise celular, as amostras foram congeladas em gelo seco e descongeladas em gelo por 2x e foram passadas em agulha de 29 G. As amostras foram quantificadas pelo método Bradford²⁴⁸. Em seguida, 25 µg de proteínas em um volume de 30 µL foi adicionado em quadriplicata em uma placa transparente de 384 poços. A cada poço foi adicionado 10 µL de tampão de atividade contendo 11,25 mM de DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (concentração final de 2,25 mM) e, em seguida, a placa foi mantida a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, foi adicionado a cada poço mais 10 µL de

tampão contendo 100 μM de palmitoil-CoA e 5 μM de carnitina. Como controle, foi adicionado 10 μL de tampão contendo apenas 5 μM de carnitina em quatro poços. A placa foi imediatamente lida para a absorbância de 412 nm por um leitor de placas Enspire (*Perkin Elmer*) por cerca de 1 hora. Os cálculos foram feitos a partir da inclinação da reta. DTNB é amplamente utilizado para quantificação de grupos tióis em uma amostra²⁴⁹. Os tióis reagem com o DTNB e clivam a ligação dissulfeto do composto liberando TNB^- (2-nitro-5-thiobenzoate) que, em solução aquosa alcalina ou neutra, ioniza para TNB^{2-} , o qual absorve em 412 nm. Uma vez que o lisado celular pode conter diferentes fontes de grupos tióis, a incubação por 30 min é necessária para que o sinal medido após a adição de palmitoil-CoA e carnitina seja específico da atividade de CPT1 (**Figura 6**).

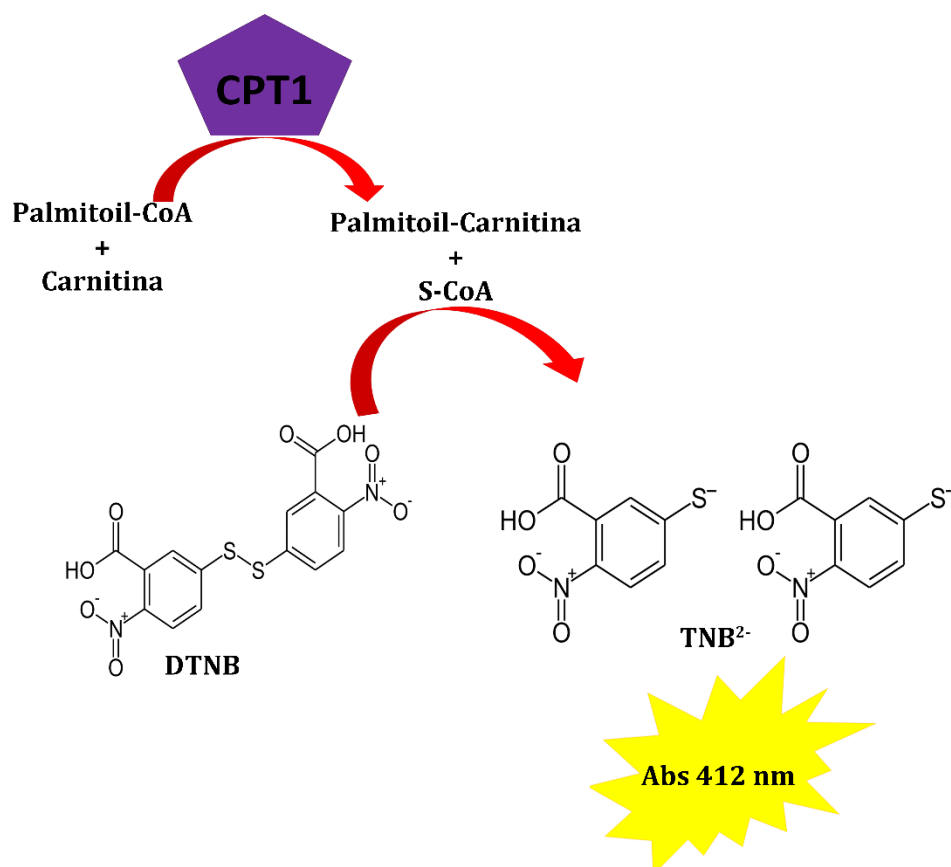


Figura 6. Esquema da reação utilizada para medir atividade de CPT1 a partir da medida da absorbância em 412 nm.

3.13. Atividade de Glutaminase

As células foram plaqueadas em uma densidade de 2500 células/ mm^2 em uma placa de 60mm. Após 24 horas, estas células foram lisadas em tampão NaCl 150 mM, HEPES 25mM, EDTA 1 mM e 0,01% Triton X100, adicionado de inibidores de proteases e fosfatases (10 mM Pirofosfato de sódio, 20 mM Fluoreto de sódio, 10 mM Ortovanadato de sódio, 1 mM PMSF,

10 mM β -glicerofosfato, 10 μ M Leupeptina, 1 μ M Pepstatina e 4 mM Benzamidina). Para a lise celular, as amostras foram passadas em agulha de 29G. Em seguida, as amostras foram quantificadas e 10 μ g de proteína foi usado por reação adicionado do mix de reação contendo Tris-acetato 50 mM, EDTA 0,2 mM, K_2HPO_4 20 mM, GDH 0,5 U, NAD^+ 2 mM, glutamina 3,5 mM. Em seguida, as amostras foram imediatamente lidas para a absorbância de 340 nm, medindo a conversão de NAD^+ em NADH, pelo leitor de placas Enspire (*Perkin Elmer*) por cerca de 30 minutos. Os cálculos foram feitos a partir da inclinação da reta.

3.14. Medida de ATP

As células foram contadas e plaqueadas na densidade de 62,5 células/mm² em quadruplicata em placa branca de 384 poços. Em seguida, utilizamos o kit *CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability* (*Promega*) para determinar a quantidade relativa de ATP em cada condição de acordo com as instruções do fabricante. O resultado foi normalizado pelo número de células determinado a partir de uma placa-espelho.

3.15. Ensaio de invasão em câmara de Boyden

Para medir o potencial invasivo das linhagens MDA-MB-231 e BT549, utilizamos placa de *transwell* (*Corning*, 3384) contendo membrana com poros de 8 μ m. A cada poço da câmara de Boyden foi adicionado 6 μ g de matriz de *Matrigel Membrane Matrix LDEV-Free* (*Corning*, 356234) em água e a placa foi deixada aberta em fluxo laminar para que a água secasse. As células foram contadas e plaqueadas com cerca de 70% de confluência em uma placa de 60 mm e, 24 horas antes do ensaio, as células foram mantidas em meio RPMI com 0,1% BSA inativado e sem a suplementação de SFB. Para o ensaio, utilizando tripsina 0,5x, as células foram soltas e 20 mil células foram plaqueadas em 50 μ L de meio RPMI 0,1% BSA inativado na câmara da placa de *transwell* contendo o Matrigel. Após 6 horas, a placa foi fixada com paraformaldeído 3,7% por 30 minutos e o Matrigel acima da câmara de boyden foi retirado com a utilização de um cotonete. Os núcleos foram corados com 10 μ g/mL DAPI adicionado de 1% Triton X-100 por duas horas. Após este período, 70 planos focais foram lidos no modo confocal do microscópio Operetta. As imagens foram analisadas utilizando projeção máxima para contagem do número de núcleos. O tratamento com 400 μ M etomoxir foi feito no momento do plaqueamento das células na câmara de Boyden.

3.16. Ensaio de migração por *Scratch*

Para medir a migração celular, as células foram plaqueadas na densidade de 1500 células/mm² (MDA-MB-231) e 1000 células/mm² (BT549) em uma placa de 96 poços tratada com 0,3 mg/mL de colágeno I em 50 µL de ácido acético 20 mmol/L. O colágeno foi extraído de cauda de rato pelo doutorando de nosso grupo Douglas Adamoski segundo protocolo já descrito²⁵⁰. Após aderidas, as células foram mantidas em meio RPMI não suplementado com SFB e adicionado de 0,1% BSA inativado. Após 24 horas, cada poço foi riscado com uma ponteira de 200 µL (**Figura 7**) e o meio foi trocado por RMPI com 25 mM HEPES, 0,1% BSA inativado e 5 ng/mL de EGF. As células foram mantidas no equipamento Operetta à 37°C e a cada duas horas a os nove campos centrais de cada poço na objetiva 10x eram lidos com overlap de 15% para acompanhar a migração celular. As análises foram feitas utilizando o software Image-J (**Figura 7**) e o pacote XLSX para o *software* R (macros e *scripts* criados pelo doutorando Douglas Adamoski).

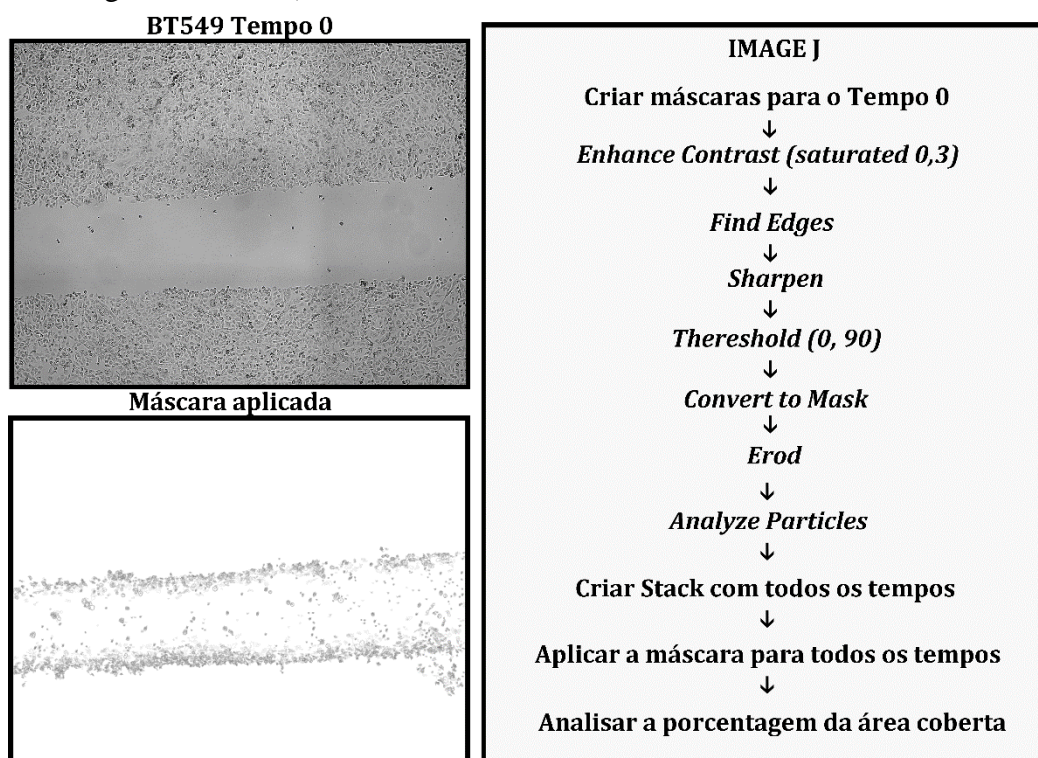


Figura 7. Máscaras e esquema de análise para identificar e identificar a área de *Scratch*.
Em itálico estão as funções usadas no ImageJ

3.17. Análise de metabólitos por GC-MS

Para traçar o perfil metabólico resultante da inibição do metabolismo de glutamina e/ou beta-oxidação, nós utilizamos a linhagem BT549 tratada com 1 µM CB-839 e/ou 200 µM etomoxir por 72 horas. Após 48h do início do tratamento, as células foram contadas e plaqueadas em uma densidade de 476,2 células/mm² em placas de 60 mm, estas mesmas células

foram plaqueadas proporcionalmente em triplicata em uma placa de 96 poços para posterior normalização por número de células. Após 24 horas, o meio foi retirado e as células foram lavadas por 2 vezes com PBS 1x. Após a retirada de todo o PBS das placas, foi adicionado 400 μL acetonitrila gelada e 250 μL água milliQ gelada contendo 1 μM norleucina. As células foram raspadas e transferidas para um tubo de 2mL. Mais 650 μL acetonitrila: água (2:1,5), sem adição de norleucina, foi novamente adicionado a placa para garantir que as células fossem todas coletadas. Em seguida, 400 μL clorofórmio gelado foi adicionado a cada tubo. As amostras foram agitadas vigorosamente, até apresentaram uma consistência leitosa, e então centrifugadas a 10.000g por 10 minutos a 4 °C. Após a separação das fases (fase superior, polar contendo os metabólitos de interesse; fase intermediária, proteínas utilizadas para quantificação das amostras; fase inferior, apolar), nós coletamos 500 μL da fase superior de cada amostra, congelamos em N₂ e, em seguida, liofilizamos até que a secagem estivesse completa. A derivatização por MTBSTFA e a corrida das amostras no equipamento Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas por tempo de voo (GC-TOF-MS, Pegasus, Leco) foram realizadas pela *facility* Laboratório de Metabolômica, CTBE/CNPEM sob comando da pesquisadora Juliana Aparecida Aricetti.

Os arquivos gerados pelo equipamento com extensão SMP foram convertidos em NetCDF pelo software ChromaTOF. As análises foram realizadas em colaboração com o doutorando Douglas Adamoski. Inicialmente, utilizamos o pacote MetaMS²⁵¹ do software R para encontrar os picos tanto da espectrometria de massas quanto da cromatografia em, em seguida, distribuir estes picos de acordo com a abundância relativa. Os tempos de retenção dos ácidos graxos metil-ésteres (FAMES), usados como padrão interno para a cromatografia gasosa, foram ajustados manualmente, utilizando o fragmento de massa 87, comum a todos, para encontrar o tempo de retenção (TR). A partir do RT e do índice de retenção (IR) da FAME, o cromatograma foi ajustado para todos os picos. A partir disso, o *Peak picking* foi refeito e as *features* foram reconhecidas utilizando o banco de dados gratuito Golm. As *features* não identificadas foram avaliadas em relação a presença entre as amostras e pela correlação entre os *pools* de células, permaneceram na análise aquelas que apareceram em pelo menos três amostras e com variação menor que 25%. Em seguida, as *features* mais abundantes nos brancos ou nas lavagens também foram removidas. Os metabólitos que permaneceram na análise foram normalizados pela Norleucina-2TMS e, em seguida, pelo número de células. Por fim, a análise de abundância diferencial entre nossos grupos foi realizada utilizando o pacote Limma^{252,253} do software R, utilizamos o valor p-ajustado de Benjamini-Hochberg.

3.18. Análises de bioinformática do RNAseq da linhagens celulares e dos tumores de pacientes obtidos do projeto *The Cancer Genome Atlas*

Para avaliar o perfil de expressão gênica de nossas linhagens de câncer de mama triplo-negativos, nós utilizamos o RNAseq dessas linhagens celulares (códigos de acesso GSE58135²⁵⁴ e GSE48213²⁵⁵) obtidos do Gene Expression Omnibus²⁵⁶ e de linhagens sequenciadas *in house* (MDA-MB-231, BT549, MDA-MB-436, MDA-MB-468). O processamento dos dados brutos das linhagens baixadas de bancos de dados e das linhagens sequenciadas *in house* foi realizado de acordo com Quintero e colaboradores (2017, manuscrito em análise, **Apêndice 3**). Separamos os dados normalizados das linhagens em dois grupos: Sensíveis e Resistentes a alterações do metabolismo de glutamina. A expressão diferencial de genes entre estes grupos foi realizada utilizando o pacote DESeq2²⁵⁷ (software R statistical). Foram considerados diferencialmente expressos os genes com um \log_2 *Fold Change* (FC) acima de + 1 (superexpressos nas linhagens sensíveis) e abaixo de -1 (menos expressos nas linhagens sensíveis) e com um valor de PPEE abaixo de 0,05. Os *heatmaps* foram construídos a partir dos genes diferencialmente expressos e as clusterizações foram feitas pelo método completo de Correlação de Pearson.

Os dados públicos de RNAseq de tumores de mama são disponíveis pelo projeto *The Cancer Genome Atlas*, utilizamos os dados de Cancer de Mama (BRCA) atualmente disponível no conjunto Legacy do GDC (*Genomic Data Commons*). Os dados de 1100 pacientes de câncer de mama foram separados de acordo com os níveis de expressão de glutaminase (*GLS*). Para isso, realizou-se um gráfico de distribuição de valores de RSEM de *GLS* sobre o qual ajustou-se um modelo de distribuição bimodal, usando o pacote *mclust* (software R statistical)²⁵⁸. Para definir os dois grupos de interesse “Alto” e “Baixo” nível de expressão de *GLS*, comparamos os níveis de incerteza em relação a expressão de *GLS* de 30% (131 pacientes com Baixo *GLS*, $\log_2(\text{RSEM}+1)$ abaixo de 9,2 e 16 pacientes classificados como Alto *GLS*, $\log_2(\text{RSEM}+1)$ acima de 12,49) (**Figura 8A**) e de 40% (530 casos com baixa expressão de *GLS*, $\log_2(\text{RSEM}+1)$ abaixo de 10,047 e 63 casos com alta expressão desta glutaminase, $\log_2(\text{RSEM}+1)$ acima de 11,59) (**Figura 8B**). As duas separações de grupos foram usadas para análise de expressão diferencial de genes, utilizando o pacote DESeq2 (software R statistical)²⁵⁷. Nós utilizamos os genes descritos na via *fatty acid metabolism* do banco de dados *Gene Ontology* (GO:0006631) e foram considerados diferencialmente expressos os genes com um $\log_2\text{FC}$ acima de +0,6 (superexpressos em pacientes com baixo nível de *GLS*) e $\log_2\text{FC}$ abaixo de -0,6 (menos expressos em pacientes com baixo nível de *GLS*) e com um valor de PPEE abaixo de 0,05. O enriquecimento de vias para os genes diferencialmente expressos foi

realizado pelo pacote *GO.db*²⁵⁹ (software R statistical), usando aproximação de Wallenius e o valor de p-ajustado. Aqui nós apresentamos as análises feitas com o nível de incerteza de 40%.

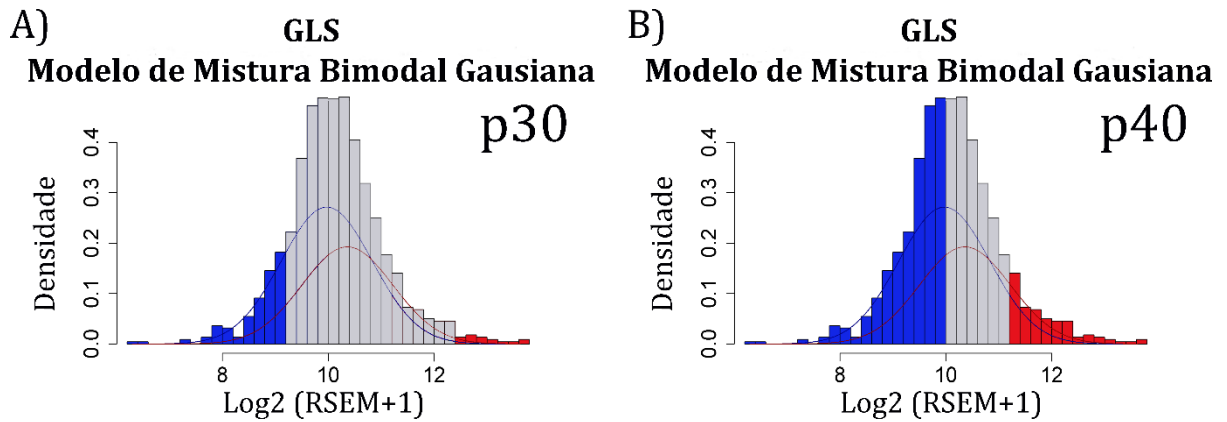


Figura 8. Distribuição dos pacientes de câncer de mama de acordo com os níveis de expressão de GLS

Os dados de RNAseq dos pacientes de câncer de mama foram distribuídos de acordo com a expressão de GLS, formando os grupos baixo GLS (azul) e alto GLS (vermelho). Utilizamos um nível de incerteza de 30% (A) e de 40% (B). Os pacientes que apresentaram um nível de incerteza maior do que a estabelecida (cinza) foram retirados das análises.

A partir da divisão dos pacientes em alto e baixo nível de expressão de GLS, foi possível avaliar o impacto da expressão de *CPT1A* na sobrevida dos pacientes utilizando os pacotes *survival* e *survminer* (software R statistical). A divisão dos pacientes em níveis de expressão de *CPT1A* foi realizada utilizando a mesma metodologia empregada para *GLS*.

4.1. Dependência de glutamina e glutaminase em linhagens de câncer de mama triplo-negativo

Dados da literatura sugerem que linhagens celulares de câncer de mama TN apresentam variação em relação à dependência de glutamina¹²⁶ e sensibilidade à inibição de glutaminase¹¹². Com o intuito de validar estes dados, nós avaliamos a sensibilidade de 12 linhagens TN ao tratamento com 1 μ M de CB-839 comparado com o tratamento apenas com o veículo (DMSO) (**Figura 9A**). Em paralelo, avaliamos a dependência de glutamina nestas linhagens comparando o impacto no crescimento (ou morte) da ausência deste nutriente em relação ao crescimento em meio completo (**Figura 9B**). Verificamos que o tratamento com 1 μ M de CB-839 foi eficiente em provocar morte celular em cinco linhagens (HCC1806, HCC1143, HCC38, MDA-MB-436 e MDA-MB-231) e inibir proliferação celular na Hs578T, enquanto que as demais linhagens (HCC1937, HCC70, BT549, MDA-MB-157, MDA-MB-453, MDA-MB-468) mostraram redução na proliferação em menos de 50% em relação ao controle (**Figura 9A**). A retirada de glutamina do meio foi capaz de induzir morte em seis linhagens (HCC1806, HCC1143, HCC38, MDA-MB-436, MDA-MB-231 e HCC70), enquanto que as demais apresentaram redução na proliferação (**Figura 9B**). Das linhagens que mostraram baixa sensibilidade ao tratamento com o inibidor CB-839, apenas a HCC70 foi induzida à morte com a retirada de glutamina.

Sendo assim, as seis linhagens que apresentaram morte celular ou proliferaram menos que 50% em relação ao controle com o tratamento com CB-839 foram chamadas de **sensíveis a CB-839** (HCC1806, HCC1143, HCC38, MDA-MB-436, MDA-MB-231 e Hs578T), enquanto que as seis restantes foram chamadas de **resistentes a CB-839** (HCC1937, HCC70, BT549, MDA-MB-157, MDA-MB-453, MDA-MB-468).

Quando os dados de proliferação em relação à dependência de glutamina foram comparados com os dados de sensibilidade ao tratamento com CB-839, encontramos uma correlação de Pearson de 0,8951 ($p < 0,0001$) (**Figura 9C**), indicando que a dependência de glutamina nestas células está relacionada principalmente ao processamento deste nutriente pela enzima glutaminase. De acordo, as células sensíveis, como um todo, apresentaram uma maior expressão de GLS, como avaliado por *western blot* (**Figura 9D**) e, especificamente, da isoforma GAC, medido por imunofluorescência (**Apêndice 1. Figura 1**). Além disso, as linhagens sensíveis apresentaram uma tendência de maior atividade de glutaminase (**Figura 9E**), maior

secreção de glutamato (**Figura 9F**) e maior consumo de glutamina de meio de cultura (**Figura 9G**).

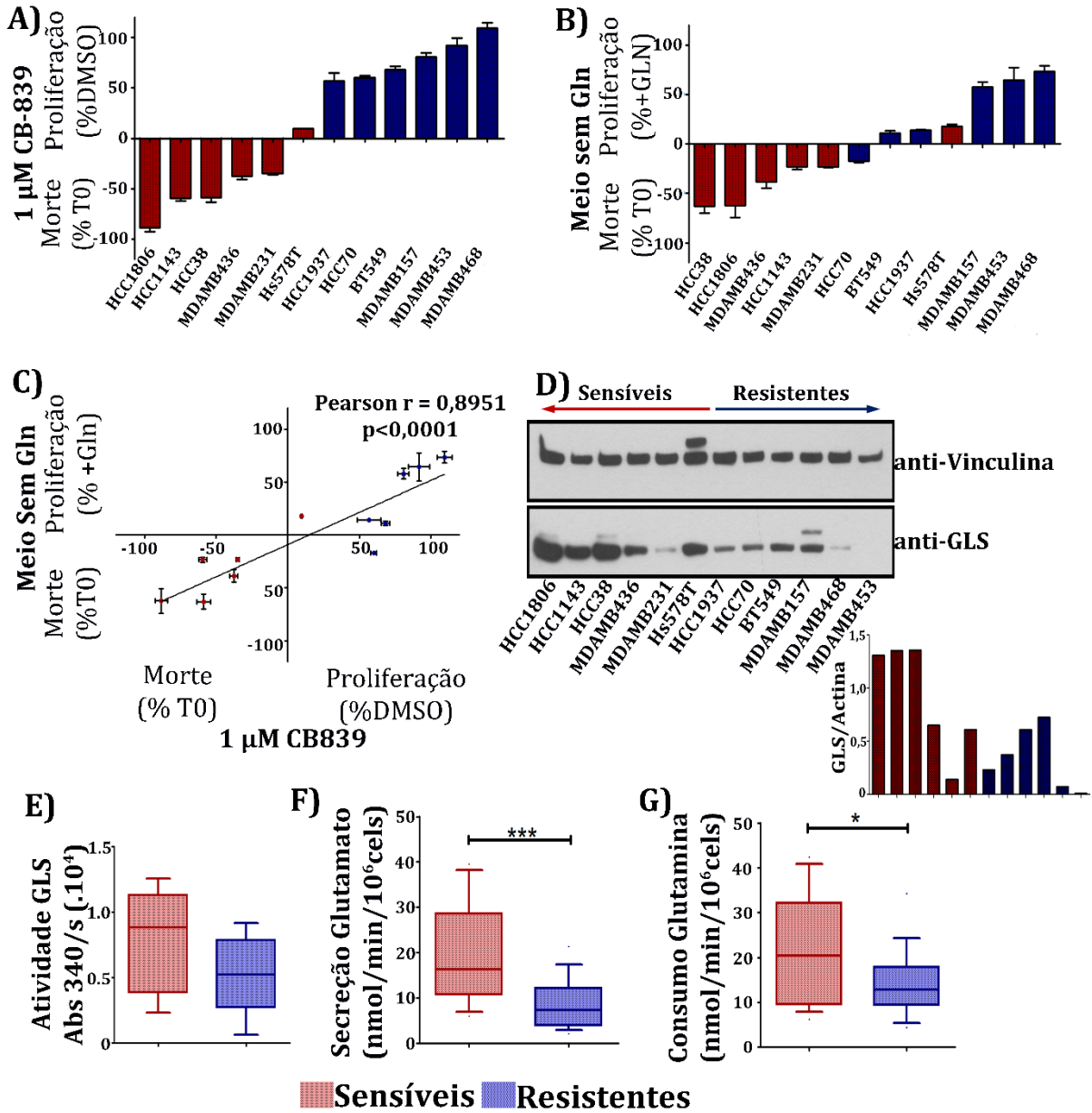


Figura 9. Avaliação de linhagens de câncer de mama TN em relação ao metabolismo de glutamina.

A proliferação ou morte das 12 linhagens utilizadas neste estudo foi avaliada na presença de 1μM de CB-836 (A) ou na ausência de glutamina (B). (C) Correlação entre proliferação ou morte das linhagens tratadas com 1μM de CB-836 e na ausência de glutamina. (D) Medida dos níveis proteicos de glutaminase GLS por *Western Blot* (D) e de sua atividade (E). Medida de secreção de glutamato (F) e consumo de glutamina (G) do meio destas células. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Para confirmar a divisão das células entre sensíveis e resistentes à inibição de glutaminase, avaliamos o comportamento de sete linhagens (três linhagens sensíveis e quatro linhagens resistentes) quando submetidas ao tratamento de BPTES, outro inibidor de GLS. Verificamos que enquanto o IC50 obtido foi 3,84 μM , 5,73 μM e 15,8 μM para as sensíveis MDA-MB-231, MDA-MB-436 e Hs578T, respectivamente (**Figura 10A-C**), ele foi 35,2 μM , 36,13 μM , 40,7 μM e 73,3 μM para as resistentes MDA-MB-157, BT549, MDA-MB-468 e MDA-MB-453, respectivamente (**Figura 10D-G**). Com estes resultados, nós confirmamos o agrupamento das linhagens em dois grupos (sensíveis e resistentes).

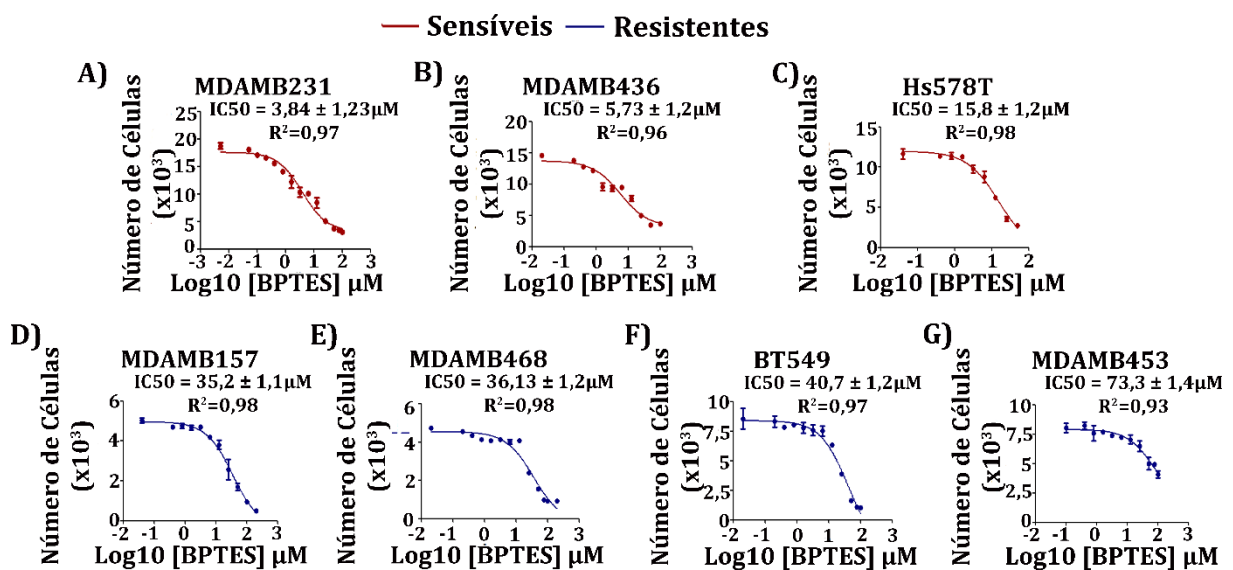


Figura 10. Medida do IC50 de linhagens TN ao inibidor de glutamina BPTES

Avaliamos o IC50 das linhagens sensíveis (A) MDA-MB-231, (B) MDA-MB-436, (C) Hs578T, e das linhagens resistentes (D) MDA-MB-157, (E) MDA-MB-468, (F) BT549 e (G) MDA-MB-453.

4.2. Células sensíveis dependem do metabolismo de glutamina para a atividade mitocondrial

As mitocôndrias são organelas dinâmicas e são responsáveis pela produção de energia na forma de ATP, além de estarem envolvidas em processos biossintéticos²⁶⁰, geração e controle de espécies reativas de oxigênio (ROS)^{261,262}, processo de morte celular programada^{263–265} e sinalização celular por cálcio²⁶⁶. A morfologia destas organelas é ditada a partir do balanço entre os processos de fusão e fissão mitocondrial e está intimamente ligada a saúde e função predominante destas organelas nas células^{267–273}. O processo de fusão é predominante em células com alta atividade respiratória, sendo importante para a formação de redes mitocondriais interconectadas que formam estruturas tubulares que beneficiam a geração de energia devido, principalmente, a comunicação das organelas ao redor da célula^{267,274}.

A fissão, por outro lado, é importante para divisão das mitocôndrias, possibilitando a multiplicação destas organelas durante a divisão celular, uma vez que estas organelas não podem ser sintetizadas *de novo*²⁷⁵. Além disso, a fissão mitocondrial é o processo mais ativo em situações de alto estresse energético, formando estruturas granulares e servindo como um mecanismo de controle de qualidade e manutenção da capacidade bioenergética das mitocôndrias, sendo responsável pela liberação de citocromo c e de outras proteínas do espaço intermembranas durante a apoptose, além de possibilitar a eliminação de organelas danificadas da rede mitocondrial por mitofagia^{268,271}.

A partir da divisão das linhagens TN entre sensíveis e resistentes, nós avaliamos o impacto do tratamento de CB-839 nos dois grupos em relação ao estado morfológico e funcional das mitocôndrias. Para isso, nós incubamos as células com o marcador fluorescente *Mitotracker Deep Red* e medimos um parâmetro de textura chamado de *SER Valley*^{276,277}. Quanto maior for o índice de textura observado, mais tubular é a morfologia das mitocôndrias. Dessa maneira, uma diminuição do índice de textura significa um aumento da granulosidade das mitocôndrias, sugerindo defeitos que levam à mitofagia.

A partir dos nossos resultados, nós verificamos uma queda no índice de textura (ou aumento de granulosidade mitocondrial) entre as linhagens sensíveis em cerca de 30% ($p=0,0058$) (**Figura 11A**), enquanto que em células resistentes este valor é reduzido em 10% e não é alterado de maneira significativa ($p=0,0665$) (**Figura 11B**). Estes resultados sugerem que o impacto do inibidor CB-839 é mais pronunciado na morfologia e funcionalidade das mitocôndrias das linhagens sensíveis do que nas linhagens resistentes.

Dado a alteração observada na morfologia mitocondrial, avaliamos o conteúdo de ATP das células sensíveis e resistentes em função do tratamento com CB-839. Nós verificamos que linhagens sensíveis apresentaram uma queda de 45% nos níveis de ATP quando tratadas com CB-839, enquanto que as linhagens resistentes apresentaram uma queda de 26%, demonstrando que o metabolismo de glutamina é mais importante para manutenção dos níveis de ATP nas linhagens sensíveis do que nas linhagens resistentes (**Figura 11C**).

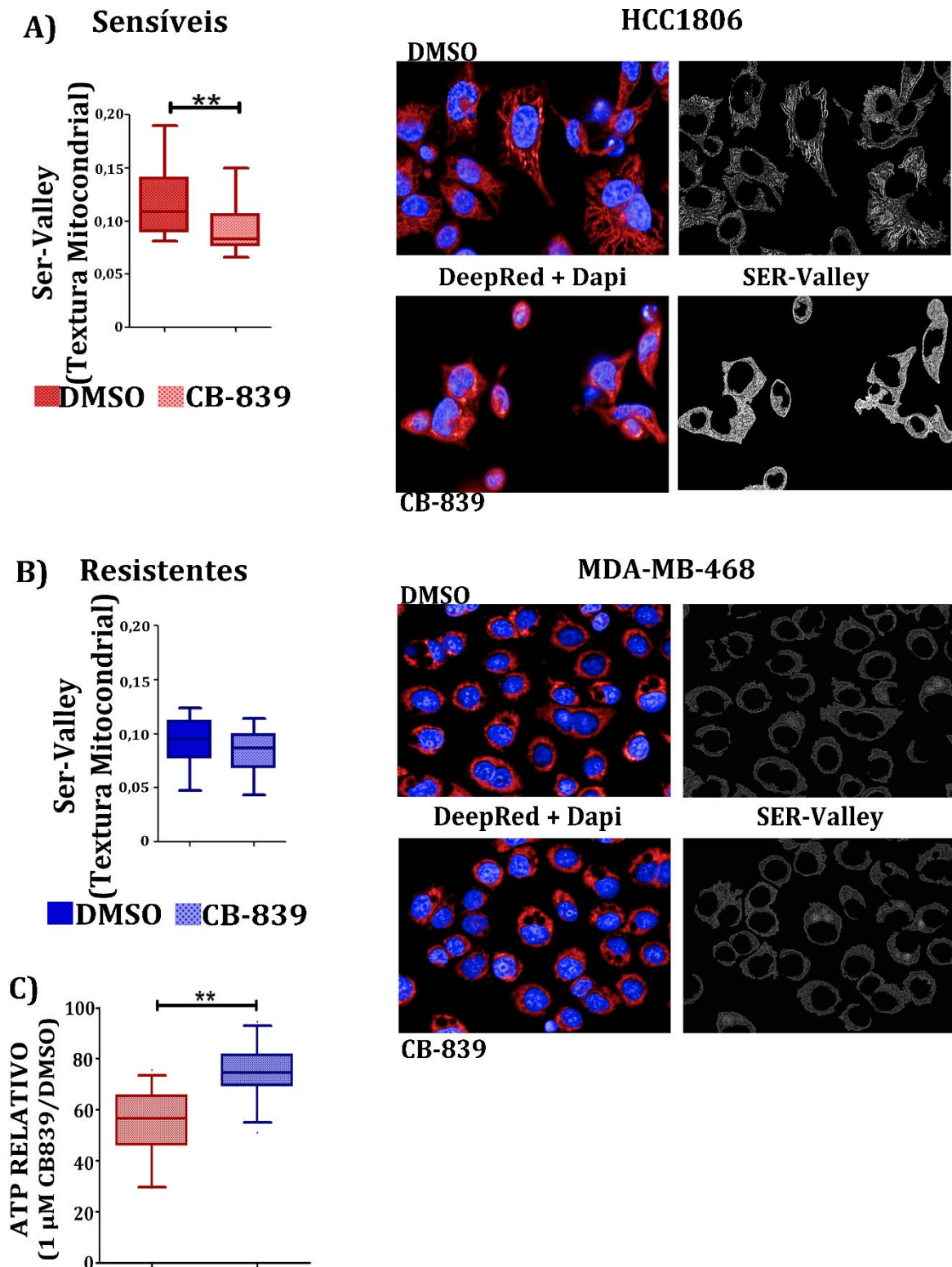


Figura 11. Relação entre sensibilidade a inibição de glutaminase e a função mitocondrial.

Células sensíveis a inibição de glutaminase (A) diferente de células resistentes (B) apresentam diminuição de estrutura tubular (e ganho de granulosidade) quando tratadas com CB-839 (comparado a tratamento com veículo, DMSO), como avaliado por uma função de textura chamada SER Valley (imagem à direita) aplicada sobre imagens de fluorescência celular (com o fluoróforo Mitotracker Deep Red, imagem à esquerda) (C) Células sensíveis a inibição de glutaminase tem maior diminuição no conteúdo de ATP quando tratadas com 1 μ M CB-839 do que células resistentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.3. Transcriptoma mostra que células TN resistentes a inibição de glutaminase e tumores de mama de pacientes com menor expressão de glutaminase tem vias de metabolismo de lipídeos alteradas

Com o intuito de identificar diferenças no perfil de expressão gênica que pudessem indicar as vias metabólicas responsáveis pela resistência à inibição de glutaminase, assim como metabolismo alternativo ao uso de glutamina em células com baixa expressão de glutaminase, utilizamos dados públicos de RNAseq de linhagens e tumores para nossas análises.

As linhagens TN identificadas em nossos estudos como sensíveis ao tratamento com CB-839 (HCC1806, HCC1143, HCC38, MDA-MB-436, MDA-MB-231, Hs578T) foram agrupadas como réplicas, assim como aquelas identificadas como resistentes (HCC1937, HCC70, BT549, MDA-MB-157, MDA-MB-453, MDA-MB-468) e a expressão gênica diferencial foi definida entre estes dois grupos. Nossas análises mostraram que, dado o critério $\log_2 FC \geq +1$ para superexpressão e $\log_2 FC \leq -1$ para subexpressão ($P_{FDR} < 0,05$), 179 genes estão mais expressos e 243 genes estão menos expressos nas linhagens sensíveis em relação às resistentes (**Figura 12A**). Essa expressão diferencial de genes foi capaz de separar os dois grupos por uma Análise de Componente Principal (PCA) não supervisionado (**Figura 12B**), assim como houve clusterização não supervisionada das amostras em análise de *heatmap* (**Figura 12C**).

Com a intenção de explorar esses dados, nós realizamos um enriquecimento de vias a partir daquelas reconhecidas pelo *Gene Ontology* (GO) e, analisando as vias com $pvalue < 0,01$, nós encontramos que metabolismo de lipídios está alterado entre os dois grupos (*cellular lipid metabolic process*, $pvalue = 0,0045$ e *lipid metabolic process*, $pvalue = 0,0062$) (**Figura 12D**). Além disso, avaliando as vias com $pvalue < 0,05$, nós encontramos mais 13 relacionadas ao metabolismo de lipídios (**Apêndice 2. Tabela 1**). Segundo a base de dados do GO, dos 422 genes diferencialmente expressos entre linhagens sensíveis e resistentes, 64 estão relacionados ao metabolismo de lipídios, sendo que 70% (45 genes) estão aumentados nas células resistentes (**Apêndice 2. Tabela 2**), sugerindo que estas linhagens apresentam o metabolismo de lipídios mais ativo.

Além do metabolismo de lipídios, nós também encontramos vias metabólicas enriquecidas relacionadas a poliaminas (*polyamine biosynthetic process*, $pvalue=0,0008$; *amine biosynthetic process*, $pvalue = 0,005$ e *putrescine metabolic process*, $pvalue= 0,006$). Segundo a base de dados do GO, dos 21 genes pertencentes a estes processos, quatro genes

estão diferencialmente expressos entre os dois grupos (19%), sendo que três estão aumentados nas linhagens resistentes (Apêndice 2. Tabela 3).

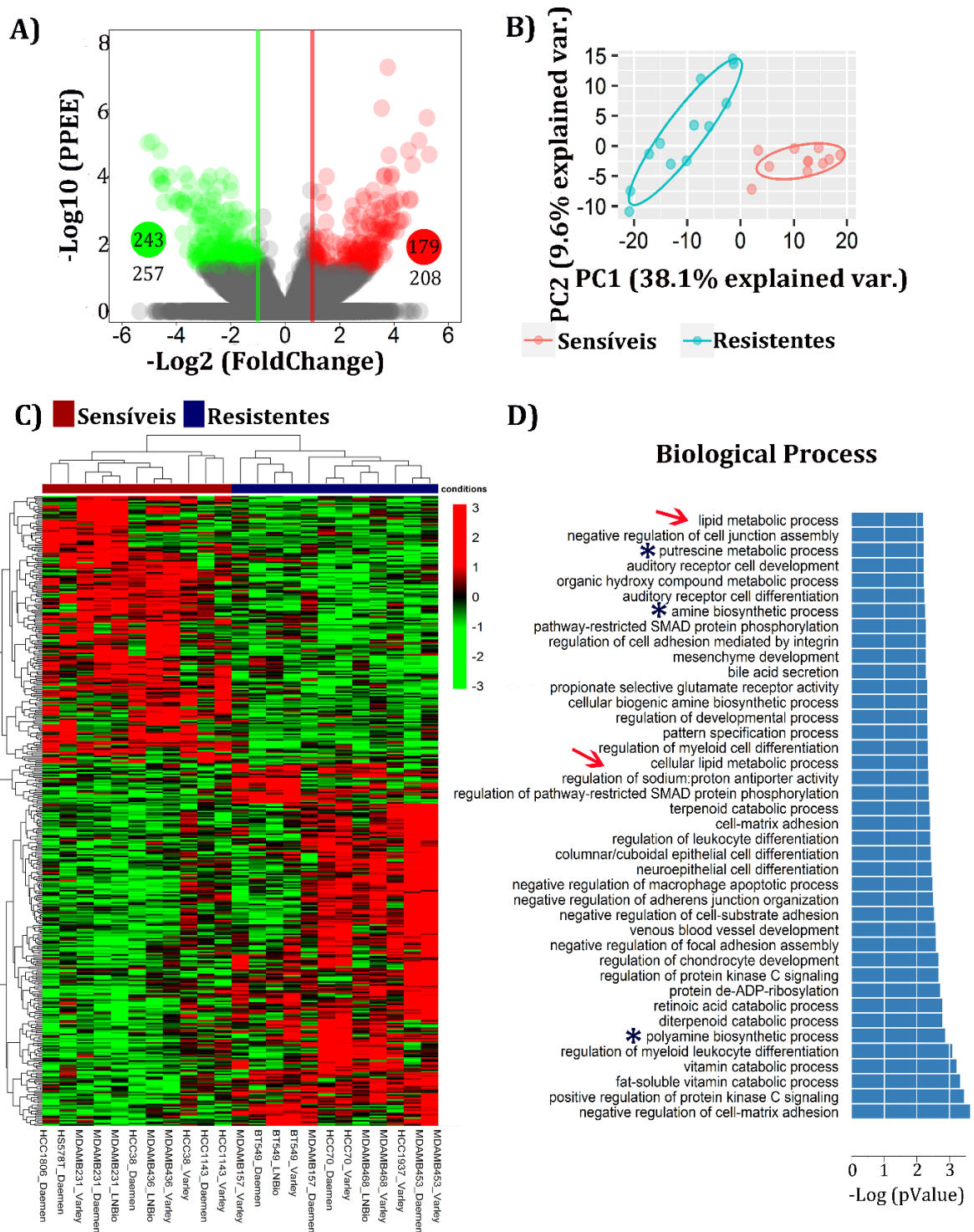


Figura 12. Análises de bioinformática das linhagens de câncer de mama triplo-negativas.

(A) Volcano Plot mostrando a distribuição de genes em relação ao $\text{Log}_2 \text{Fold Change}$ e ao valor de $-\text{Log}_{10} \text{PPEE}$. Os números fora dos círculos são os que atendem os critérios de FC, mas não possuem $\text{PPEE} < 0,05$, os números nos círculos é o total de genes que apresentam expressão diminuída no grupo das sensíveis em relação às linhagens resistentes (círculo verde) ou expressão aumentada (círculo vermelho); (B) Análise de PCA; (C) *Heatmap* para os genes analisados mostrando separação dos dois grupos sensíveis e resistentes; (D) Enriquecimento de vias com os genes diferencialmente expressos entre os grupos sensíveis e resistentes, seta vermelha apontando as vias relacionadas ao metabolismo de lipídios e * azul apontando as vias relacionados ao metabolismo de poliaminas.

A partir dessas análises, nós decidimos focar no metabolismo de lipídios. Para verificar se alterações nesta via podem estar relacionadas com a dependência do metabolismo de glutamina e expressão de glutaminase, nós avaliamos a expressão de genes da categoria “*Fatty acid metabolic process*” disponível pelo GO (GO:0006631) em pacientes de câncer de mama divididos em alta e baixa expressão de *GLS*. Nossas análises mostraram que os 336 genes pertencentes nesta categoria foram capazes de agrupar os tumores com alta e com baixa expressão de *GLS* a partir de um clusterização não supervisionada em um *heatmap* (**Figura 13A**). Estes genes também conseguiram separar os grupos por uma PCA (**Figura 13B**). Considerando um $\log_2FC > 0,6$ para superexpressão e um $\log_2FC < 0,6$ para genes menos expressos, 43 genes foram avaliados como mais expressos em tumores com menor expressão de *GLS* e 91 genes foram avaliados como menos expressos neste grupo (**Figura 13C**).

Entre os genes com expressão alterada entre os grupos, nós encontramos que 33 genes estavam relacionados à beta-oxidação mitocondrial (**Figura 13A, Apêndice 2. Tabela 4**), sendo que 14 genes (42%) foram encontrados aumentados em tumores de pacientes com menor expressão de *GLS* ($\log_2FC > 0,6$ e $P < 0,05$). Nenhum gene relacionado à beta-oxidação foi encontrado significativamente aumentado nos tumores com alta expressão de *GLS*.

De maneira interessante, genes relacionados a todas as etapas da beta-oxidação (**Figura 14A**) foram encontrados com expressão aumentada em tumores baixo *GLS*. Os genes relacionados ao transporte de ácidos graxos (*Albumin, ALB; Solute Carrier Family 27 Member 1, SLC27A1; Fatty Acid Binding Protein 4, FABP4* e *CD36 Molecule, CD36*) (**Figura 14B**), lipases, responsáveis pela liberação de ácidos graxos acumulados em gotas lipídicas (*Monoglyceride Lipase, MGLL; Patatin Like Phospholipase Domain Containing 2, PNPLA2* e *Patatin Like Phospholipase Domain Containing 4, PNPLA4*) (**Figura 14C**) e ativação dos ácidos graxos em acil-CoA (*Acyl-CoA Synthetase Family Member 2, ACSF2*) (**Figura 14D**) estão com expressão aumentada nos tumores baixo *GLS*.

A ativação dos ácidos graxos ocorre pela ação de enzimas da família ACS pela adição de um grupo CoA, formando longas cadeias de acil-CoA. Dependendo do tipo de cadeia do ácido graxo em questão, determinada classe de enzima acil-CoA sintetase é responsável por sua ativação e, assim, determina qual o destino deste ácido graxo no metabolismo celular (**Apêndice 3, Tabela 5**).

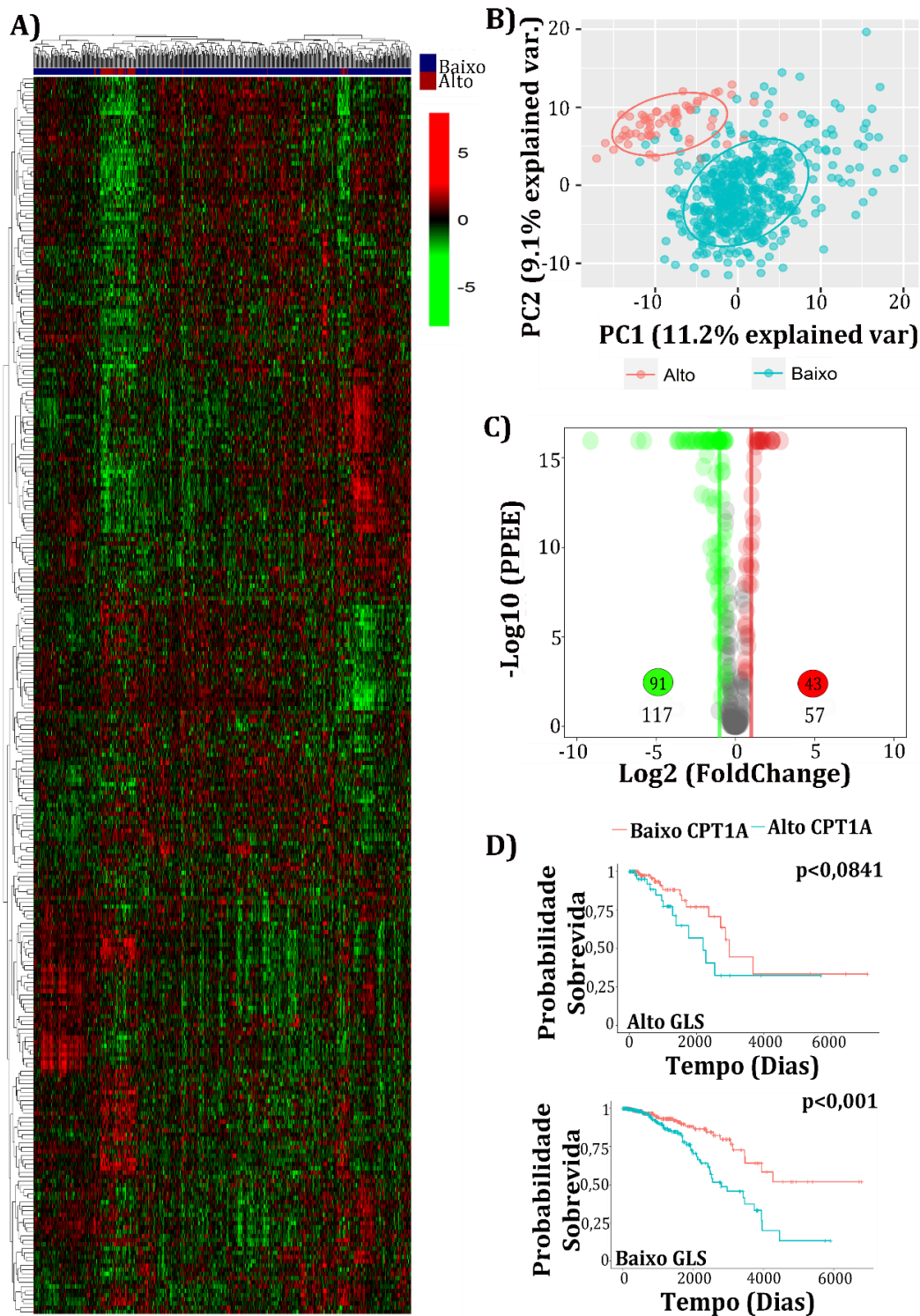


Figura 13. Análise da expressão de genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos em pacientes de câncer de mama.

(A) *Heatmap* para os genes referentes a via GO:0006631 mostrando separação dos dois grupos alta e baixa expressão de GLS; (B) Análise de PCA; (C) Volcano Plot mostrando a distribuição de genes em relação ao Log_2FC e ao valor de $-\text{Log}_{10} \text{PPEE}$. Os números fora dos círculos são os que atendem os critérios de FC, mas não possuem $\text{PPEE} < 0,05$, os números nos círculos é o total de genes que apresentam expressão diminuída no grupo das dependentes em relação às menos dependentes (círculo verde) ou expressão aumentada (círculo vermelho); (D) Kaplan Meier de pacientes com tumores com maior e menor expressão de *GLS*, subdivididos quanto ao nível de expressão de *CPT1A*.

Em adição, os genes relacionados com o transporte pela membrana interna das mitocôndrias (*Carnitine Palmitoyltransferase 1A*, *CPT1A* e *Carnitine Palmitoyltransferase 1B*, *CPT1B*) (**Figura 14E**) e genes relacionados à oxidação dos acil-CoA em acetil-CoA (*Acyl-CoA Dehydrogenase, C-2 To C-3 Short Chain*, *ACADS*; *Acyl-CoA Dehydrogenase, Short/Branched Chain*, *ACADSB*, e *Enoyl-CoA Hydratase, Short Chain 1*, *ECHS1*) (**Figura 14F**) também estão aumentados nos tumores baixo *GLS*.

Por fim, cadeias ímpares de acil-CoA geram uma molécula de propionil-CoA que é usado como fonte anaplerótica por seu papel na reposição de succinil-CoA. Tumores com baixo *GLS* apresentam uma superexpressão de *Propionyl-CoA Carboxylase Alpha Subunit* (*PCCA*), gene relacionado ao metabolismo de propionil-CoA em succinil-CoA nas mitocôndrias (**Figura 14G**).

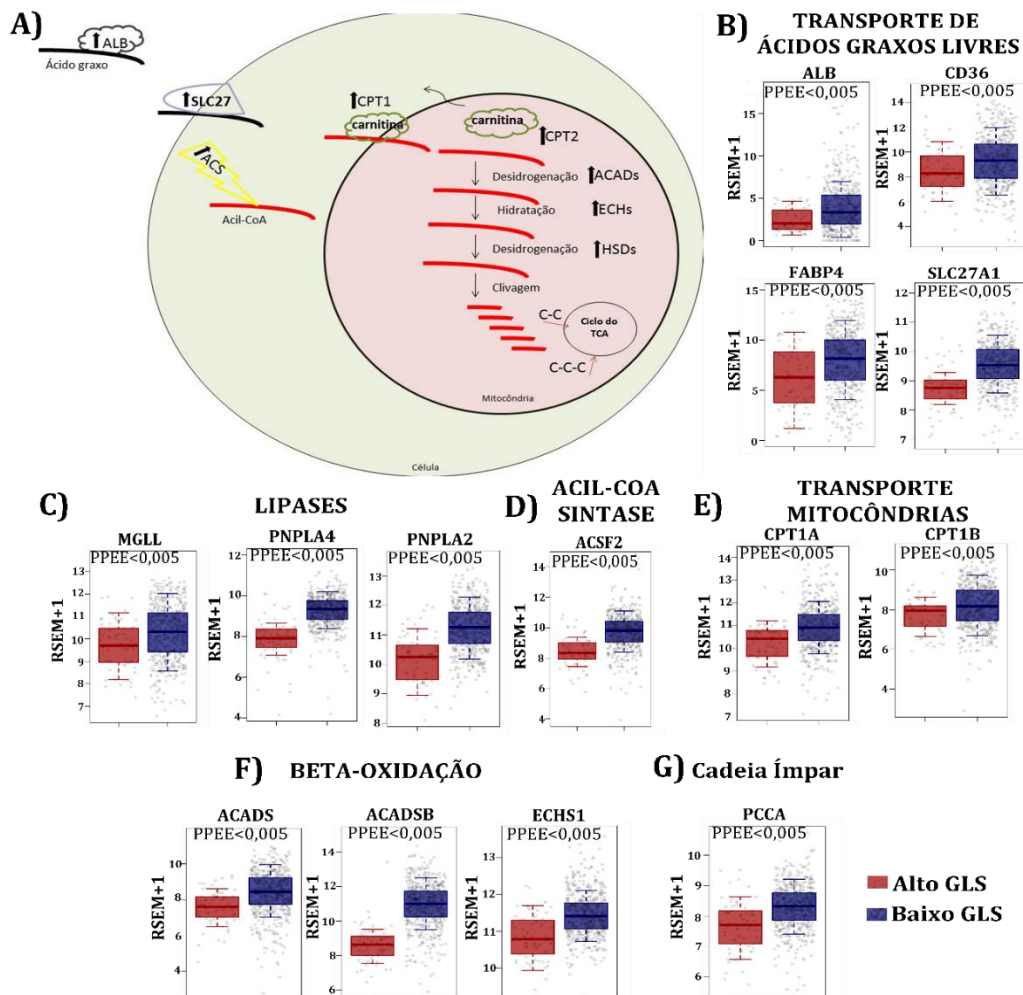


Figura 14. Genes diferencialmente expressos em tumores de mama divididos entre alta e baixa expressão de *GLS*.

(A) Esquema representativo de todas as etapas da beta-oxidação. Genes relacionados a todas essas etapas foram encontrados aumentados em tumores de pacientes com baixa expressão de *GLS* em relação a alta expressão desse gene (B) Transporte de ácidos graxos livres, (C) lipases, (D) acil-coa sintetase, (E) transporte de cadeias acil-CoA para a matriz mitocondrial, (F) Etapas da beta-oxidação e (G) metabolismo de ácidos graxos de cadeia ímpar.

Nós observamos também que genes relacionados a biossíntese de triacilgliceróis foram avaliados como menos expressos em tumores de pacientes com menor expressão de *GLS* (**Figura 14** e **Apêndice 2. Tabela 4**), corroborando a hipótese de que nestes tumores as vias de degradação de lipídeos podem estar acionadas em detrimento as de biossíntese e acúmulo deste nutriente.

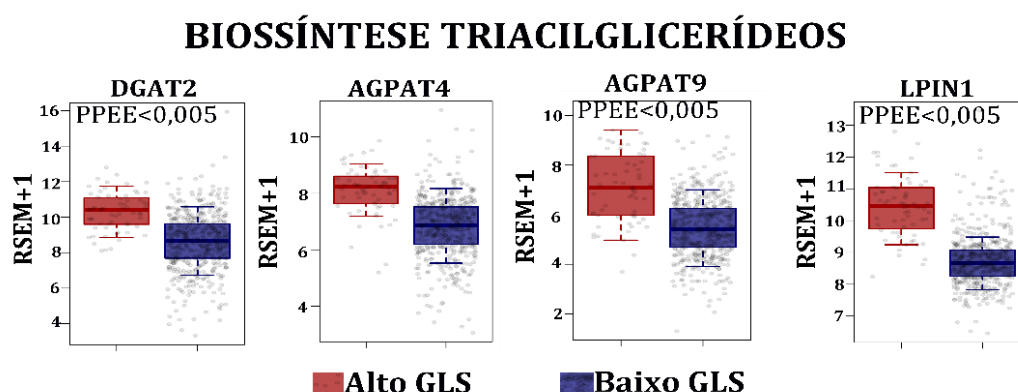


Figura 15. Expressão de genes relacionados à biossíntese de triacilgliceróis estão diminuídos em tumores de pacientes com menor expressão de *GLS* em relação aos tumores com maior expressão desse gene.

Por fim, avaliamos o impacto de maior expressão de *CPT1A* na sobrevida de pacientes com menor e maior nível de expressão de *GLS* (**Figura 12D**). Verificamos que pacientes com tumores de mama apresentam menor expressão de *GLS* e maior expressão de *CPT1A*, possuem pior prognóstico em relação a pacientes do mesmo grupo (menor expressão de *GLS*) e com menor expressão de *CPT1A* ($p < 0,001$). Esta observação indica que potencial acionamento de beta-oxidação nos tumores com menor expressão de *GLS* leva a um pior prognóstico.

4.4. Avaliação da beta-oxidação na plasticidade metabólica em linhagens de mama TN

Para avaliar se a beta-oxidação está aumentada nas linhagens resistentes à inibição de glutaminase, utilizamos anticorpos específicos para *CPT1A* e *CPT2*, proteínas limitantes para a beta-oxidação por seu papel no transporte das moléculas de acil-CoA via acoplamento à carnitina. Medimos os níveis destas duas proteínas por *Western Blot* (**Figura 16A**) e por imunofluorescência (**Figura 16B, C**) nas 12 linhagens de câncer de mama TN utilizadas neste estudo. Os dados mostraram que não existe diferença nos níveis de *CPT1A* entre os dois grupos avaliados, sensíveis e resistentes ($p = 0,7058$) (**Figura 16A**). Já em relação aos níveis de *CPT2*, vimos que as linhagens avaliadas como resistentes a CB-839 tem maiores níveis desta proteína em relação as linhagens sensíveis ($p = 0,0422$) (**Figura 16B**). Em adição a esta observação,

encontramos uma correlação negativa (Pearson = -0,5950, $p = 0,0535$) entre os níveis proteicos de GAC e de CPT2 nestas linhagens (Figura 16C).

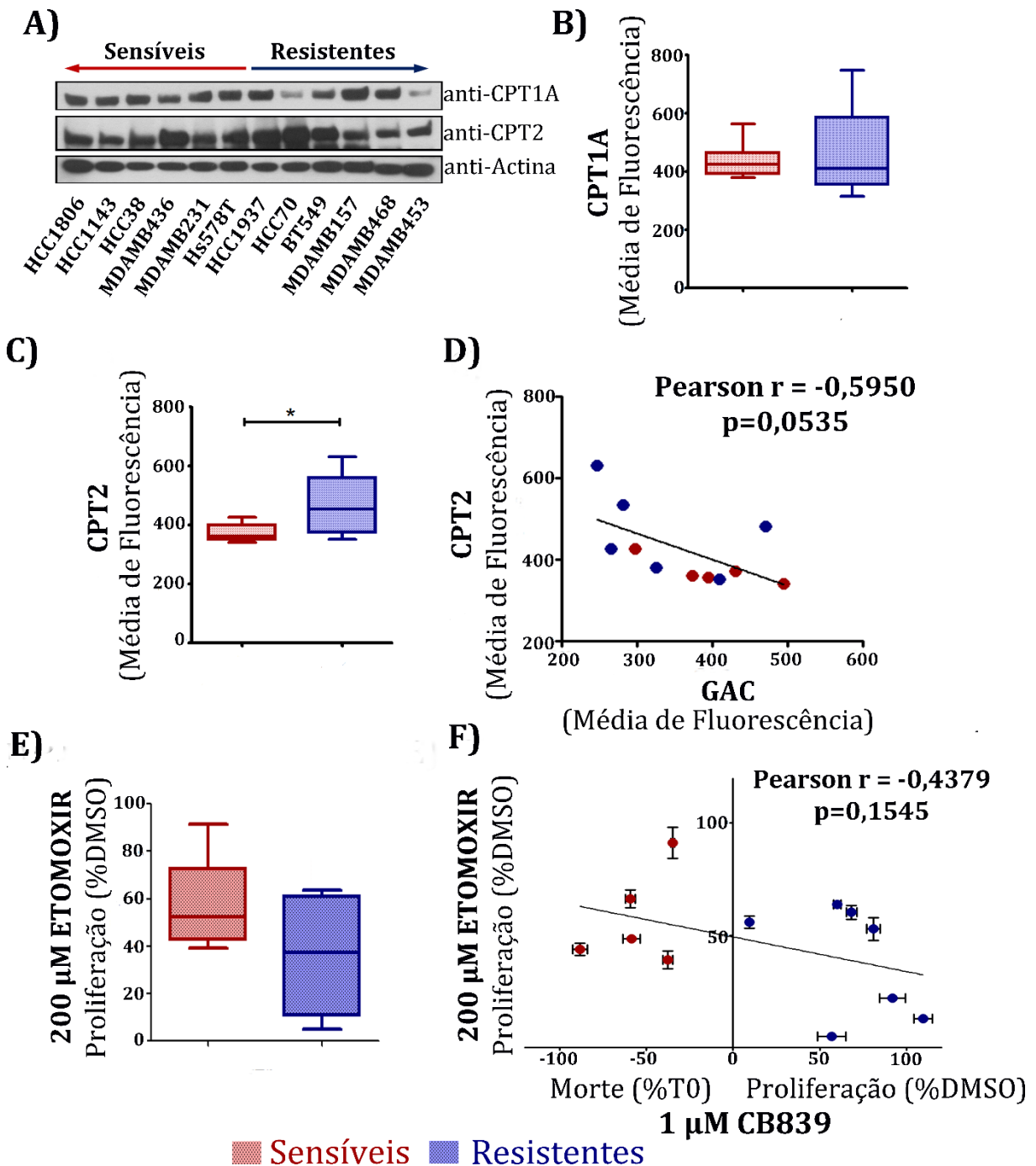


Figura 16. Avaliação da expressão de proteínas limitantes para a beta-oxidação e o efeito da inibição desta via na proliferação de linhagens TN.

(A) Western Blot para proteínas do metabolismo de ácidos graxos (B) Imunofluorescência foi usada para medir a expressão das proteínas limitantes para a beta-oxidação CPT1A e (C) CPT2. (D) A expressão de CPT2 apresenta uma fraca correlação negativa com a expressão de GAC em linhagens TN (E). Linhagens sensíveis à inibição de CB-839 são mais resistentes à inibição de beta-oxidação por etomoxir; (F) tendência de correlação negativa entre a redução de proliferação e morte das células tratadas com CB-839 em relação às células tratadas com etomoxir. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Avaliamos também o efeito de etomoxir, um inibidor específico de CPT1 (das três isoenzimas: CPT1A, CPT1B e CPT1C) sobre a proliferação celular. Observamos que linhagens resistentes ao CB-839 apresentam maior sensibilidade ao uso de etomoxir, embora este resultado não seja significativo ($p=0,0709$) (**Figura 16D**, **Apêndice 1. Figura 2**) e encontramos uma fraca correlação negativa (Pearson=-0,4379, $p=0,1545$) entre a sensibilidade à inibição por CB-839 e por etomoxir, mas que sugere que a utilização de glutamina e ácidos graxos são mutualmente exclusivas para os dois grupos avaliados. Com estes resultados, concluímos que linhagens que são resistentes ao composto CB-839 apresentam um aumento nos níveis proteicos de CPT2 (em adição aos nossos resultados de tumores de pacientes de câncer de mama que mostram que baixo *GLS* apresenta um aumento de expressão dos genes CPT1A e CPT1B), sugerindo que alta expressão de genes e proteínas relacionados à beta-oxidação podem ser usados como marcadores para resistência à inibição de glutaminase nestes tumores.

Após classificar as linhagens por sua dependência de glutamina (e sensibilidade à inibição de glutaminase) e avaliar os níveis de proteínas relacionadas à beta-oxidação, nós decidimos verificar se a beta-oxidação pode ser uma possível via de adaptação metabólica quando o metabolismo de glutamina é alterado. Para isso, utilizamos o inibidor CB-839 (**Figura 17**) ou o *knockdown* de *GLS* (**Figura 18**).

Inicialmente, nós quantificamos o acúmulo de ácidos graxos dentro das células após atenuação de *GLS* através do uso da sonda fluorescente Red C12. Red C12 é um análogo de ácido graxo saturado que contém uma cauda de 12 carbonos e o fluoróforo BODIPY 558/568 covalentemente ligado a cauda hidrofóbica, em um tamanho total equivalente a um ácido graxo de 18 carbonos. Recentemente, foi publicado que a intensidade de fluorescência da sonda dentro das células se relaciona com a utilização dos ácidos graxos como fonte de energia²⁴⁵. Dessa maneira, os autores mostram que quanto menor a taxa de beta-oxidação, maior a intensidade de sinal da sonda captada no citoplasma. Como controle, utilizamos etomoxir. De fato, verificamos que, utilizando 50 μM etomoxir por 3 horas (após a retirada da sonda), há um aumento de intensidade de marcação em todas as células, confirmando que a intensidade de fluorescência pode ser diretamente relacionada à quantidade de ácido graxo acumulado dentro das células (ou seja, não metabolizado pela beta-oxidação) (**Figura 17A-C**).

Nós observamos que as linhagens resistentes HCC1937 (**Figura 17A**) e BT549 (**Figura 17B**), quando tratadas com 1 μM CB-839 por 72 horas, apresentam redução na intensidade da sonda em relação ao controle, sugerindo que estas células nesta condição utilizam mais ácidos graxos. Nós também observamos que nas células sensíveis ao inibidor CB-839 (HCC1806, HCC1143, HCC38, MDA-MB-436, MDA-MB-231 e Hs578T) o *knockdown*

de *GLS* não afetou o consumo da sonda Red C12 ou levou ao aumento da intensidade da mesma (indicando diminuição de beta-oxidação). Por outro lado, entre as resistentes (HCC1937, HCC70, BT549, MD-MB-157, MDA-MB-453 e MDA-MB468), quatro delas apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) na beta-oxidação com o *knockdown* de *GLS*. Em todos os casos, o tratamento com etomoxir também levou a um aumento da intensidade da sonda, indicando diminuição da beta-oxidação (Apêndice 1. Figura 3A).

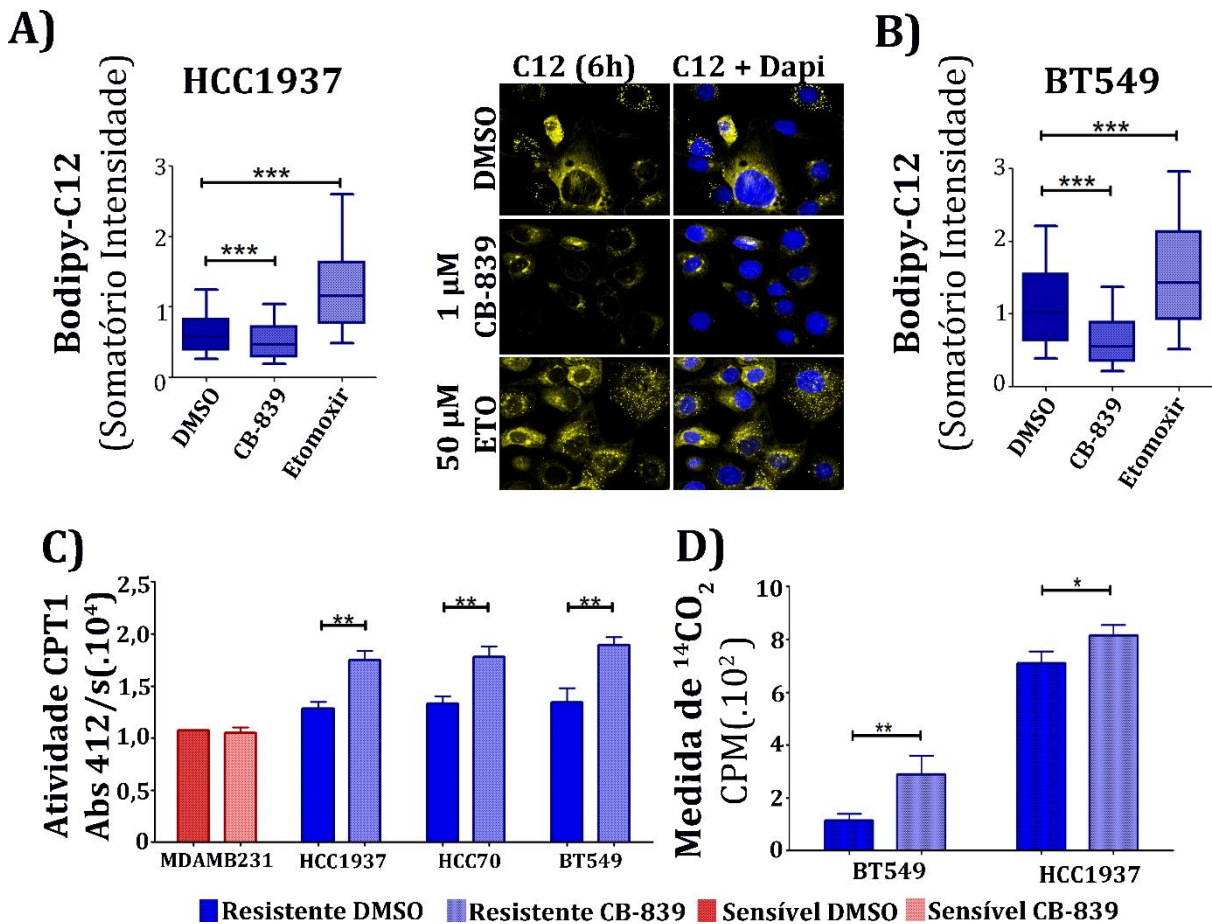


Figura 17. Avaliação da plasticidade metabólica entre metabolismo de glutamina e beta-oxidação de ácidos graxos

Avaliação do aumento do metabolismo de ácidos graxos com a inibição do metabolismo de glutamina por somatório de intensidade total celular da sonda RED C12 na linhagem resistente HCC1937 (A) com imagem representativas dos tratamentos à direita, e na linhagem TN resistente (B) BT549. (C) Medida de atividade de CPT1 em linhagens submetidas ao tratamento com 1 μM CB-839 e (D) Medida de ¹⁴CO₂ derivado de (¹⁴C)-ácido palmítico uniformemente marcado em linhagens resistentes tratadas com CB-839. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Medimos então a atividade de CPT1 em três linhagens resistentes (HCC1937, HCC70, BT549) e uma sensível (MDA-MB-231) ao CB-839. Os resultados mostraram que a atividade de CPT1 é maior nas linhagens resistentes em relação à linhagem sensível, sugerindo que essas linhagens já possuem a beta-oxidação ativada como característica de seu perfil

metabólico (**Figura 17C**). Além disso, o tratamento com CB-839 aumentou ainda mais a atividade da enzima nas três linhagens resistentes, mas não alterou a atividade de CPT1 na linhagem sensível (**Figura 17C**). Uma vez que a atividade de CPT1 estava aumentada em células resistentes tratadas com CB-839, o que implicaria em aumento da beta-oxidação, medimos este processo através da formação de CO_2 proveniente da beta-oxidação por ensaio radioativo utilizando (^{14}C) - ácido palmítico uniformemente marcado em células tratadas com CB-839. Nossas análises mostraram que o tratamento com CB-839 aumentou a taxa de produção de $^{14}\text{CO}_2$ tanto em BT549 quanto HCC1937 (resistentes ao CB-839) (**Figura 17D**).

Da mesma maneira, o *knockdown* de *GLS* aumentou a formação de $^{14}\text{CO}_2$ na linhagem HCC1937 (resistente), enquanto que na linhagem MDA-MB-231 (sensível a CB-839) esse valor não se alterou (**Figura 18A**). Também em acordo, o aumento de atividade de CPT1 foi observado em BT549 submetida ao *knockdown* de *GLS* (**Figura 18B**). Em conjunto, nossos dados mostraram que linhagens resistentes a CB-839 são capazes de ativar/aumentar a beta-oxidação mitocondrial em condições de inibição de *GLS* ou bloqueio da enzima *GLS*.

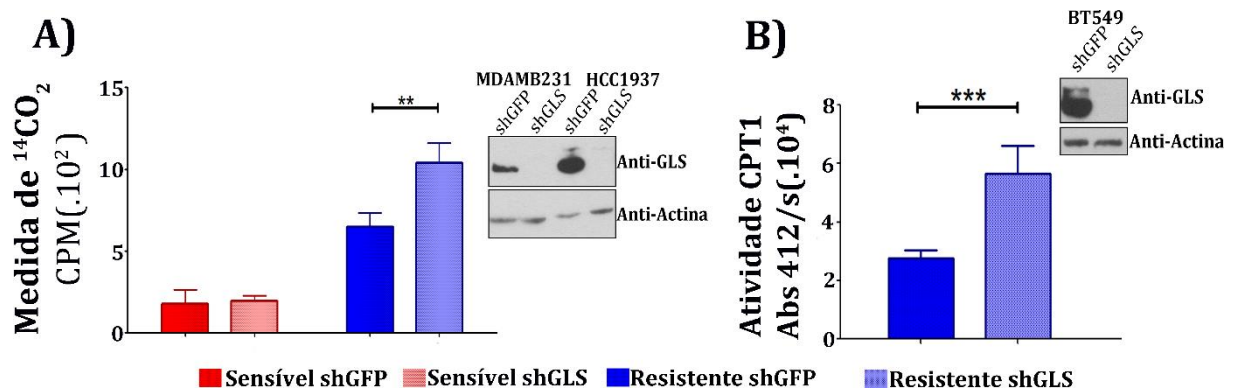


Figura 18. Knockdown de *GLS* também causa adaptação metabólica em linhagens TN resistentes

(A) Medida de $^{14}\text{CO}_2$ derivado de (^{14}C)-ácido palmítico uniformemente marcado na linhagem sensível MDA-MB-231 e na linhagem resistente HCC1937 submetidas ao *knockdown* de *GLS*. (B) Medida de atividade de CPT1 em BT549 após silenciamento de *GLS*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

4.5. Ativação da beta-oxidação em células resistentes ao CB-839 é importante para manter a produção de ATP via respiração mitocondrial

Uma vez mostrado que células resistentes ao CB-839 tem aumento na atividade de CPT1 quando tratadas com o composto e que, nestas condições (ou de atenuação da expressão de *GLS*), há maior produção de CO_2 a partir de palmitato adicionado ao meio, resolvemos medir o consumo de oxigênio na linhagem resistente BT549 sob efeito do *knockdown* de *GLS*, de *CPT1A* e o *knockdown* duplo de ambos genes. Verificamos que todas as condições são responsivas aos inibidores (oligomicina, FCCP, rotenona/antimicina), sugerindo que em todas as mitocôndrias são funcionais e consomem O_2 (**Figura 19A**). O *knockdown* de *GLS* não foi

eficiente em reduzir o consumo de oxigênio nestas células, enquanto que a redução de *CPT1A* o fez. Além disso, verificamos que a redução combinada dos níveis de expressão de *GLS* e *CPT1A* foi mais eficiente em diminuir o consumo de oxigênio em BT549 em comparação ao controle (**Figura 19B**). O mesmo padrão foi observado após o desacoplamento das mitocôndrias com o uso de FCCP (**Figura 19C**).

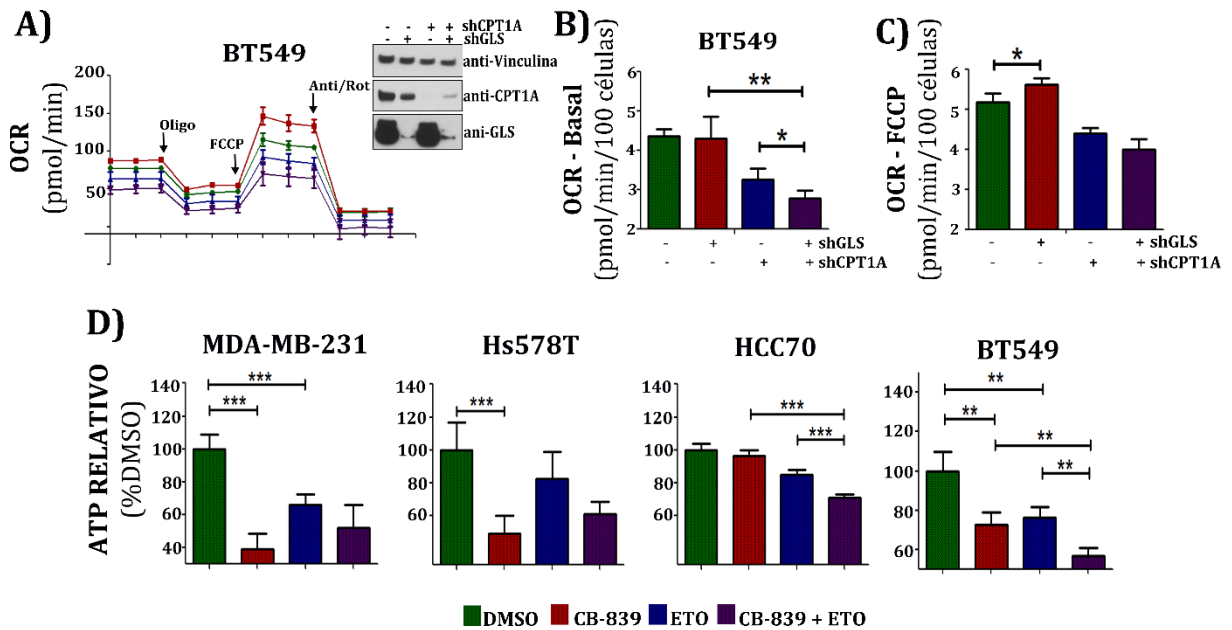


Figura 19. Beta-oxidação é importante para a manutenção da produção de ATP em células resistentes tratadas com CB-839.

(A) Curva de respiração celular da linhagem BT549 submetida ao *knockdown* de *GLS* e de *CPT1A* individualmente ou combinados respondendo aos inibidores Oligomicina, FCCP e Rotenona/Antimicina; (B) Taxa da respiração basal nas quatro condições experimentais; (C) Taxa da capacidade máxima respiratória nas quatro condições experimentais; (D) Medida dos níveis de ATP nas linhagens sensíveis MDA-MB-231 e Hs578T e nas linhagens resistentes HCC70 e BT549. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Uma vez que a inibição do metabolismo de glutamina e de ácidos graxos é eficiente em reduzir a capacidade respiratória das células, nós esperamos que também impactasse nos níveis de ATP. Assim, avaliamos a quantidade relativa de ATP nas linhagens sensíveis MDA-MB-231 e Hs578T e nas linhagens resistentes HCC70 e BT549 quando submetidas ao tratamento com CB-839 e etomoxir (**Figura 19D**). Enquanto que nas células sensíveis, em comparação as resistentes, a inibição de *GLS* teve maior impacto no nível de ATP (em relação ao controle), o co-tratamento (CB-839 + etomoxir) levou a um aumento no nível de ATP (em relação as células somente tratadas com CB-839). Em contrapartida, o co-tratamento nas células resistentes teve um efeito combinatório na queda do nível de ATP celular (em relação a somente tratado com etomoxir ou CB-839). Concluímos que células resistentes ao CB-839 são mais

sensíveis a co-inibição com CB-839 e etomoxir, pois a beta-oxidação impacta nos níveis de ATP celular.

4.6. Avaliação do impacto da inibição concomitante do metabolismo de glutamina e de ácidos graxos na proliferação, migração e invasão celular

Dado os resultados obtidos de que células TN resistentes ao CB-839 são capazes de oxidar mais ácidos graxos quando *GLS* tem expressão atenuada, e que estas células utilizam a beta-oxidação como fonte energética alternativa à glutamina, avaliamos a proliferação das 12 linhagens TN quando tratadas com 1 μ M CB-839, 200 μ M etomoxir ou com os dois inibidores. (**Figura 20**).

Como resultado, verificamos que o grupo das células sensíveis ao composto CB-839 tiveram o curioso comportamento de terem seu perfil de proliferação aumentado (Hs578T), morte atenuada (MDA-MB-231, HCC1806 e HCC38) ou nenhuma alteração (HCC1143 e MDA-MB-436) quando tratadas simultaneamente com os dois inibidores em relação ao tratamento individual de CB-839, indicando que os dois inibidores podem funcionar de maneira antagonista nestas células (**Figura 20A**).

No outro sentido, em quatro das células resistentes ao CB-839 (HCC1937, HCC70, BT549 e MDA-MB-468) o co-tratamento de etomoxir e CB-839 provocou uma queda na proliferação maior do que o uso dos dois inibidores separadamente (**Figura 20B**), indicando que a inibição dupla do metabolismo de glutamina e de ácidos graxos é mais eficiente em reduzir a proliferação dessas células do que o uso individual dos compostos. As linhagens MDA-MB-157 e MDA-MB-453 só mostraram efeito na proliferação com o uso de etomoxir, sugerindo que estas células dependem primariamente do metabolismo de ácidos graxos para sobrevivência. Assim, concluímos que células resistentes são capazes de ativar uma compensação metabólica e aumentar a oxidação de ácidos graxos como forma de manter sua proliferação.

Outro processo muito importante para o fenótipo tumoral é a capacidade de migração e invasão das células cancerosas e, por isso, nós avaliamos o impacto da inibição do metabolismo de glutamina e de ácidos graxos para os processos de migração e invasão da linhagem sensível MDA-MB-231 e a resistente BT549.

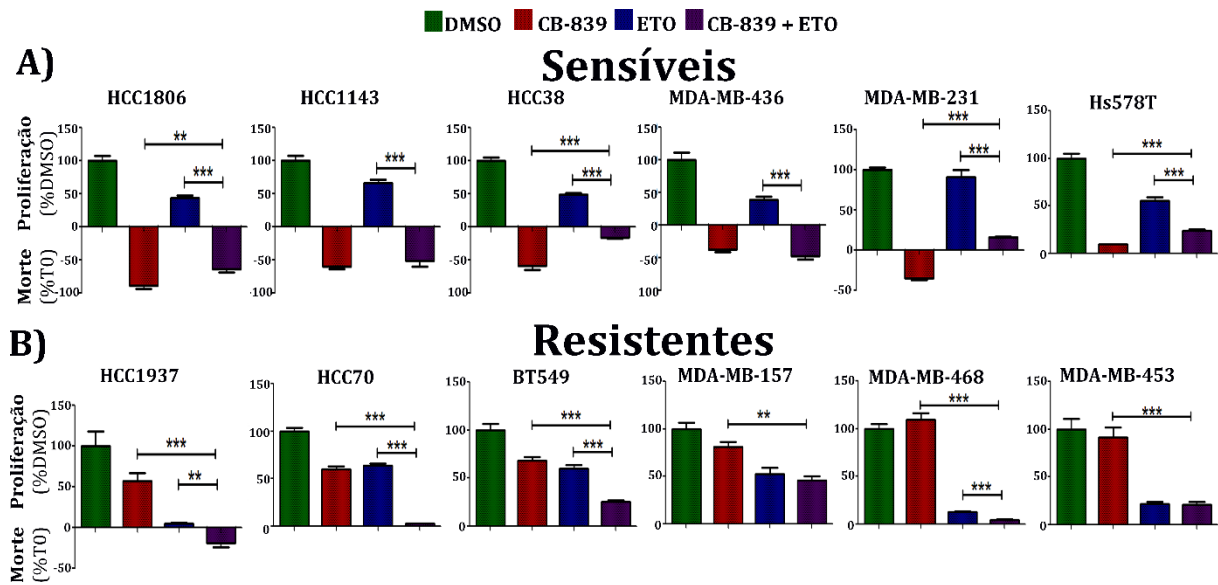


Figura 20. Combinação de CB-839 com etomoxir potencializa efeito sobre proliferação celular de células resistentes.

Avaliação o impacto do tratamento com CB-839 e etomoxir individualmente ou combinados nas linhagens TN sensíveis (A) e resistentes (B). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Como resultados, verificamos que o *knockdown* de *GLS* foi capaz de reduzir o potencial invasivo na linhagem sensível MDA-MB-231, porém, a combinação da baixa expressão de *GLS* e etomoxir restaurou os níveis de invasão para o do controle (Figura 21A). Em adição, em relação à migração, não foi observado efeito do tratamento com etomoxir, enquanto que o tratamento com CB-839 foi eficiente em diminuir a migração da linhagem sensível MDA-MB-231. Em combinação, o efeito de CB-839 prevaleceu na redução da migração (Figura 21B, Apêndice 1. Figura 4A, C).

Em relação à linhagem resistente BT549, observamos que o *knockdown* de *GLS* é também eficiente em diminuir a invasão nestas células, assim como o uso individual de etomoxir. Novamente observamos que as células submetidas ao *knockdown* de *GLS* e à inibição de CPT1 por etomoxir diminuiram ainda mais seu potencial invasivo em relação ao controle (Figura 21C). Esse mesmo padrão foi observado para a migração das células tratadas com CB-839 e etomoxir individualmente ou em combinação (Figura 21D, Apêndice 1. Figura 4B).

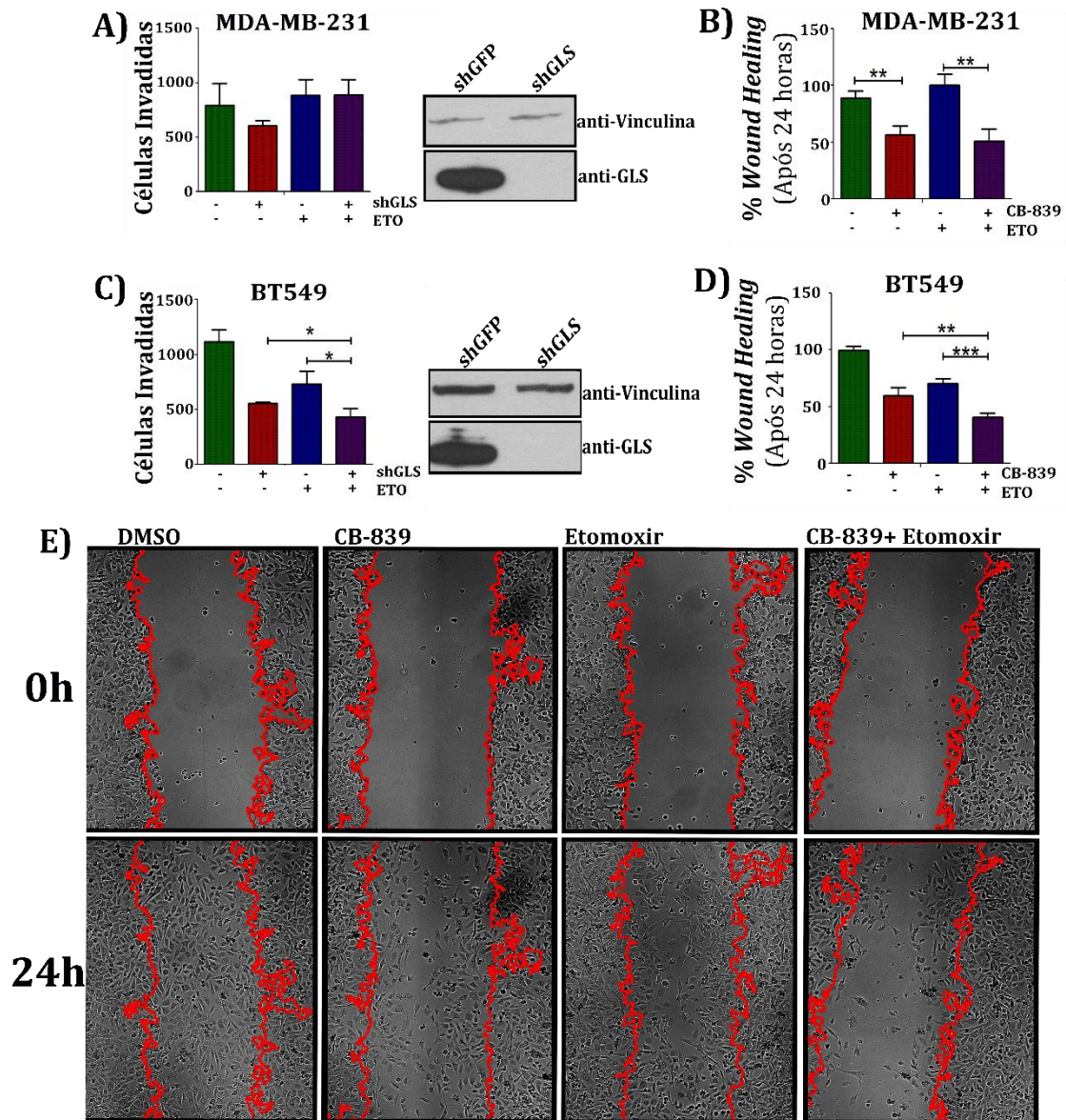


Figura 21. Fenótipo tumoral em relação aos processos de invasão e migração

(A) Invasão em MDA-MB-231 submetidas ao *knockdown* de *GLS* e tratadas com etomoxir em relação ao controle (shGFP tratada ou não com etomoxir); (B) Migração em MDA-MB-231 tratada com CB-839 e etomoxir individualmente ou combinados; (C) Invasão em BT549 submetidas ao *knockdown* de *GLS* e tratadas com etomoxir em relação ao controle (shGFP tratada ou não com etomoxir); (D) Migração em BT549 tratada com CB-839 e etomoxir individualmente ou combinados, (E) Imagens representativas mostrando a migração na linhagem BT549 nas condições DMSO, CB-839, Etomoxir ou CB-839 combinado com etomoxir em 24 horas.

4.7. Perfil metabólico de BT549 muda com o tratamento duplo de CB-839 e etomoxir

Avaliamos o perfil metabólico da linhagem BT549 quando tratada com os inibidores CB-839 e etomoxir, individualmente ou em combinação, através de análise *untargeted* utilizando GC-MS. Encontramos 103 *features* metabólicas e identificamos 43 metabólitos. Destes, 17 estavam diferencialmente abundantes em pelo menos um tratamento em relação ao controle (DMSO) (**Apêndice 2. Tabela 6**). As *features* encontradas foram eficientes em separar o grupo de dupla-inibição (CB-839 + etomoxir) dos outros grupos (DMSO, CB-839 ou etomoxir) por uma PCA não supervisionada (**Figura 22A**). Usando os 17 metabólitos identificados e diferencialmente abundantes, os quatro grupos foram separados entre si por uma PCA não supervisionada (PC1 48% e PC2 24,7%) (**Figura 22B**) e foram agrupados em um *heatmap* (**Figura 22C**).

Como esperado, encontramos o glutamato menos abundante no tratamento com CB-839 e o tratamento duplo de CB-839 e etomoxir, uma vez que este metabólito é produto direto do metabolismo de glutamina pela enzima glutaminase. Encontramos também um aumento de prolina, outra fonte anaplerótica de reposição de α -cetoglutarato a partir glutamato, sugerindo que a inibição do metabolismo de glutamina pode aumentar a utilização de prolina para reposição do intermediário, embora não seja suficiente para reestabelecer os níveis de glutamato (**Figura 22D**).

Entre os metabólitos identificados, observamos que as poliaminas putrescina, espermidina e espermina foram avaliados como diferencialmente abundantes entre os grupos de tratamento (**Figura 22E**). Especificamente, nossos resultados mostraram que o tratamento com CB-839 foi eficiente em aumentar os níveis de putrescina e diminuir de espermina. O tratamento com etomoxir causou o oposto, uma diminuição de putrescina e aumento de espermidina. Por fim, o tratamento combinado de 1 μ M CB-839 e 200 μ M etomoxir causou aumento nos níveis do metabólito de putrescina e diminuição dos níveis de espermidina e espermina (**Figura 22E**), sugerindo que o catabolismo destas poliaminas é ativado por este tratamento.

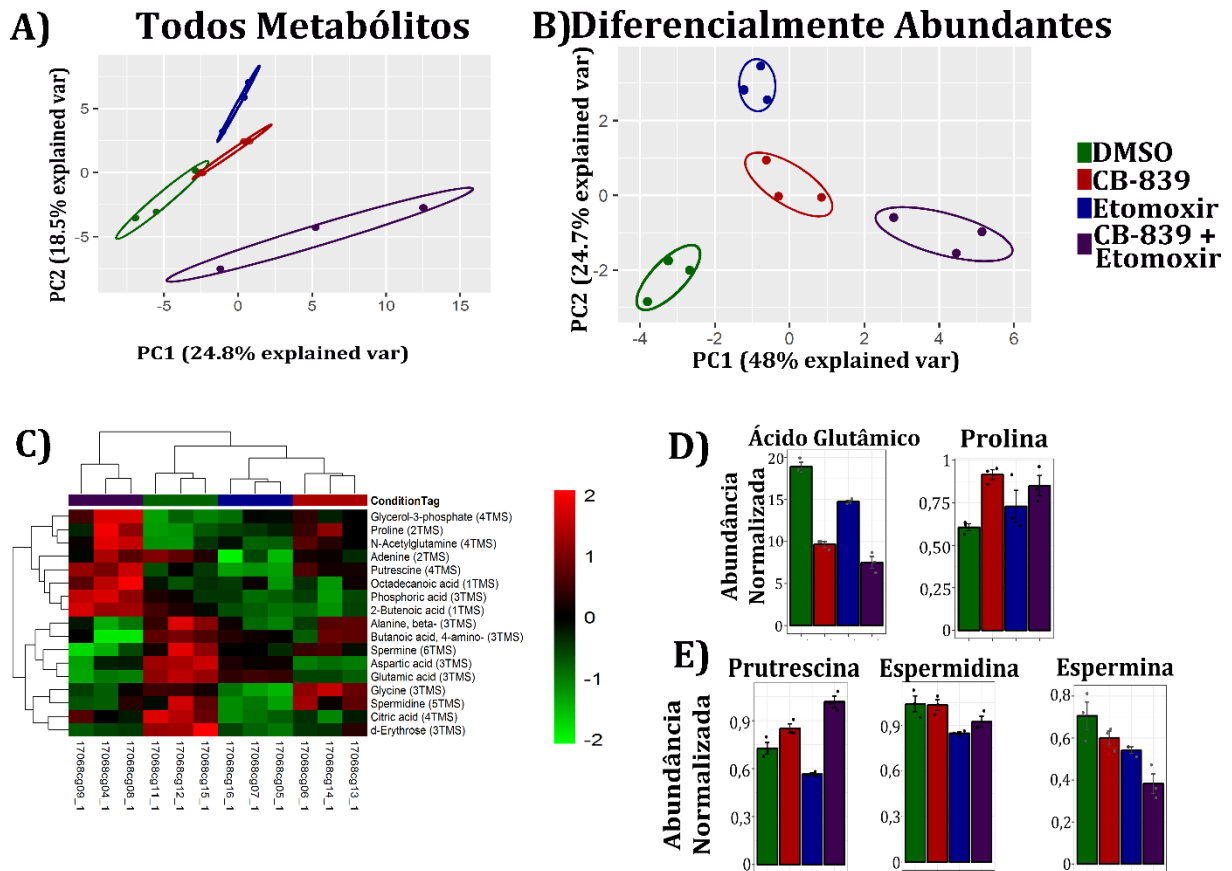


Figura 22. Avaliação do perfil metabólico de BT549

(A) Análise de PCA não supervisionada de todas as *features* identificadas; (B) Análise de PCA não supervisionada dos metabólitos diferencialmente abundantes entre os grupos; (C) *Heatmap* construído a partir dos metabólitos diferencialmente expressos; (D) Abundância relativa dos metabólitos ácido glutâmico e prolina; (E) Abundância relativa das poliaminas prutrescina, espermidina e espermina.

4.8. Avaliação do papel de AMPK na regulação da plasticidade metabólica de linhagens TN

Por seu papel no controle energético celular, nós especulamos que a ativação de AMPK poderia ser responsável pela ativação de beta-oxidação em células tumorais resistentes ao CB-839, ou com baixa expressão de *GLS*. Utilizando dados proteicos dos tumores de pacientes de câncer de mama divididos em maior e menor expressão de *GLS*, avaliamos os níveis proteicos de AMPK e ACC fosforilados. Nós observamos que tumores com menor expressão de *GLS* apresentam maior nível de fosforilação na Thr¹⁷² de AMPK (**Figura 23A**) e Ser⁷⁹ de ACC (**Figura 23B**), sugerindo que nestes tumores a beta-oxidação pode estar ativada em função do acionamento destas vias. Confirmamos na linhagem BT549 (resistente) que o

tratamento com 1 μM CB-839 por 72 horas foi eficiente em aumentar a fosforilação de AMPK no resíduo Thr¹⁷² e de ACC no resíduo Ser⁷⁹ (**Figura 23C**).

Para avaliar se AMPK está envolvida na ativação de CPT1 em células resistentes tratadas com CB-839, as células foram tratadas com CB-839 (ou veículo, DMSO) na situação controle (shGFP) ou com *knockdown* da subunidade α de AMPK (shAMPK α). Nós observamos que o aumento na atividade de CPT1 pela inibição de glutaminase deixou de ocorrer nas células com expressão atenuada de AMPK (**Figura 23D**). Em acordo, demonstramos que o aumento da respiração dependente da oxidação de (¹⁴C)-ácido palmítico deixou de acontecer quando a expressão do gene da subunidade α AMPK sofreu *knockdown* (**Figura 23E**), confirmando que o aumento da beta-oxidação, como forma de manutenção dos níveis energéticos e adaptação metabólica de linhagens resistente, é dependente da atividade de AMPK.

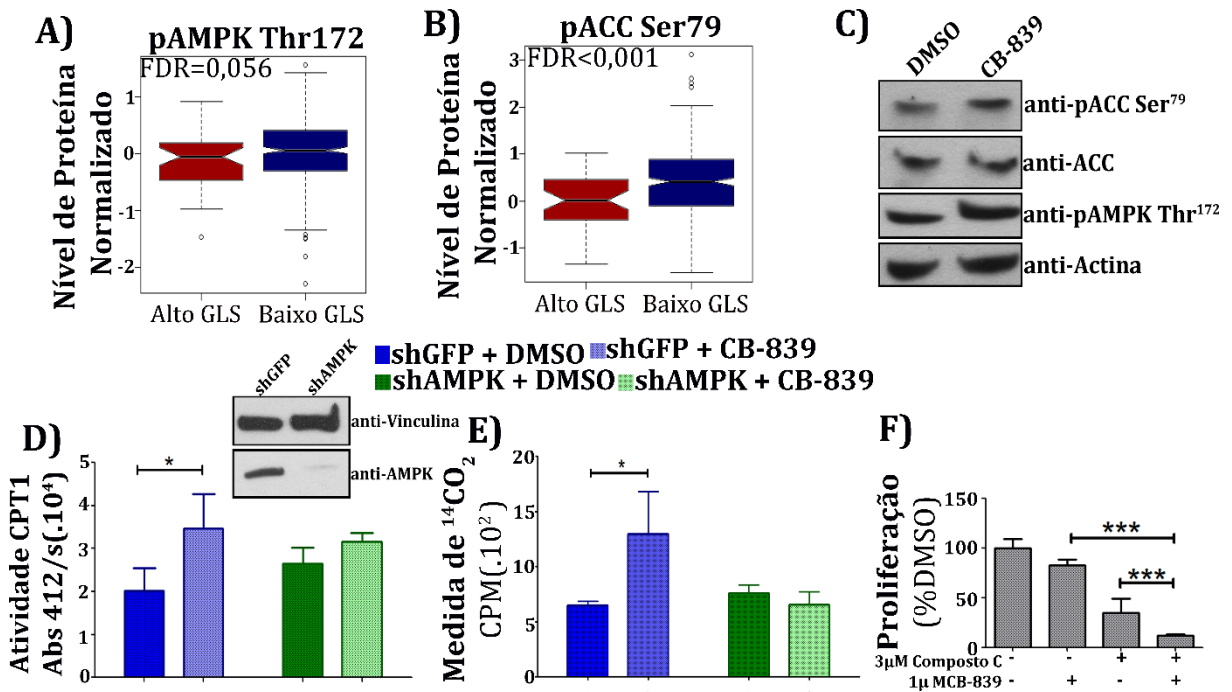


Figura 23. Ativação de AMPK é importante para o acionamento da beta-oxidação em células resistentes ao CB-839 quando tratadas com este composto.

A partir de dados de proteínas de tumores de pacientes de câncer de mama, disponíveis pelo *The Cancer Proteomic Atlas*, para as mesmas amostras onde avaliamos a expressão de *GLS*, nós observamos que tumores com baixa expressão de *GLS* apresentam maior nível de AMPK fosforilada no resíduo Thr172 (**A**) e de ACC fosforilado no resíduo Ser79 (**B**). O tratamento com 1 μM de CB-839 também aumentou a fosforilação de AMPK e ACC (**C**). Atividade de CPT1 (**D**) e medida da formação de CO₂ a partir de (¹⁴C)-ácido palmítico (**E**) em BT549 submetida ao *knockdown* de AMPK α . (**F**) Proliferação na presença dos compostos CB-839, inibidor de glutaminase, e de Composto C, inibidor da atividade de AMPK.

Por fim, verificamos que a inibição de AMPK pelo composto C²⁷⁸, combinado com a inibição de GLS por CB-839, teve efeito mais pronunciado na proliferação da linhagem resistente BT549 do que o tratamento individual de cada inibidor (**Figura 23F**). Em conjunto, mostramos que células resistentes ao CB-839 sobrevivem pela ativação da beta-oxidação e que a ativação desta via é feita através da ativação de AMPK.

4.9. Metabolismo de glutamina, ácidos graxos e o fator de transcrição MYC

Nosso trabalho sugere que o metabolismo de glutamina, intimamente ligado à expressão de *GLS*, e a beta-oxidação são vias metabólicas alternativas em tumores TN. Uma vez que MYC é descrito como regulador positivo da expressão de glutaminase e também é descrito como superexpresso em linhagens de mama TN dependentes de beta-oxidação, nós avaliamos se existe correlação entre MYC e GLS (isoforma GAC) em nossas linhagens. Para isso, quantificamos o nível proteico de MYC no núcleo e de GAC no citoplasma por imunofluorescência e comparamos os níveis das proteínas entre os grupos de linhagens sensíveis e resistentes à inibição de GLS. Verificamos que linhagens resistentes apresentam um aumento de 13% no nível médio de MYC em relação as sensíveis, sendo, entretanto, essa diferença não significativa ($p = 0,2965$) (**Figura 24A**). Em seguida, nós comparamos os níveis proteicos de MYC e de GAC e não encontramos correlação entre a expressão das duas proteínas (Correlação de Pearson = 0,03489, $p=0,9143$) (**Figura 24B**). Por fim, utilizando os dados do TCPA dos tumores de pacientes de mama, verificamos que o nível proteico de MYC entre os grupos com menor e maior expressão de *GLS* não se distingue (FDR = 0,093) (**Figura 24C**).

Em outro sentido, avaliamos se a nível proteico de MYC está relacionada à beta-oxidação em nossas linhagens. Para isso, comparamos o nível desta proteína com a sensibilidade apresentada por estas linhagens ao inibidor etomoxir (**Figura 24D**). Nossos dados mostraram correlação negativa (Pearson= -0,71; $p=0,0214$) entre estes dois fatores, confirmando que linhagens TN com alta expressão de MYC são mais sensíveis ao tratamento com etomoxir em relação à proliferação. Além disso, encontramos uma correlação positiva (Pearson= 0,6179; $p=0,0445$) entre expressão de MYC e expressão de CPT2 (**Figura 24E**), enzima limitante para a beta-oxidação, reforçando a relação entre o metabolismo de ácidos graxos e a expressão deste fator de transcrição.

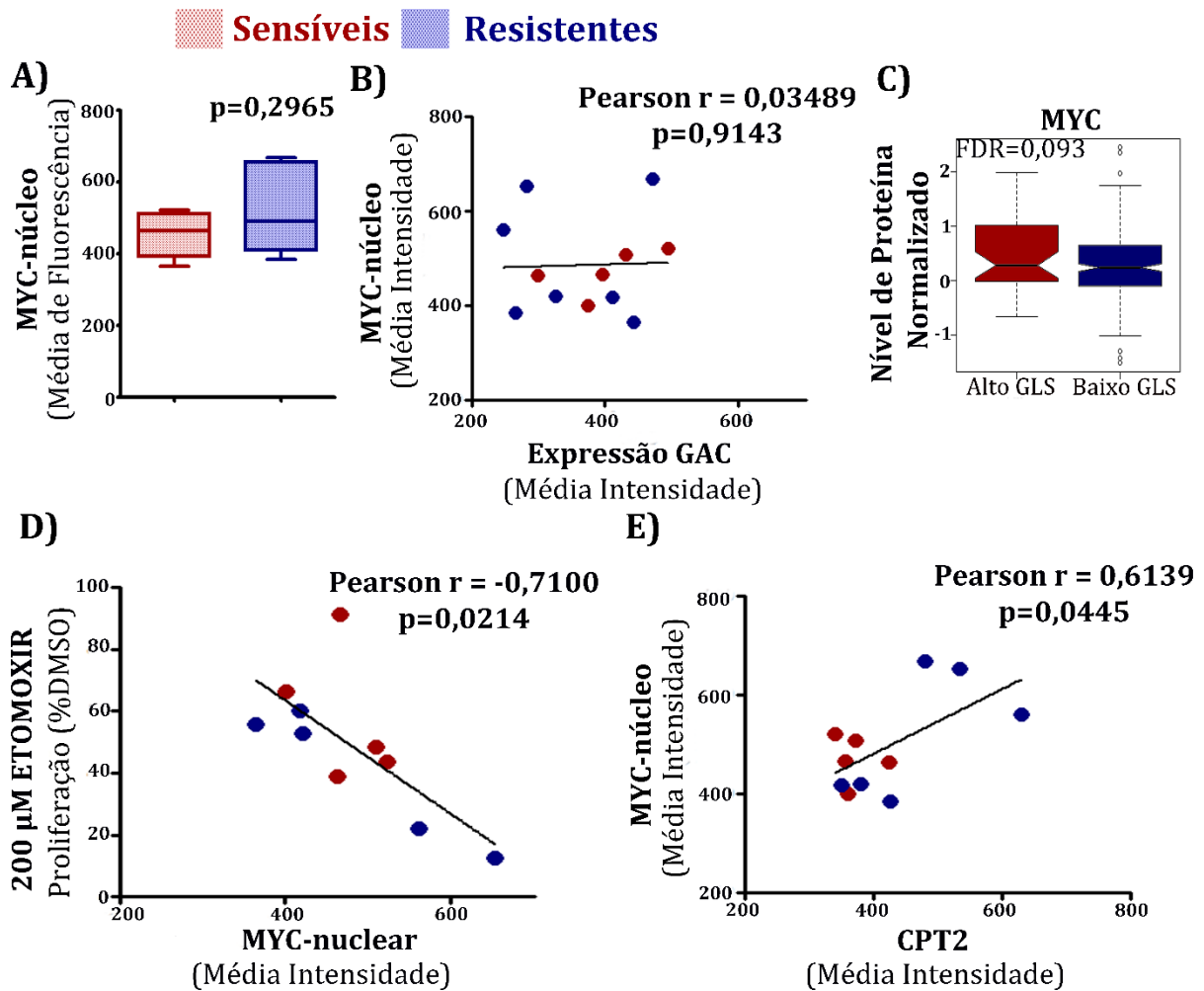


Figura 24. Estudo da relação entre expressão de MYC e o metabolismo de glutamina e oxidação de ácidos graxos.

(A) Comparação dos níveis proteicos de MYC entre as linhagens sensíveis e resistentes ao inibidor de glutaminase CB-839; (B) Correlação entre níveis proteicos de MYC e GAC encontrados nas linhagens TN por imunofluorescência; (C) Comparação dos níveis proteicos de MYC em pacientes de câncer de mama com alto e baixo nível de GLS; (D) Correlação entre níveis proteicos de MYC e sensibilidade ao inibidor de beta-oxidação, etomoxir; (E) Correlação entre níveis proteicos de MYC e CPT2 encontrados nas linhagens TN por imunofluorescência.

4.10. Outras vias alteradas em tumores com baixa expressão de *GLS*

O recente desenvolvimento de técnicas *high-throughput* alinhada a implementação de ferramentas de bioinformática tem permitido que uma grande quantidade de dados seja gerada e analisada. Essas análises podem ser usadas no direcionamento de importantes questões, reduzindo o custo e tempo dispendido em experimentos de bancada.

Nossas análises dos dados de RNAseq disponíveis de tumores de pacientes classificados em alto e baixo *GLS* possibilitaram que nós levantássemos a hipótese de que a oxidação de ácidos graxos pode ser responsável pela adaptação metabólica em linhagens resistentes ao tratamento com CB-839. A partir destas análises, nós levantamos também outras

hipóteses de mecanismos de resistência e sobrevivência em linhagens resistentes à inibição de GLS que poderão ser investigadas em projetos futuros.

a. Peroxidação de lipídios

Além da beta-oxidação mitocondrial, nós também encontramos diversos genes relacionados à beta-oxidação peroxissomal, ou peroxidação de lipídios, aumentados em tumores de mama com baixa expressão de *GLS* (**Figura 25**). Esta via é ativada principalmente em situações de estresse oxidativo nas células e é importante para a produção de moléculas de sinalização que são formadas a partir da oxidação parcial do ácido araquidônico, proveniente da liberação de ácidos graxos que formam os fosfolipídios de membrana, especialmente o ácido linoleico. Estes fosfolipídios sofrem a ação das fosfolipases da classe A2 e liberam ácidos graxos livres que são direcionados aos peroxissomos, onde serão degradados. Nos peroxissomos, estes ácidos graxos livres sofrem a ação das enzimas acil-CoA sintetase que, através de duas reações sequenciais, transformam estes ácidos graxos livres em cadeias de acil-CoA utilizando ATP e uma molécula de Coenzima A e liberando AMP e PPI. Estas enzimas podem estar tanto acopladas à membrana dos peroxissomos quanto na matriz desta organela e, por isso, o transporte tanto dos ácidos graxos livres ou dos acil-CoA são realizados via transportadores do tipo ABC (especialmente *ABCD1*). Na matriz do peroxissomo estes acil-CoA são oxidados por um processo parecido com o que ocorre nas mitocôndrias, porém sem produção de ATP e com a formação de H₂O₂ pela transferência de elétrons para o O₂ a partir de FADH₂ que é formado no processo de quebra da cadeia²⁷⁹.

Nos peroxissomos, a síntese de moléculas sinalizadoras pode ocorrer a partir de três tipos diferentes de enzima, sendo que cada tipo de reação é responsável por formar uma classe de moléculas. A oxidação via ciclooxigenases (*ACOX*) formará eicosanoides do tipo prostanóides (especialmente as prostaglandinas e tromboxanos), já a oxidação que ocorre via lipoxigenases (*LOX*) é responsável por produzir leucotrienos. Por último, os ácidos graxos degradados pela classe de citocromo P-450 (*CYPs*) geram especialmente leucotoxinas e prostaciclina. Estas moléculas podem ser autócrinas ou parácrinas e são especialmente pro-inflamatórias, podendo desencadear centenas de respostas referentes a proliferação, apoptose e, portanto, podem ser importantes para o processo tumorigênico²⁸⁰. Essas moléculas saem dos peroxissomos através de transferases (*CROT*).

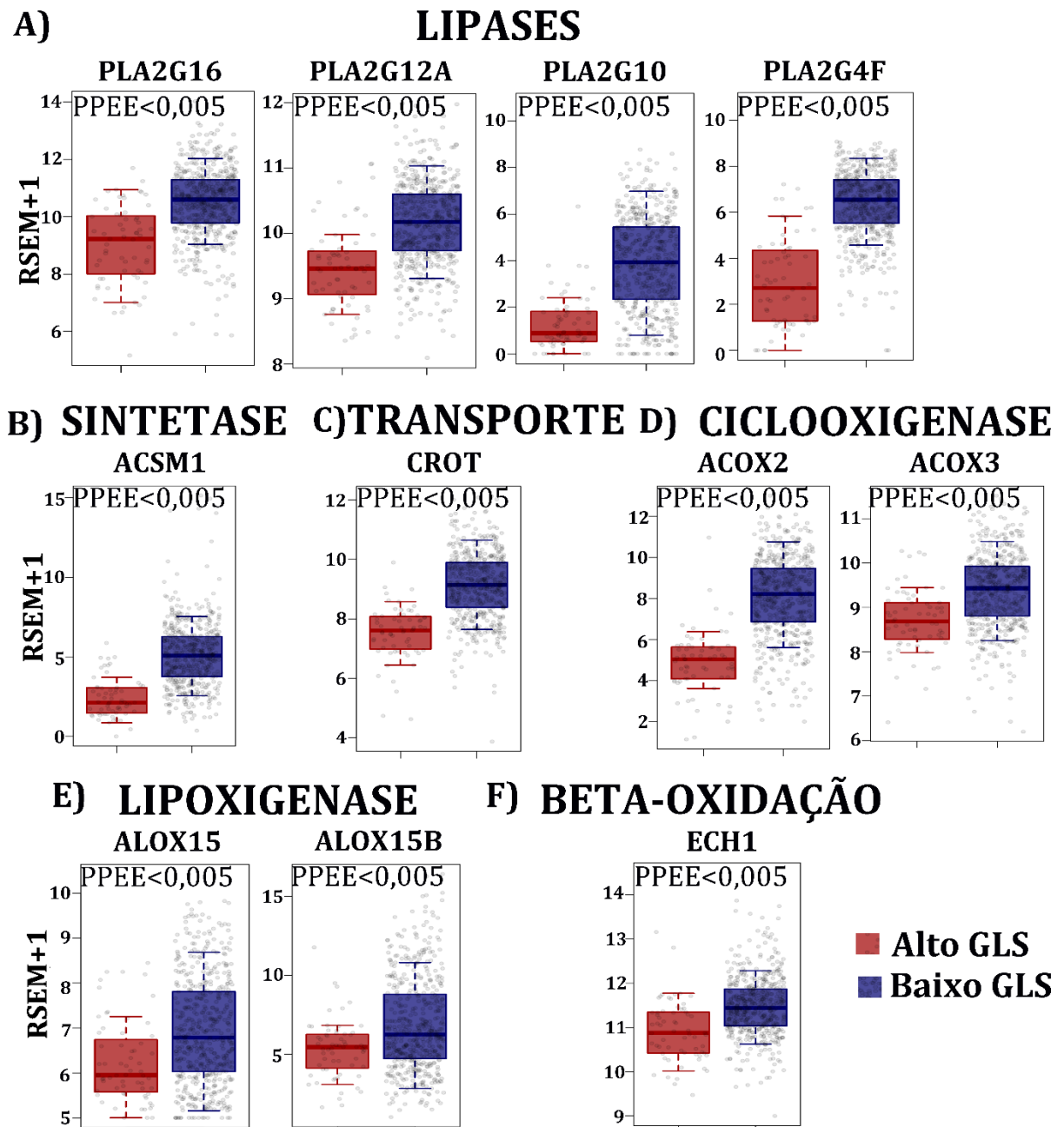


Figura 25. Genes relacionados à peroxidação de lipídios aumentados em tumores baixo GLS

(A) Lipases responsáveis por liberar ácidos graxos livres para serem oxidados nos peroxissomos, (B) Acil-CoA peroxissomal responsável pela adição do grupo CoA a uma cadeia acil livre, (C) Transporte das moléculas formadas pela peroxidação para o citoplasma, (D) Ciclooxygenases aumentadas em tumores baixo GLS, (E) Lioxigenases aumentadas em tumores baixo GLS, (F) Gene envolvido na quebra de acil-CoA para produção de moléculas sinalizadoras.

b. Produção de corpos cetônicos e ativação de gliconeogênese

Durante períodos de baixa disponibilidade de nutrientes, o oxaloacetato pode ser desviado para gliconeogênese pela atividade da enzima PECK (gene *PCK1* e 2)²⁸¹, processo inverso à glicólise que é ativado como resposta à diminuição da oxidação da glicose para manutenção do metabolismo celular. Com a diminuição de oxaloacetato disponível para o ciclo TCA, o acetil-CoA formado pode ficar em excesso e ser desviado para a produção de corpos cetônicos, a partir da condensação de dois acetil-CoA e liberação da coenzima A para que a beta-oxidação não seja interrompida. Os corpos cetônicos produzidos são acetona, que é liberada do organismo, além de acetoacetato e D-β-hidroxiacetato que podem entrar na corrente sanguínea e serem utilizados como fonte de acetil-CoA em outros órgãos, como os músculos e o cérebro. Embora a formação de corpos cetônicos e gliconeogênese ocorra em sua maior parte no fígado e estejam relacionados a condições extremas do organismo, como jejum prolongado e patologias, como diabetes mellitus tipo 2, alguns artigos tem demonstrado como esses dois processos podem influenciar na tumorigênese, como em câncer de próstata²⁸² e carcinomas de mama²⁸³.

A partir das análises de pacientes que realizamos com dados disponíveis do TCGA encontramos que genes relacionados ao transporte de glicose (*SLC2A1*, *SLC2A3* e *SLC2A14*) e de frutose (*SLC2A5*, *SLC2A9*) e o gene da fosfofrutocinase (*PFKP*), que codifica a segunda enzima irreversível reguladora da glicólise, estão diminuídos em tumores com baixa expressão de glutaminase em relação à tumores com alta expressão. Além disso, encontramos que os genes que codificam as três enzimas irreversíveis e essenciais para que a gliconeogênese ocorra (*G6PC3*, *FBP1* e *PCK2*) e genes importantes para a formação de corpos cetônicos (*BDH1* e *HMGCL*) estão aumentados nos tumores de baixa expressão de glutaminase (**Figura 26**).

Para avaliar se possivelmente esses dois processos estão aumentados em nossas linhagens com metabolismo de glutamina alterado, realizamos PCR quantitativo para os genes *Frutose Bifosfatase 1 (FBP1)* e *3-hidroxiacetato desidrogenase (BDH1)* em MDA-MB-231 e BT549 tratadas com 1 μM de CB-839 por 96 horas e comparamos os níveis de expressão com o controle mantido em DMSO 0,1% pelo mesmo período. Encontramos que a linhagem MDA-MB-231, uma linhagem que classificamos como não capaz de se adaptar na ausência de glutamina, apresenta uma diminuição de expressão dos genes (**Figura 27A**), enquanto que a linhagem BT549, capaz de sobreviver em condições de metabolismo de glutamina alterado, apresentou um aumento nos níveis de expressão de ambos genes (**Figura 27B**), sugerindo que a ativação desses processos pode estar envolvida na capacidade de manter a viabilidade celular.

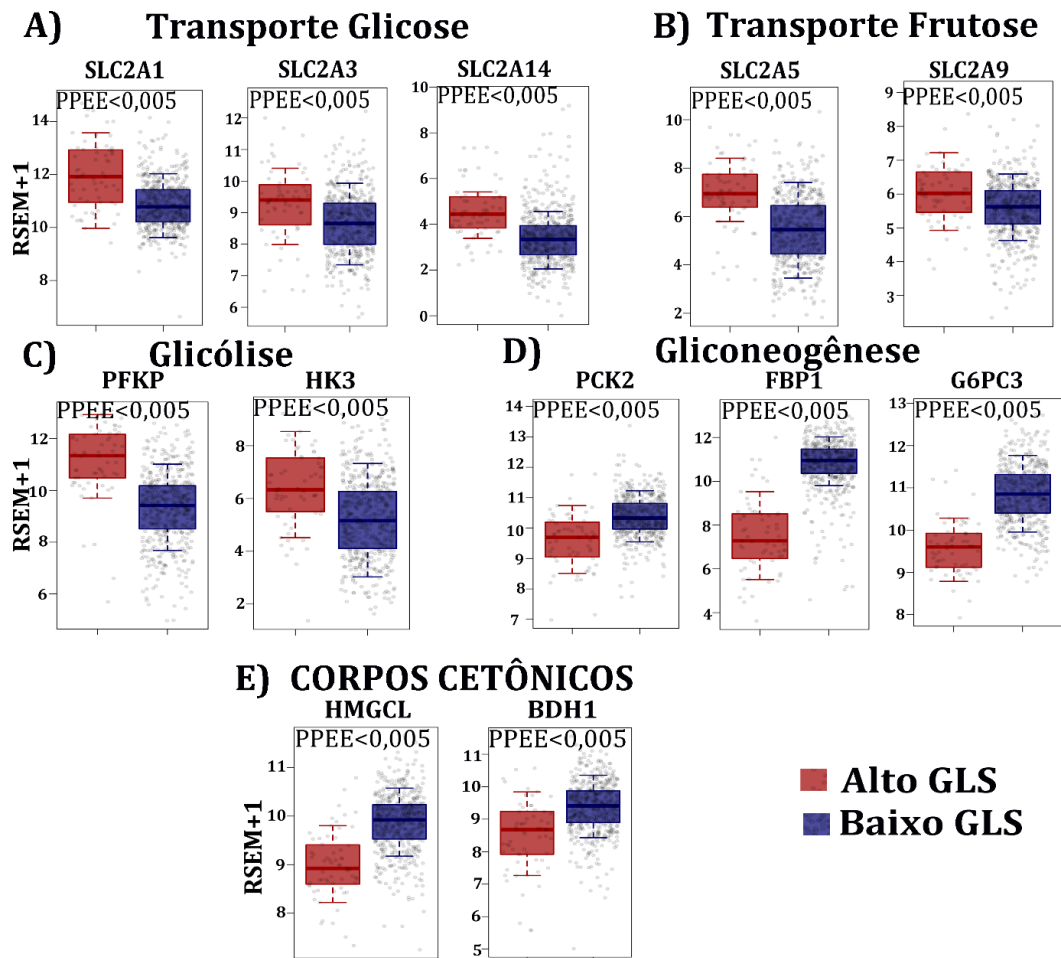


Figura 26. Genes relacionados à glicólise, gliconeogênese e formação de corpos cetônicos diferencialmente expressos em pacientes com alta e baixa expressão de GLS.

Tumores com baixa expressão de GLS apresentam transportadores de glicose (A), transportadores de frutose (B) e reguladores da glicólise (C) diminuídos em relação aos tumores com alta expressão deste gene. Em contrapartida, tumores baixo GLS apresenta aumento na expressão de genes que regulam o processo de gliconeogênese (D) e formação de corpos cetônicos (E).

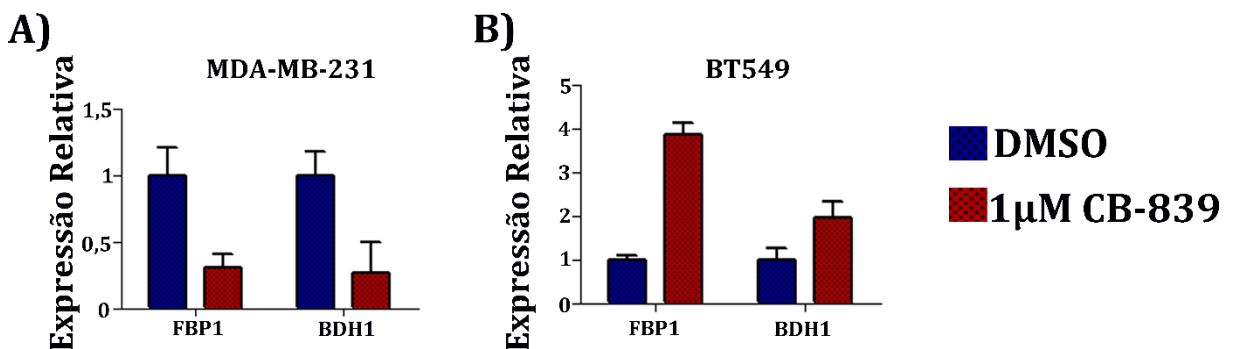


Figura 27. PCR quantitativo de genes reguladores da gliconeogênese e formação de corpos cetônicos em linhagens TN.

5. Discussão

Tumores triplo-negativo correspondem a 15% dos casos diagnosticados de câncer de mama e, por sua ausência de receptores hormonais e não amplificação de HER2, não respondem aos tratamentos convencionais para a doença. A busca por marcadores moleculares e alvos terapêuticos para este subtipo de tumor de mama tem mostrado que adaptação metabólica é uma de suas principais características^{84,87,284,285}. Trabalhos recentes têm mostrado que câncer de mama triplo-negativo é dependente do metabolismo de glicose^{86,235}, glutamina^{125,126} e lipídios^{174,242,244} para o seu processo tumorigênico.

Embora o metabolismo de glutamina seja importante para a viabilidade e proliferação de tumores de mama triplo-negativos, Timmerman e colaboradores (2013)¹²⁶ mostraram que linhagens deste subtipo tumoral podem responder de diferentes formas à privação de glutamina, com linhagens que entram em apoptose com a retirada deste aminoácido do meio de cultura, enquanto outras param ou apenas reduzem a taxa de proliferação. Da mesma maneira, Gross e colaboradores (2014)¹¹² mostraram que sete das 20 linhagens TN avaliadas não morrem quando glutamina é suprimida do meio e cinco das 20 continuaram a proliferar quando tratadas com 1 μ M de CB-839 (25%), sugerindo que estas células possuem uma plasticidade metabólica que permite sua adaptação e possível resistência a drogas anti-glutaminolíticas. Estes dois trabalhos também mostraram uma correlação positiva entre dependência de glutamina ou sensibilidade à inibição de GLS com altos níveis de glutaminase e maior consumo de glutamina.

De fato, nossos resultados apontam que as 12 linhagens utilizadas neste trabalho apresentam diferentes graus de dependência ao metabolismo de glutamina, assim como sensibilidade variada à inibição de GLS. Dessa maneira, conseguimos separar estas linhagens em dois grupos (sensíveis e resistentes) e verificamos que as linhagens sensíveis apresentavam maiores níveis proteicos de GLS, maior consumo de glutamina e secreção de glutamato e também apresentaram uma diminuição mais pronunciada na morfologia tubular de suas mitocôndrias e nos níveis de ATP quando submetidas ao tratamento com CB-839. Já é conhecido que células tumorais dependentes de glutamina utilizam este nutriente como fonte anaplerótica do ciclo do TCA, suprindo as necessidades energéticas e biossintéticas destas células^{105,286,287}.

A partir de dados de transcriptômica de linhagens celulares e de tumores de pacientes, nós supomos que a beta-oxidação pode estar aumentada em tumores de pacientes com baixa expressão de *GLS* e, portanto, poderia também ser responsável pela reprogramação

metabólica e manutenção do fenótipo tumoral na privação de glutamina/inibição de GLS das linhagens resistentes. Em seguida, nós comprovamos que a inibição por CB-839 ou o *knockdown* de GLS são capazes de provocar o aumento da beta-oxidação em linhagens resistentes. De fato, Long e colaboradores (2016)²⁸⁸ demonstraram por espectrometria de massas que em situação de privação de glutamina, a linhagem HepG2 apresenta maiores níveis de proteínas relacionadas à beta-oxidação.

Ácidos graxos acumulados na forma de triglicerídeos formam a principal reserva energética intracelular. Além de já ser descrito como uma importante fonte energética para a progressão da tumorigênese^{176,246,289,290}, especialmente em tumores de mama triplo negativos^{174,242,244}, contribuindo para a proliferação e metástase²⁹¹⁻²⁹⁵, muitos estudos mostram que a oxidação destes ácidos graxos são a principal forma de restabelecer o balanço energético nas células em situações de privação de nutrientes^{233,245,296,297}. Em especial, Hermanova e colaboradores (2016)¹⁷⁵ mostraram que a beta-oxidação é uma importante estratégia de adaptação metabólica para promover resistência ao composto L-asparaginase em leucemia linfoblástica aguda, principal estratégia terapêutica para este tipo de câncer.

Nós encontramos também que pacientes com tumores com baixa expressão de *GLS* e maior expressão de *CPT1A* apresentam pior prognóstico, sugerindo que a beta-oxidação aumentada pode estar relacionada com tumores mais agressivos. De fato, um trabalho recente mostrou que pacientes com câncer de mama triplo-negativo que apresentam genes relacionados a oxidação de ácidos graxos aumentados possuem menores chances de sobrevivência em relação aos pacientes com baixa expressão destes genes²⁴². Além disso, *CPT1A* é descrita como uma importante proteína para o processo tumoral em câncer de mama, com uma variante nuclear exclusivamente expressa em tumores. *CPT1A* também tem sido apontada como ligada a um pior prognóstico em outros tipos de cânceres, como leucemia mielóide aguda²⁹⁸ e glioblastoma²⁹⁹.

Para conhecer o impacto do aumento da beta-oxidação no fenótipo tumoral das linhagens TN após inibição de GLS, nós avaliamos o efeito da combinação da inibição farmacológica de GLS e de beta-oxidação sobre a proliferação, invasão e migração das linhagens TN. Em relação às linhagens sensíveis, curiosamente, nós observamos que a inibição dupla (CB-839 + etomoxir) provocou uma atenuação dos efeitos observados com o tratamento individual de CB-839 (atenuação de morte celular ou maior proliferação). Uma possível explicação para este resultado é que o uso de CB-839 pode desencadear o processo de autofagia nestas células, um dos principais processos catabólicos ativados pelas células como mecanismo de sobrevivência³⁰⁰. A autofagia é capaz de degradar diferentes componentes celulares,

incluindo lipídios (lipofagia) que podem ser direcionados para beta-oxidação²⁹⁰, como tentativa de estabelecer o balanço energético. Porém, a autofagia pode levar a morte celular por processos diferentes da apoptose³⁰¹. Nossa hipótese é que as linhagens sensíveis ao composto CB-839 morrem pelo processo de lipofagia, porém, ao bloquear a beta-oxidação com etomoxir, estas células reduzem este processo e as células conseguem reduzir a taxa de morte. De fato, dados do nosso grupo mostram que a linhagem MDA-MB-231 é capaz de ativar lipofagia quando submetida ao *knockdown* de *GLS* (dados não publicados), porém, para comprovar esta teoria, é necessário avaliar a autofagia nestas células após a inibição com etomoxir e o uso combinado dos dois inibidores. Outra hipótese é que a inibição da beta-oxidação pode provocar adaptação metabólica nas linhagens sensíveis e esta reprogramação é eficiente em aumentar a viabilidade destas células. Para comprovar esta hipótese precisaríamos de uma análise de fluxo metabólico, possibilitando conhecer o perfil metabolômico diferencial destas células quando submetidas aos diferentes tratamentos.

Em relação às linhagens resistentes, nós observamos um efeito combinado entre a inibição de glutaminase e de beta-oxidação tanto na proliferação (maior redução na proliferação em relação ao uso individual de cada inibidor) quanto nos processos de invasão/migração (maior redução nestes processos em relação ao uso individual de cada inibidor). Estes resultados sugerem que a beta-oxidação realmente é um dos mecanismos que garantem a progressão tumoral após inibição de *GLS*.

Nossos resultados evidenciam que a busca por compostos direcionados à inibição de beta-oxidação é essencial para o tratamento do câncer de mama TN. Camarda e colaboradores (2016)²⁴² mostraram que tumores de mama TN com alta expressão de *MYC* são mais dependentes da beta-oxidação como fonte energética. em nosso trabalho nós mostramos que tumores com altos níveis de *CPT2* e expressão de genes relacionados à beta-oxidação podem não ser responsivos a terapias anti-glutaminolíticas. Entretanto, especulamos que a terapia combinada com inibidores de *GLS* e beta-oxidação pode ser uma eficiente estratégia contra a progressão deste subtipo tumoral.

Por fim, buscando entender qual o mecanismo responsável pela reprogramação metabólica das linhagens resistentes, nós avaliamos o *status* de fosforilação de *AMPK* e *ACC*, além de medirmos os níveis de beta-oxidação em células submetidas ao *knockdown* de *AMPK*. A partir dessas análises, nós confirmamos que a reprogramação metabólica ocorre via ativação de *AMPK*. De fato, é bem estabelecido que em situações de privação de nutrientes e consequente estresse energético, as células tendem a reduzir atividades biossintéticas e dar preferência para atividades catabólicas que tem como finalidade a produção de *ATP* e regulação

energética. O sensor de estresse energético AMPK, apesar de ser conhecido classicamente como um supressor tumoral, pode também dar vantagem adaptativa para o desenvolvimentos dos tumores³⁰², dado que sua ativação pode ser importante para a manutenção da viabilidade celular em condições de depleção de glicose^{297,303} ou no direcionamento celular para um estado de quiescência em resposta a condições de hipóxia³⁰⁴.

Em adição a estes resultados, nós avaliamos qual poderia ser o papel do fator de transcrição c-MYC (também conhecido como MYC) na ativação da beta-oxidação de células resistentes. Esta proteína é descrita como importante na regulação do metabolismo tumoral^{127,305-308}, especialmente em câncer de mama triplo-negativo^{87,242}, subtipo de tumor com altos níveis deste fator de transcrição³⁰⁹⁻³¹¹. Em 2009, Gao e colaboradores³¹² mostraram que MYC é responsável pela expressão de glutaminase mitocondrial por seu papel como repressor de mir-23a e mir-23b, microRNAs que bloqueiam a tradução de GLS por se ligarem em seu mRNA. Por outro lado, outros trabalhos mostram que MYC controla positivamente o metabolismo de ácidos graxos^{246,313,314}. Em especial, Camarda e colaboradores (2016)²⁴² mostraram que pacientes de câncer TN com alta expressão de MYC possuem como assinatura metabólica o aumento da oxidação de ácidos graxos para manutenção bioenergética desses tumores. A partir das nossas análises, foi possível concluir que em tumores de mama TN, altos níveis de MYC estão realmente associados a maior dependência de beta-oxidação para proliferação celular, porém não encontramos evidências de relação entre níveis proteicos de MYC e expressão de *GLS*. De fato, Lukey e colaboradores (2016)³¹⁵ mostraram que, especificamente em câncer de mama, a expressão e atividade de glutaminase é relacionada ao fator de transcrição c-Jun, ativado via Rho GTPase. Outros trabalhos também mostraram que MYC não é responsável pela regulação do metabolismo de glutamina em câncer de mama^{87,316}, embora seja um importante regulador metabólico para este subtipo de tumor.

Embora nossos dados indiquem que o aumento de beta-oxidação é de um mecanismo de reprogramação metabólica que possibilita a sobrevivência de células resistente a CB-839, há a possibilidade que outros mecanismos sejam ativados em paralelo, ou sejam importantes para outro subconjunto de câncer TN. Nossos resultados apontam que a via de poliaminas pode sofrer alterações relacionadas à inibição de GLS. Poliaminas são cátions orgânicos com um ou mais grupamentos amina e apresentam função na regulação de proliferação e diferenciação celulares através de sua ligação ao DNA e RNA, modificação da estrutura de cromatina e interações DNA-proteínas³¹⁷⁻³¹⁹. Putrescina é inicialmente formada pela descarboxilação de ornitina (produto do ciclo da uréia) pela Ornitina Descarboxilase (*ODC*). Este metabólito pode ser convertido em espermidina pela adição de um grupo

aminopropil, que é derivado da descarboxilação de S-adenosilmetionina através da ação de S-adenosilmetionina descarboxilase (*AMD1*). A espermina é formada a partir de espermidina pelas mesmas reações. Uma vez que poliaminas são produto do ciclo da uréia, é esperado que alterações no metabolismo de glutamina afete estes metabólitos. A manutenção dos níveis de poliaminas intracelulares é importante para controle dos processos em que estão envolvidos. O processo catabólico destes metabólicos ocorre por acetilação catalisada pela enzima Spermidine/Spermine N1-acetiltransferase 1 (*SAT1*). O catabolismo de poliaminas é descrito como causador de perda de viabilidade e redução na proliferação celular³²⁰⁻³²². Mandal e colaboradores (2013)³²³ mostraram que a superexpressão de *SAT1* pode aumentar a taxa de conversão de espermina e espermidina em putrescina, causando uma depleção nos níveis dos primeiros metabólitos e um acúmulo de putrescina. Este perfil causou uma redução da tradução de proteínas e indução à morte, sugerindo que alta atividade de *SAT1* e depleção de seus substratos podem ser prejudiciais para a sobrevivência celular. Em outro trabalho, Mandal e colaboradores (2015)³²⁴ mostraram que o aumento no catabolismo de poliaminas causado pela superexpressão de *SAT1*, levou a um aumento de apoptose mediada pela mitocôndria em células embrionárias. Este perfil de abundância de poliaminas pode contribuir em estudos futuros sobre o efeito combinado da inibição do metabolismo de glutamina e de ácidos graxos em linhagens TN resistentes ao composto CB-839.

6. Conclusões e Perspectivas

A proposta inicial deste trabalho foi a de encontrar fontes anapleróticas ou energéticas alternativas à glutamina que explicassem a manutenção do fenótipo tumoral em linhagens de câncer de mama TN que se mostraram resistentes à retirada de glutamina do meio de cultura ou à inibição de glutaminase pelo composto CB-839. **A abordagem utilizada por nós foi eficiente em separar as 12 linhagens avaliadas em dois grupos (sensíveis e resistentes ao inibidor CB-839) e encontrar/comprovar que o metabolismo de lipídios é um dos caminhos utilizados pelas linhagens resistentes para adaptação metabólica.** Porém, não nos aprofundamos em conhecer o perfil global de alterações metabólicas provocadas pela inibição do metabolismo de glutamina. Nós realizamos uma análise de metabolômica por GC-MS apresentada neste trabalho e estamos trabalhando para melhorar nossas análises e tirarmos melhor proveito destes resultados que podem fornecer um quadro geral das alterações metabólicas que o bloqueio do metabolismo de glutamina pode causar em linhagens resistentes. Em adição a isso, nosso grupo de pesquisa pretende continuar estes estudos com uma análise de fluxo metabólico utilizando nutrientes marcados. Como estratégia, poderemos utilizar diferentes nutrientes marcados de diferentes vias (como glicólise, via das pentoses fosfatos e diversos aminoácidos) para avaliar quais sofrem desvios de rota para contribuir com a manutenção da viabilidade dessas células, possibilitando o estudo das vias que estão aumentadas e diminuídas e entender melhor como o ocorre o processo tumorigênico, em relação ao metabolismo, nestas linhagens.

Nós mostramos também que tumores de mama com baixa expressão de *GLS* apresentam expressão aumentada de genes relacionados à beta-oxidação e que pacientes com baixa expressão de *GLS* e aumento de expressão de *CPT1A* apresentam menor sobrevida. Embora nossas análises de transcriptômica tenham apresentado fortes evidências de que a beta-oxidação está aumentada em tumores com baixa expressão de *GLS*, nós vamos investigar esse processo em nível proteico. Para isso, utilizaremos dados de espectrometria de massas disponíveis de alguns destes tumores para avaliar se proteínas chaves para a oxidação mitocondrial de ácidos graxos estão com níveis aumentados nos tumores com baixa expressão de *GLS*.

Em relação às proteínas, **nós observamos que os níveis de *CPT2* podem ser usados como marcador para linhagens resistentes à inibição de *GLS*.** Utilizando dados de proteínas por espectrometria de massas, nós pretendemos avaliar se em tumores de pacientes *CPT2* também funciona como um marcador para resistência a terapias anti-glutaminolítica,

como o uso de CB-839. Além disso, pretendemos utilizar a técnica de imuno-histoquímica em amostras de tumores de pacientes para validar a correlação negativa entre níveis proteicos de GLS e CPT2.

Neste trabalho, **nós também mostramos que a inibição de GLS é capaz de provocar aumento da beta-oxidação nas linhagens TN resistentes e que a inibição farmacológica dupla (glutaminase por CB-839 e beta-oxidação por etomoxir) é capaz de reduzir níveis de ATP, proliferação, invasão e migração nestas linhagens.** Embora a inibição farmacológica seja aceita pela literatura como ferramenta para comprovar os efeitos da inibição, nós pretendemos realizar experimentos de proliferação, invasão e migração em células submetidas ao *knockdown* duplo de GLS e CPT1A/CPT2. Dessa maneira, poderemos validar que os efeitos observados pela inibição farmacológica realmente não estão relacionados a qualquer efeito *off-target* dos inibidores utilizados.

Por fim, nós concluímos a partir dos nossos resultados que **ativação de AMPK é responsável pela plasticidade metabólica encontrada em linhagens TN resistentes.**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(1):7-30. doi:10.3322/caac.21387.
2. Marmot MG, Altman DG, Cameron DA, Dewar JA, Thompson SG, Wilcox M. The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review. *Br J Cancer.* 2013;108(11):2205-2240. doi:10.1038/bjc.2013.177.
3. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2017. 2017:1-71. doi:10.1101/gad.1593107.
4. Wu Y, Zhang D, Kang S. Physical activity and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;137(3):869-882. doi:10.1007/s10549-012-2396-7.
5. Lahart IM, Metsios GS, Nevill AM, Carmichael AR. Physical activity, risk of death and recurrence in breast cancer survivors: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Acta Oncol (Madr).* 2015;54(5):635-654. doi:10.3109/0284186X.2014.998275.
6. Ligibel JA, Strickler HD. Obesity and Its Impact on Breast Cancer: Tumor Incidence, Recurrence, Survival, and Possible Interventions. *Am Soc Clin Oncol Educ B.* 2013;33:52-59. doi:10.1200/EdBook_AM.2013.33.52.
7. Khan S, Shukla S, Sinha S, Meeran SM. Role of adipokines and cytokines in obesity-associated breast cancer: Therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013;24(6):503-513. doi:10.1016/j.cytogfr.2013.10.001.
8. Candelaria NR, Weldon R, Muthusamy S, et al. Alcohol Regulates Genes that Are Associated with Response to Endocrine Therapy and Attenuates the Actions of Tamoxifen in Breast Cancer Cells. Das GM, ed. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145061. doi:10.1371/journal.pone.0145061.
9. Macacu A, Autier P, Boniol M, Boyle P. Active and passive smoking and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;154(2):213-224. doi:10.1007/s10549-015-3628-4.
10. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol.* 2012;13(11):1141-1151. doi:10.1016/S1470-2045(12)70425-4.
11. Opdahl S, Alsaker MDK, Janszky I, Romundstad PR, Vatten LJ. Joint effects of nulliparity and other breast cancer risk factors. *Br J Cancer.* 2011;105(5):731-736. doi:10.1038/bjc.2011.286.
12. Li CI, Daling JR, Haugen KL, Tang MTC, Porter PL, Malone KE. Use of menopausal hormone therapy and risk of ductal and lobular breast cancer among women 55–74 years of age. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;145(2):481-489. doi:10.1007/s10549-014-2960-4.
13. Dai X, Li T, Bai Z, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res.* 2015;5(10):2929-2943. www.ajcr.us.
14. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. *J Cancer.* 2016;7(10):1281-1294. doi:10.7150/jca.13141.
15. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-752. doi:10.1038/35021093.
16. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2011;5(1):5-23. doi:10.1016/j.molonc.2010.11.003.
17. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869-10874. doi:10.1073/pnas.191367098.
18. Gruvberger SK, Ringnér M, Edén P, et al. Expression profiling to predict outcome in breast cancer: the influence of sample selection. *Breast Cancer Res.* 2002;5(1):23. doi:10.1186/bcr548.
19. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002;415(6871):530-536. doi:10.1038/415530a.
20. Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol.* 2010;23(S2):S60-S64. doi:10.1038/modpathol.2010.33.
21. Bustreo S, Osella-Abate S, Cassoni P, et al. Optimal Ki67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;157(2):363-371. doi:10.1007/s10549-016-3817-9.
22. Inic Z, Zegarac M, Inic M, et al. Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. *Clin Med Insights Oncol.* September 2014:107. doi:10.4137/CMO.S18006.
23. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2009;101(10):736-750. doi:10.1093/jnci/djp082.
24. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(14):8418-8423. doi:10.1073/pnas.0932692100.
25. Creighton C. The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biol Targets Ther.* August 2012:289. doi:10.2147/BTT.S29923.

26. Loi S, Sotiriou C, Haibe-Kains B, et al. Gene expression profiling identifies activated growth factor signaling in poor prognosis (Luminal-B) estrogen receptor positive breast cancer. *BMC Med Genomics*. 2009;2(1):37. doi:10.1186/1755-8794-2-37.
27. Ciocca DR, Fanelli MA. Estrogen Receptors and Cell Proliferation in Breast Cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 1997;8(8):313-321. doi:10.1016/S1043-2760(97)00122-7.
28. Liao X-H, Lu D-L, Wang N, et al. Estrogen receptor α mediates proliferation of breast cancer MCF-7 cells via a p21/PCNA/E2F1-dependent pathway. *FEBS J*. 2014;281(3):927-942. doi:10.1111/febs.12658.
29. Anderson E. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res*. 2002;4(5):197-201. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/138744>.
30. Choi K-C. Treatment with bisphenol A and methoxychlor results in the growth of human breast cancer cells and alteration of the expression of cell cycle-related genes, cyclin D1 and p21, via an estrogen receptor-dependent signaling pathway. *Int J Mol Med*. February 2012. doi:10.3892/ijmm.2012.903.
31. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet*. 2005;365(9453):60-62. doi:10.1016/S0140-6736(04)17666-6.
32. Brueggemeier RW, Hackett JC, Diaz-Cruz ES. Aromatase Inhibitors in the Treatment of Breast Cancer. *Endocr Rev*. 2005;26(3):331-345. doi:10.1210/er.2004-0015.
33. Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Decker DA, Hortobagyi GN. Use of tamoxifen for breast cancer: twenty-eight years later. *J Clin Oncol*. 1995;13(2):513-529. doi:10.1200/JCO.1995.13.2.513.
34. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Tamoxifen for the prevention of breast cancer: Current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(22):1652-1662. doi:10.1093/jnci/dji372.
35. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2011;378(9793):771-784. doi:10.1016/S0140-6736(11)60993-8.
36. Davies C, Pan H, Godwin J, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet*. 2013;381(9869):805-816. doi:10.1016/S0140-6736(12)61963-1.
37. Cancer T, Atlas G. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. 2012:1-10. doi:10.1038/nature11412.
38. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-182. doi:3798106.
39. Schulze WX, Deng L, Mann M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol*. 2005;1(1):E1-E13. doi:10.1038/msb4100012.
40. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-6487. doi:10.1038/sj.onc.1210477.
41. Gutierrez C, Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(1):55-62. doi:10.1043/2010-0454-RAR.1.
42. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(7):505-516. doi:10.1038/nrm1962.
43. Goldenberg MM. Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Ther*. 1999;21(2):309-318. doi:10.1016/S0149-2918(00)88288-0.
44. Schroeder R, Stevens C, Sridhar J. Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors of ErbB2/HER2/Neu in the Treatment of Aggressive Breast Cancer. *Molecules*. 2014;19(9):15196-15212. doi:10.3390/molecules190915196.
45. Martin M, López-Tarruella S. Emerging Therapeutic Options for HER2-Positive Breast Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2016;36:e64-e70. doi:10.14694/EDBK_159167.
46. Ahmed S, Sami A, Xiang J. HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer*. 2015;22(2):101-116. doi:10.1007/s12282-015-0587-x.
47. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and Safety of Trastuzumab as a Single Agent in First-Line Treatment of HER2 -Overexpressing Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20(3):719-726. doi:10.1200/JCO.2002.20.3.719.
48. Nahta R, Esteva FJ. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett*. 2006;232(2):123-138. doi:10.1016/j.canlet.2005.01.041.
49. Spector N, Xia W, El-Hariry I, Yarden Y, Bacus S. HER2 therapy. Small molecule HER-2 tyrosine kinase inhibitors. *Breast Cancer Res*. 2007;9(2):205. doi:10.1186/bcr1652.
50. Alshareeda AT, Soria D, Garibaldi JM, et al. Characteristics of basal cytokeratin expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(1):23-37. doi:10.1007/s10549-013-2518-x.

51. Liu N, Yu Q, Liu TJ, et al. P-cadherin expression and basal-like subtype in breast cancers. *Med Oncol*. 2012;29(4):2606-2612. doi:10.1007/s12032-012-0218-8.
52. Lodillinsky C, Infante E, Guichard A, et al. p63/MT1-MMP axis is required for in situ to invasive transition in basal-like breast cancer. *Oncogene*. 2016;35(3):344-357. doi:10.1038/onc.2015.87.
53. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F, et al. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene*. 2006;25(15):2273-2284. doi:10.1038/sj.onc.1209254.
54. Skibinski A, Kuperwasser C. The origin of breast tumor heterogeneity. *Oncogene*. 2015;34(42):5309-5316. doi:10.1038/onc.2014.475.
55. Weigman VJ, Chao H-H, Shabalina AA, et al. Basal-like Breast cancer DNA copy number losses identify genes involved in genomic instability, response to therapy, and patient survival. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;133(3):865-880. doi:10.1007/s10549-011-1846-y.
56. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(10):955-960. doi:10.4161/cbt.10.10.13879.
57. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol*. 2011;24(2):157-167. doi:10.1038/modpathol.2010.200.
58. Smid M, Wang Y, Zhang Y, et al. Subtypes of Breast Cancer Show Preferential Site of Relapse. *Cancer Res*. 2008;68(9):3108-3114. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5644.
59. Luck AA, Evans AJ, Green AR, Rakha EA, Paish C, Ellis IO. The Influence of Basal Phenotype on the Metastatic Pattern of Breast Cancer. *Clin Oncol*. 2008;20(1):40-45. doi:10.1016/j.clon.2007.10.002.
60. Bertheau P, Lehmann-Che J, Varna M, et al. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *The Breast*. 2013;22:S27-S29. doi:10.1016/j.breast.2013.07.005.
61. Pires MM, Hopkins BD, Saal LH, Parsons RE. Alterations of EGFR, p53 and PTEN that mimic changes found in basal-like breast cancer promote transformation of human mammary epithelial cells. *Cancer Biol Ther*. 2013;14(3):246-253. doi:10.4161/cbt.23297.
62. Gauthier ML, Berman HK, Miller C, et al. Abrogated Response to Cellular Stress Identifies DCIS Associated with Subsequent Tumor Events and Defines Basal-like Breast Tumors. *Cancer Cell*. 2007;12(5):479-491. doi:10.1016/j.ccr.2007.10.017.
63. No Title. doi:doi.org/10.1371/journal.pbio.0020022.
64. Bai F, Chan HL, Scott A, et al. BRCA1 Suppresses Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem Cell Dedifferentiation during Mammary and Tumor Development. *Cancer Res*. 2014;74(21):6161-6172. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1119.
65. Liu X, Holstege H, van der Gulden H, et al. Somatic loss of BRCA1 and p53 in mice induces mammary tumors with features of human BRCA1-mutated basal-like breast cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(29):12111-12116. doi:10.1073/pnas.0702969104.
66. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007;8(5):R76. doi:10.1186/gb-2007-8-5-r76.
67. Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(5):R68. doi:10.1186/bcr2635.
68. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1160-1167. doi:10.1200/JCO.2008.18.1370.
69. Bernardi R, Gianni L. Hallmarks of triple negative breast cancer are emerging at last? *Nat Publ Gr*. 2014;1-2. doi:10.1038/cr.2014.61.
70. Kaplan HG, Malmgren JA. Impact of Triple Negative Phenotype on Breast Cancer Prognosis. *Breast J*. 2008;14(5):456-463. doi:10.1111/j.1524-4741.2008.00622.x.
71. Nakajima H, Ishikawa Y, Furuya M, et al. Protein expression, gene amplification, and mutational analysis of EGFR in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer*. 2014;21(1):66-74. doi:10.1007/s12282-012-0354-1.
72. Brand TM, Iida M, Dunn EF, et al. Nuclear epidermal growth factor receptor is a functional molecular target in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(5):1356-1368. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-1021.
73. Park HS, Jang MH, Kim EJ, et al. High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Mod Pathol*. 2014;27(9):1212-1222. doi:10.1038/modpathol.2013.251.
74. Peshkin BN, Alabek ML, Isaacs C. BRCA1/2 mutations and triple negative breast cancers. Eng-Wong J, Zujewski JA, eds. *Breast Dis*. 2011;32(1-2):25-33. doi:10.3233/BD-2010-0306.
75. Sohn J, Liu S, Parinyanitikul N, et al. cMET Activation and EGFR-Directed Therapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer. *J Cancer*. 2014;5(9):745-753. doi:10.7150/jca.9696.
76. Plummer R. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: a new direction for BRCA and triple-negative breast cancer? *Breast Cancer Res*. 2011;13(4):218. doi:10.1186/bcr2877.

77. Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev.* 2002;54(3):375-429. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12223530>.
78. Turner NC, Reis-Filho JS. Tackling the diversity of Triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(23):6380-6388. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0915.
79. Lehmann BD, Pietenpol JA. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. *J Pathol.* 2014;232(2):142-150. doi:10.1002/path.4280.
80. Lehmann BDB, Bauer J a J, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2750-2767. doi:10.1172/JCI45014.
81. Lee K-HH, Hsu E-CC, Guh J-HH, et al. Targeting energy metabolic and oncogenic signaling pathways in triple-negative breast cancer by a novel adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activator. *J Biol Chem.* 2011;286(45):39247-39258. doi:10.1074/jbc.M111.264598.
82. O'Toole S a, Beith JM, Millar EK, et al. Therapeutic targets in triple negative breast cancer. *J Clin Pathol.* 2013;66(6):530-542. doi:10.1136/jclinpath-2012-201361.
83. Noh S, Kim DH, Jung WH. Expression levels of serine / glycine metabolism-related proteins in triple negative breast cancer tissues. 2014:4457-4468. doi:10.1007/s13277-013-1588-z.
84. Cao MD, Lamichhane S, Lundgren S, et al. Metabolic characterization of triple negative breast cancer. *BMC Cancer.* 2014;14(1):941. doi:10.1186/1471-2407-14-941.
85. Shah T, Krishnamachary B, Wildes F, et al. HIF isoforms have divergent effects on invasion, metastasis, metabolism, and formation of lipid droplets. *Oncotarget.* 2015;5(29). doi:10.18632/oncotarget.4612.
86. Lim S-O, Li C-W, Xia W, et al. EGFR signaling enhances aerobic glycolysis in triple negative breast cancer cells to promote tumor growth and immune escape. *Cancer Res.* 2016. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2478.
87. Shen L, O'Shea JM, Kaadige MR, et al. Metabolic reprogramming in triple-negative breast cancer through Myc suppression of TXNIP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* April 2015:2-7. doi:10.1073/pnas.1501555112.
88. Fouqu?? A, Delalande O, Jean M, et al. A Novel Covalent mTOR Inhibitor, DHM25, Shows in Vivo Antitumor Activity against Triple-Negative Breast Cancer Cells. *J Med Chem.* 2015;58(16):6559-6573. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00991.
89. Farabegoli F, Vettraino M, Manerba M, Fiume L, Roberti M, Di Stefano G. Galloflavin, a new lactate dehydrogenase inhibitor, induces the death of human breast cancer cells with different glycolytic attitude by affecting distinct signaling pathways. *Eur J Pharm Sci.* 2012;47(4):729-738. doi:10.1016/j.ejps.2012.08.012.
90. Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
91. Almuhaideb A, Papathanasiou N, Bomanji J. 18 F-FDG PET/CT imaging in oncology. *Ann Saudi Med.* 2011;31(1):3. doi:10.4103/0256-4947.75771.
92. Koo HR, Park JS, Kang KW, Han W, Park IA, Moon WK. Correlation between 18F-FDG uptake on PET/CT and prognostic factors in triple-negative breast cancer. *Eur Radiol.* 2015;25(11):3314-3321. doi:10.1007/s00330-015-3734-z.
93. Zhu A, Lee D, Shim H. Metabolic Positron Emission Tomography Imaging in Cancer Detection and Therapy Response. *Semin Oncol.* 2011;38(1):55-69. doi:10.1053/j.seminoncol.2010.11.012.
94. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell.* 2008;134(5):703-707. doi:10.1016/j.cell.2008.08.021.
95. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009;324(5930):1029-1033. doi:10.1126/science.1160809.
96. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008;7(1):11-20. doi:10.1016/j.cmet.2007.10.002.
97. Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(8):347-354. doi:10.1016/j.tibs.2014.06.005.
98. Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(7):969-980. doi:10.1016/j.biocel.2010.02.005.
99. Dell' Antone P. Energy metabolism in cancer cells: how to explain the Warburg and Crabtree effects? *Med Hypotheses.* 2012;79(3):388-392. doi:10.1016/j.mehy.2012.06.002.
100. Demaria M, Poli V. PKM2, STAT3 and HIF-1 a. 2012;1(3):194-196.
101. Wong N, Melo J De, Tang D. PKM2 , a Central Point of Regulation in Cancer Metabolism. 2013;2013(Figure 1).
102. Luo W, Semenza GL. Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(11):560-566. doi:10.1016/j.tem.2012.06.010.
103. Filipp F V. Cancer metabolism meets systems biology: Pyruvate kinase isoform PKM2 is a metabolic

- master regulator. *J Carcinog*. 2013;12:14. doi:10.4103/1477-3163.115423.
104. Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, et al. The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*. 2009;8(23):3984-4001. doi:10.4161/cc.8.23.10238.
 105. Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW. The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function. *J Biol Chem*. 2002;277(34):30409-30412. doi:10.1074/jbc.R200006200.
 106. Guay C, Madiraju SRM, Aumais A, et al. A role for ATP-citrate lyase, malic enzyme, and pyruvate/citrate cycling in glucose-induced insulin secretion. *J Biol Chem*. 2007;282(49):35657-35665. doi:10.1074/jbc.M707294200.
 107. Icard P, Poulain L, Lincet H. Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1825(1):111-116. doi:10.1016/j.bbcan.2011.10.007.
 108. Jungas RL, Halperin ML, Brosnan JT. Quantitative analysis of amino acid oxidation and related gluconeogenesis in humans. *Physiol Rev*. 1992;72(2):419-448. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1557428>.
 109. Ochoa-Ruiz E. Anaplerosis in cancer: Another step beyond the warburg effect. *Am J Mol Biol*. 2012;2(4):291-303. doi:10.4236/ajmb.2012.24031.
 110. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(49):19345-19350. doi:10.1073/pnas.0709747104.
 111. Saqceena M, Mukhopadhyay S, Hosny C, Alhamed A, Chatterjee A, Foster DA. Blocking anaplerotic entry of glutamine into the TCA cycle sensitizes K-Ras mutant cancer cells to cytotoxic drugs. *Oncogene*. 2015;34(20):2672-2680. doi:10.1038/onc.2014.207.
 112. Gross MI, Demo SD, Dennison JB. Antitumor Activity of the Glutaminase Inhibitor CB-839 in Triple-Negative Breast Cancer. 2014:890-901. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0870.
 113. Sellers K, Fox MP, Bousamra M, et al. Pyruvate carboxylase is critical for non-small-cell lung cancer proliferation. *J Clin Invest*. 2015;125(2):687-698. doi:10.1172/JCI72873.
 114. Christen S, Lorendeau D, Schmieder R, et al. Breast Cancer-Derived Lung Metastases Show Increased Pyruvate Carboxylase-Dependent Anaplerosis. *Cell Rep*. 2016;17(3):837-848. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.042.
 115. Phannasil P, Ansari IH, El Azzouny M, et al. Mass spectrometry analysis shows the biosynthetic pathways supported by pyruvate carboxylase in highly invasive breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2017;1863(2):537-551. doi:10.1016/j.bbdis.2016.11.021.
 116. Phannasil P, Thuwajit C, Warnnissorn M, Wallace JC, MacDonald MJ, Jitrapakdee S. Pyruvate Carboxylase Is Up-Regulated in Breast Cancer and Essential to Support Growth and Invasion of MDA-MB-231 Cells. Singh PK, ed. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129848. doi:10.1371/journal.pone.0129848.
 117. Reed MAC, Ludwig C, Bunce CM, Khanim FL, Günther UL. Malonate as a ROS product is associated with pyruvate carboxylase activity in acute myeloid leukaemia cells. *Cancer Metab*. 2016;4(1):15. doi:10.1186/s40170-016-0155-7.
 118. Izquierdo-Garcia JL, Cai LM, Chaumeil MM, et al. Glioma Cells with the IDH1 Mutation Modulate Metabolic Fractional Flux through Pyruvate Carboxylase. Scemes E, ed. *PLoS One*. 2014;9(9):e108289. doi:10.1371/journal.pone.0108289.
 119. Daye D, Wellen KE. Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2012;23(4):362-369. doi:10.1016/j.semcdb.2012.02.002.
 120. Le A, Lane AN, Hamaker M, et al. Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab*. 2012;15(1):110-121. doi:10.1016/j.cmet.2011.12.009.
 121. Szeliga M, Obara-Michlewska M. Glutamine in neoplastic cells: Focus on the expression and roles of glutaminases. *NeurochemInt*. 2009;55(1-3):71-75. doi:10.1016/j.neuint.2009.01.008.
 122. No Title. doi:10.1016/j.canlet.2017.04.029.
 123. Bolzoni M, Chiu M, Accardi F, et al. Dependence on glutamine uptake and glutamine addiction characterize myeloma cells: a new attractive target. *Blood*. 2016;128(5):667-679. doi:10.1182/blood-2016-01-690743.
 124. Wang Q, Hardie R-A, Hoy AJ, et al. Targeting ASCT2-mediated glutamine uptake blocks prostate cancer growth and tumour development. *J Pathol*. 2015;236(3):278-289. doi:10.1002/path.4518.
 125. van Geldermalsen M, Wang Q, Nagarajah R, et al. ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer. *Oncogene*. 2016;35(24):3201-3208. doi:10.1038/onc.2015.381.
 126. Timmerman LA, Holton T, Yuneva M, et al. Glutamine sensitivity analysis identifies the xCT antiporter as a common triple-negative breast tumor therapeutic target. *Cancer Cell*. 2013;24(4):450-465. doi:10.1016/j.ccr.2013.08.020.

127. Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(48):18782-18787. doi:10.1073/pnas.0810199105.
128. Gatenby R a, Gawlinski ET, Gmitro AF, Kaylor B, Gillies RJ. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res*. 2006;66(10):5216-5223. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4193.
129. Seltzer MJ, Bennett BD, Joshi AD, et al. Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Res*. 2010;70(22):8981-8987. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1666.
130. Pei Y, Liu KW, Wang J, et al. HDAC and PI3K Antagonists Cooperate to Inhibit Growth of MYC-Driven Medulloblastoma. *Cancer Cell*. 2016;29(3):311-323. doi:10.1016/j.ccell.2016.02.011.
131. Erickson JW, Cerione RA. Glutaminase: A Hot Spot For Regulation Of Cancer Cell Metabolism? *Oncotarget*. 2010;1(8):734-740. doi:10.18632/oncotarget.208.
132. Mullen AR, Wheaton WW, Jin ES, et al. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature*. 2012;481(7381):385-388. doi:10.1038/nature10642.
133. Mullen AR, Hu Z, Shi X, et al. Oxidation of Alpha-Ketoglutarate Is Required for Reductive Carboxylation in Cancer Cells with Mitochondrial Defects. *Cell Rep*. 2014;7(5):1679-1690. doi:10.1016/j.celrep.2014.04.037.
134. Yoo H, Antoniewicz MR, Stephanopoulos G, Kelleher JK. Quantifying Reductive Carboxylation Flux of Glutamine to Lipid in a Brown Adipocyte Cell Line. *J Biol Chem*. 2008;283(30):20621-20627. doi:10.1074/jbc.M706494200.
135. Metallo CM, Gameiro P a, Bell EL, et al. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*. 2012;481(7381):380-384. doi:10.1038/nature10602.
136. Jiang L, Shestov AA, Swain P, et al. Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth. *Nature*. 2016;532(7598):255-258. doi:10.1038/nature17393.
137. Durán R V, Oppliger W, Robitaille AM, et al. Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Mol Cell*. 2012;47(3):349-358. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.043.
138. Jewell JL, Kim YC, Russell RC, et al. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. *Science*. 2015;347(6218):194-198. doi:10.1126/science.1259472.
139. Lora J, Alonso FJ, Segura J a, Lobo C, Márquez J, Matés JM. Antisense glutaminase inhibition decreases glutathione antioxidant capacity and increases apoptosis in Ehrlich ascitic tumour cells. *Eur J Biochem*. 2004;271(21):4298-4306. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04370.x.
140. Donadio AC, Lobo C, Tosina M, et al. Antisense glutaminase inhibition modifies the O-GlcNAc pattern and flux through the hexosamine pathway in breast cancer cells. *J Cell Biochem*. 2008;103(3):800-811. doi:10.1002/jcb.21449.
141. Dang C V. Glutaminolysis: Supplying carbon or nitrogen, or both for cancer cells? *Cell Cycle*. 2010;9(19):3884-3886. doi:10.4161/cc.9.19.13302.
142. Hosios AM, Hecht VC, Danai L V., et al. Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. *Dev Cell*. 2016;36(5):540-549. doi:10.1016/j.devcel.2016.02.012.
143. Gaglio D, Soldati C, Vanoni M, Alberghina L, Chiaradonna F. Glutamine deprivation induces abortive S-phase rescued by deoxyribonucleotides in K-ras transformed fibroblasts. *PLoS One*. 2009;4(3). doi:10.1371/journal.pone.0004715.
144. Colombo SL, Palacios-Callender M, Frakich N, et al. Molecular basis for the differential use of glucose and glutamine in cell proliferation as revealed by synchronized HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(52):21069-21074. doi:10.1073/pnas.1117500108.
145. No Title. doi:doi.org/10.1016/j.cmet.2016.03.001.
146. Marsboom G, Zhang G-F, Pohl-Avila N, et al. Glutamine Metabolism Regulates the Pluripotency Transcription Factor OCT4. *Cell Rep*. 2016;16(2):323-332. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.089.
147. Ryu JM, Lee SH, Seong JK, Han HJ. Glutamine contributes to maintenance of mouse embryonic stem cell self-renewal through PKC-dependent downregulation of HDAC1 and DNMT1/3a. *Cell Cycle*. 2015;14(20):3292-3305. doi:10.1080/15384101.2015.1087620.
148. Li D, Fu Z, Chen R, et al. Inhibition of glutamine metabolism counteracts pancreatic cancer stem cell features and sensitizes cells to radiotherapy. *Oncotarget*. 2015;6(31):31151-31163. doi:10.18632/oncotarget.5150.
149. Carey BW, Finley LWS, Cross JR, Allis CD, Thompson CB. Intracellular α -ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*. 2014;518(7539):413-416. doi:10.1038/nature13981.
150. Oburoglu L, Tardito S, Fritz V, et al. Glucose and Glutamine Metabolism Regulate Human Hematopoietic Stem Cell Lineage Specification. *Cell Stem Cell*. 2014;15(2):169-184. doi:10.1016/j.stem.2014.06.002.
151. Tohyama S, Fujita J, Hishiki T, et al. Glutamine Oxidation Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Metab*. 2016;23(4):663-674. doi:10.1016/j.cmet.2016.03.001.
152. Márquez J, de la Oliva ARL, Matés JM, Segura J a, Alonso FJ. Glutaminase: a multifaceted protein not

- only involved in generating glutamate. *Neurochem Int.* 2006;48(6-7):465-471. doi:10.1016/j.neuint.2005.10.015.
153. Curthoys NP, Kuhlenschmidt T, Godfrey SS, Weiss RF. Phosphate-dependent glutaminase from rat kidney. Cause of increased activity in response to acidosis and identity with glutaminase from other tissues. *Arch Biochem Biophys.* 1976;172(1):162-167. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1252072>.
 154. Elgadi KM, Meguid R a, Qian M, Souba WW, Abcouwer SF. Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiol Genomics.* 1999;1(2):51-62. doi:11015561.
 155. Aledo JC, Gómez-Fabre PM, Olalla L, Márquez J. Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes. *Mamm Genome.* 2000;11(12):1107-1110. doi:11130979.
 156. Robinson MM, McBryant SJ, Tsukamoto T, et al. Novel mechanism of inhibition of rat kidney-type glutaminase by bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES). *Biochem J.* 2007;406(3):407-414. doi:10.1042/BJ20070039.
 157. Yuan L, Sheng X, Clark LH, et al. Glutaminase inhibitor compound 968 inhibits cell proliferation and sensitizes paclitaxel in ovarian cancer. *Am J Transl Res.* 2016;8(10):4265-4277. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27830010>.
 158. McDermott LA, Iyer P, Verneti L, et al. Design and evaluation of novel glutaminase inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2016;24(8):1819-1839. doi:10.1016/j.bmc.2016.03.009.
 159. Han T, Guo M, Zhang T, Gan M, Xie C, Wang J-B. A novel glutaminase inhibitor-968 inhibits the migration and proliferation of non-small cell lung cancer cells by targeting EGFR/ERK signaling pathway. *Oncotarget.* April 2017. doi:10.18632/oncotarget.14188.
 160. Ferreira APS, Cassago A, Gonçalves K de A, et al. Active Glutaminase C Self-assembles into a Supratetrameric Oligomer That Can Be Disrupted by an Allosteric Inhibitor. *J Biol Chem.* 2013;288(39):28009-28020. doi:10.1074/jbc.M113.501346.
 161. Elgogary A, Xu Q, Poore B, et al. Combination therapy with BPTES nanoparticles and metformin targets the metabolic heterogeneity of pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(36):E5328-E5336. doi:10.1073/pnas.1611406113.
 162. DeMichele A, Harding JJ, Telli ML, Munster P, McKay R, Iliopoulos O, Whiting SH, Orford KW, Bennett MK, Mier JW, Owonikoko TK, Patel MR, Kalinsky K, Carvajal RD II and M-BF. Study of CB-839 in Combination w/ Paclitaxel in Patients of African Ancestry and Non-African Ancestry With Advanced TNBC. 2017. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02071862>.
 163. Chakrabarti G, Moore ZR, Luo X, et al. Targeting glutamine metabolism sensitizes pancreatic cancer to PARP-driven metabolic catastrophe induced by β -lapachone. *Cancer Metab.* 2015;3(February 2016):12. doi:10.1186/s40170-015-0137-1.
 164. Jacque N, Ronchetti AM, Larrue C, et al. Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. *Blood.* 2015;126(11):1346-1356. doi:10.1182/blood-2015-01-621870.
 165. Momcilovic M, Bailey ST, Lee JT, et al. Targeted Inhibition of EGFR and Glutaminase Induces Metabolic Crisis in EGFR Mutant Lung Cancer. *Cell Rep.* 2017;18(3):601-610. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.061.
 166. Matre P, Velez J, Jacamo R, et al. Inhibiting glutaminase in acute myeloid leukemia: metabolic dependency of selected AML subtypes. *Oncotarget.* October 2016. doi:10.18632/oncotarget.12944.
 167. Romero-García S, Lopez-Gonzalez JS, Báez-Viveros JL, Aguilar-Cazares D, Prado-García H. Tumor cell metabolism: an integral view. *Cancer Biol Ther.* 2011;12(11):939-948. doi:10.4161/cbt.12.11.18140.
 168. Santos CR, Schulze A. Lipid metabolism in cancer. *FEBS J.* 2012;279(15):2610-2623. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x.
 169. Elmendorf JS. Fretting about fat: a new look at the lipid droplet surface and the roundabout role of Plin2 in cellular lipid storage. Focus on “Direct interaction of Plin2 with lipids on the surface of lipid droplets: a live cell FRET analysis.” *AJP Cell Physiol.* 2012;303(7):C713-C714. doi:10.1152/ajpcell.00250.2012.
 170. Liu K, Czaja MJ. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death Differ.* 2012;20(1):3-11. doi:10.1038/cdd.2012.63.
 171. Farese R V., Walther TC. Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T. *Cell.* 2009;139(5):855-860. doi:10.1016/j.cell.2009.11.005.
 172. LYNEN F. Acetyl coenzyme A and the fatty acid cycle. *Harvey Lect.* 48:210-244. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13142486>.
 173. David L Nelson MMC. *Principles of Biochemistry.* 5th ed.; 2008.
 174. Park JH, Vithayathil S, Kumar S, et al. Fatty Acid Oxidation-Driven Src Links Mitochondrial Energy Reprogramming and Oncogenic Properties in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Rep.* 2016;14(9):2154-2165. doi:10.1016/j.celrep.2016.02.004.
 175. Hermanova I, Arruabarrena-Aristorena A, Valis K, et al. Pharmacological inhibition of fatty-acid oxidation synergistically enhances the effect of l-asparaginase in childhood ALL cells. *Leukemia.*

- 2016;30(1):209-218. doi:10.1038/leu.2015.213.
176. Rodríguez-Enríquez S, Hernández-Esquivel L, Marín-Hernández A, et al. Mitochondrial free fatty acid β -oxidation supports oxidative phosphorylation and proliferation in cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;65(1):209-221. doi:10.1016/j.biocel.2015.06.010.
 177. Porporato PE, Payen VL, Baselet B, Sonveaux P. Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 2: Mitochondria, lipid and amino acid metabolism. *Cell Mol Life Sci.* 2015. doi:10.1007/s00018-015-2100-2.
 178. Padanad MS, Konstantinidou G, Venkateswaran N, et al. Fatty Acid Oxidation Mediated by Acyl-CoA Synthetase Long Chain 3 Is Required for Mutant KRAS Lung Tumorigenesis. *Cell Rep.* 2016;16(6):1614-1628. doi:10.1016/j.celrep.2016.07.009.
 179. Bartolacci C, Padanad M, Andreani C, et al. Fatty Acid Synthase Is a Therapeutic Target in Mutant KRAS Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2017;12(8):S1538. doi:10.1016/j.jtho.2017.06.030.
 180. Nomura DK, Long JZ, Niessen S, Hoover HS, Ng S-W, Cravatt BF. Monoacylglycerol Lipase Regulates a Fatty Acid Network that Promotes Cancer Pathogenesis. *Cell.* 2010;140(1):49-61. doi:10.1016/j.cell.2009.11.027.
 181. Nath A, Chan C. Genetic alterations in fatty acid transport and metabolism genes are associated with metastatic progression and poor prognosis of human cancers. *Sci Rep.* 2016;6(1):18669. doi:10.1038/srep18669.
 182. Kim H-Y, Lee K-M, Kim S-H, Kwon Y-J, Chun Y-J, Choi H-K. Comparative metabolic and lipidomic profiling of human breast cancer cells with different metastatic potentials. *Oncotarget.* 2016;7(41):67111-67128. doi:10.18632/oncotarget.11560.
 183. Zhang F, Du G. Dysregulated lipid metabolism in cancer. *World J Biol Chem.* 2012;3(8):167-174. doi:10.4331/wjbc.v3.i8.167.
 184. Zhang H, Badur MG, Divakaruni AS, et al. Distinct Metabolic States Can Support Self-Renewal and Lipogenesis in Human Pluripotent Stem Cells under Different Culture Conditions. *Cell Rep.* 2016;16(6):1536-1547. doi:10.1016/j.celrep.2016.06.102.
 185. Abdel-Magid AF. Fatty Acid Synthase (FASN) Inhibitors as Potential Treatment for Cancer, Obesity, and Liver Related Disorders. *ACS Med Chem Lett.* 2015;6(8):838-839. doi:10.1021/acsmchemlett.5b00275.
 186. Kridel SJ, Lowther WT, Pemble IV CW. Fatty acid synthase inhibitors: new directions for oncology. *Expert Opin Investig Drugs.* 2007;16(11):1817-1829. doi:10.1517/13543784.16.11.1817.
 187. Mullen GE, Yet L. Progress in the development of fatty acid synthase inhibitors as anticancer targets. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015;25(20):4363-4369. doi:10.1016/j.bmcl.2015.08.087.
 188. Little JL, Wheeler FB, Fels DR, Koumenis C, Kridel SJ. Inhibition of Fatty Acid Synthase Induces Endoplasmic Reticulum Stress in Tumor Cells. *Cancer Res.* 2007;67(3):1262-1269. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1794.
 189. Fritz V, Benfodda Z, Henriquet C, et al. Metabolic intervention on lipid synthesis converging pathways abrogates prostate cancer growth. *Oncogene.* 2013;32(42):5101-5110. doi:10.1038/onc.2012.523.
 190. Bandyopadhyay S, Zhan R, Wang Y, et al. Mechanism of Apoptosis Induced by the Inhibition of Fatty Acid Synthase in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 2006;66(11):5934-5940. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3197.
 191. Feron O. Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol.* 2009;92(3):329-333. doi:10.1016/j.radonc.2009.06.025.
 192. Gleason CE, Lu D, Witters LA, Newgard CB, Birnbaum MJ. The role of AMPK and mTOR in nutrient sensing in pancreatic ??-cells. *J Biol Chem.* 2007;282(14):10341-10351. doi:10.1074/jbc.M610631200.
 193. Xu J, Ji J, Yan X-H. Cross-Talk between AMPK and mTOR in Regulating Energy Balance. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2012;52(5):373-381. doi:10.1080/10408398.2010.500245.
 194. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 20):3589-3594. doi:10.1242/jcs.051011.
 195. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell.* 2007;12(1):9-22. doi:10.1016/j.ccr.2007.05.008.
 196. Ye J, Mancuso A, Tong X, Ward PS, Fan J, Rabinowitz JD. Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. 2012:2-7. doi:10.1073/pnas.1204176109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1204176109.
 197. Csibi A, Fendt S-M, Li C, et al. The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. *Cell.* 2013;153(4):840-854. doi:10.1016/j.cell.2013.04.023.
 198. Oh WJ, Jacinto E. mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle.* 2011;10(14):2305-2316. doi:10.4161/cc.10.14.16586.
 199. Carling D, Thornton C, Woods A, Sanders MJ. AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles? *Biochem J.* 2012;445(1):11-27. doi:10.1042/BJ20120546.
 200. Hardie DG. AMP-activated protein kinase-an energy sensor that regulates all aspects of cell function.

- Genes Dev.* 2011;25(18):1895-1908. doi:10.1101/gad.17420111.
201. Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade - A unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci.* 2004;29(1):18-24. doi:10.1016/j.tibs.2003.11.005.
 202. Hawley S a, Boudeau J, Reid JL, et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol.* 2003;2(4):28. doi:10.1186/1475-4924-2-28.
 203. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, et al. LKB1 Is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade. *Curr Biol.* 2003;13(22):2004-2008. doi:10.1016/j.cub.2003.10.031.
 204. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, et al. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-?? is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* 2005;2(1):9-19. doi:10.1016/j.cmet.2005.05.009.
 205. Woods A, Dickerson K, Heath R, et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase- β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.* 2005;2(1):21-33. doi:10.1016/j.cmet.2005.06.005.
 206. Hudson ER, Pan DA, James J, et al. A Novel Domain in AMP-Activated Protein Kinase Causes Glycogen Storage Bodies Similar to Those Seen in Hereditary Cardiac Arrhythmias. *Curr Biol.* 2003;13(10):861-866. doi:10.1016/S0960-9822(03)00249-5.
 207. Bateman A. The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem Sci.* 1997;22(1):12-13. doi:10.1016/S0968-0004(96)30046-7.
 208. Sengupta, Shomit Timothy R. Peterson TR, Sabatini D. NIH Public Access. *Mol Cell.* 2011;40(2):310-322. doi:doi:10.1016/j.molcel.2010.09.026.
 209. Morita M, Gravel SP, Ch??nard V, et al. mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab.* 2013;18(5):698-711. doi:10.1016/j.cmet.2013.10.001.
 210. Lamming DW, Sabatini DM. A Central Role for mTOR in Lipid Homeostasis. *Cell Metab.* 2013;18(4):465-469. doi:10.1016/j.cmet.2013.08.002.
 211. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell.* 2009;136(3):521-534. doi:10.1016/j.cell.2008.11.044.
 212. Kwon G, Marshall CA, Pappan KL, Remedi MS, McDaniel ML. Signaling elements involved in the metabolic regulation of mTOR by nutrients, incretins, and growth factors in islets. *Diabetes.* 2004;53(SUPPL. 3). doi:10.2337/diabetes.53.suppl_3.S225.
 213. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan K-L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol.* 2002;4(9):648-657. doi:10.1038/ncb839.
 214. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 2008;30(2):214-226. doi:10.1016/j.molcel.2008.03.003.AMPK.
 215. Bridges D, Moorhead GBG. 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE.* 2005;2005(296):re10. doi:10.1126/stke.2962005re10.
 216. Garami A, Zwartkruis FJT, Nobukuni T, et al. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell.* 2003;11(6):1457-1466. doi:10.1016/S1097-2765(03)00220-X.
 217. Park SH, Gammon SR, Knippers JD, Paulsen SR, Rubink DS, Winder WW. Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle. *J Appl Physiol.* 2002;92(6):2475-2482. doi:10.1152/jappphysiol.00071.2002.
 218. Donaldson WE. Regulation of fatty acid synthesis. *Fed Proc.* 1979;38(12):2617-2621. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/40828>.
 219. Fullerton MD, Galic S, Marcinko K, et al. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nat Med.* 2013;19(12):1649-1654. doi:10.1038/nm.3372.
 220. Herms A, Bosch M, Reddy BJN, et al. AMPK activation promotes lipid droplet dispersion on deetyrosinated microtubules to increase mitochondrial fatty acid oxidation. *Nat Commun.* 2015;6(May):7176. doi:10.1038/ncomms8176.
 221. Zaugg K, Yao Y, Reilly PT, et al. Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev.* 2011;25(1):1041-1051. doi:10.1101/gad.1987211.Freely.
 222. Lazennec G, Canaple L, Saugy D, Wahli W. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Mol Endocrinol.* 2000;14(12):1962-1975. doi:10.1210/mend.14.12.0575.
 223. Cheng T, Sudderth J, Yang C, Mullen AR, Jin ES, Matés JM. Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. 2011. doi:10.1073/pnas.1016627108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1016627108.

224. Maddocks ODK, Berkers CR, Mason SM, et al. Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature*. 2012;493(7433):542-546. doi:10.1038/nature11743.
225. Xu R, Pelicano H, Zhou Y. Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells : A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and Hypoxia Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells : A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mi. 2005:613-621.
226. Pelicano H, Martin DS, Xu R-H, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*. 2006;25(34):4633-4646. doi:10.1038/sj.onc.1209597.
227. Lee Y-Z, Yang C-W, Chang H-Y, et al. Discovery of selective inhibitors of Glutaminase-2, which inhibit mTORC1, activate autophagy and inhibit proliferation in cancer cells. *Oncotarget*. 2014;5(15):6087-6101.
228. Zadra G, Photopoulos C, Tyekucheva S, et al. A novel direct activator of AMPK inhibits prostate cancer growth by blocking lipogenesis. *EMBO Mol Med*. 2014;6(4):519-538. doi:10.1002/emmm.201302734.
229. Bhola NE, Jansen VM, Koch JP, et al. Treatment of Triple Negative Breast Cancer With TORC1/2 Inhibitors Sustains a Drug-resistant and Notch-dependent Cancer Stem Cell Population. *Cancer Res*. 2015;76(2):0008-5472.CAN-15-1640-T-. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1640-T.
230. Fong CY, Gilan O, Lam EYN, et al. BET inhibitor resistance emerges from. 2015. doi:10.1038/nature14888.
231. Douglas DN, Pu CH, Lewis JT, et al. Oxidative stress attenuates lipid synthesis and increases mitochondrial fatty acid oxidation in hepatoma cells infected with hepatitis C virus. *J Biol Chem*. 2016;291(4):1974-1990. doi:10.1074/jbc.M115.674861.
232. Schönfeld P, Wieckowski MR, Lebidzińska M, Wojtczak L. Mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative stress: Lack of reverse electron transfer-associated production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2010;1797(6-7):929-938. doi:10.1016/j.bbabi.2010.01.010.
233. Zaugg, K., Yao, Y., Reilly, P. T., Kannan, K., Kiarash, R., Mason, J. Huang, P., Sawyer, S. K., Fuerth, B., Faubert, B., Elia, A., Luo, X., Nadeem, V., Bungard, D., Yalavarthi, S., Growney, J. D., Wakeham, A., Moolani, Y., Silvester, J., Ten, A. Y., Bakke MO. Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev*. 2011;25(1):1041-1051. doi:10.1101/gad.1987211.Freely.
234. Stäubert C, Bhuiyan H, Lindahl A, et al. Rewired Metabolism in Drug-resistant Leukemia Cells. *J Biol Chem*. 2015;290(13):8348-8359. doi:10.1074/jbc.M114.618769.
235. McClelland ML, Adler AS, Shang Y, et al. An integrated genomic screen identifies LDHB as an essential gene for triple-negative breast cancer. *Cancer Res*. 2012;72(22):5812-5823. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1098.
236. Laderoute KR, Caloagan JM, Chao WR, et al. 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) supports the growth of aggressive experimental human breast cancer tumors. *J Biol Chem*. 2014;289(33):22850-22864. doi:10.1074/jbc.M114.576371.
237. Pelicano H, Zhang W, Liu J, et al. Mitochondrial dysfunction in some triple-negative breast cancer cell lines: role of mTOR pathway and therapeutic potential. *Breast Cancer Res*. 2014;16(5):434. doi:10.1186/s13058-014-0434-6.
238. Doyen J, Trastour C, Ettore F, et al. Expression of the hypoxia-inducible monocarboxylate transporter MCT4 is increased in triple negative breast cancer and correlates independently with clinical outcome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;451(1):54-61. doi:10.1016/j.bbrc.2014.07.050.
239. Blomme A, Costanza B, de Tullio P, et al. Myoferlin regulates cellular lipid metabolism and promotes metastases in triple-negative breast cancer. *Oncogene*. 2017;36(15):2116-2130. doi:10.1038/onc.2016.369.
240. Powell CA, Nasser MW, Zhao H, et al. Fatty acid binding protein 5 promotes metastatic potential of triple negative breast cancer cells through enhancing epidermal growth factor receptor stability. *Oncotarget*. 2015;6(8):6373-6385. doi:10.18632/oncotarget.3442.
241. Carracedo A, Weiss D, Leliaert AK, et al. A metabolic prosurvival role for PML in breast cancer. *J Clin Invest*. 2012;122(9):3088-3100. doi:10.1172/JCI62129DS1.
242. Camarda R, Zhou AY, Kohnz RA, et al. Inhibition of fatty acid oxidation as a therapy for MYC-overexpressing triple-negative breast cancer. *Nat Med*. 2016;22(4):427-432. doi:10.1038/nm.4055.
243. Louie SM, Grossman EA, Crawford LA, et al. GSTP1 Is a Driver of Triple-Negative Breast Cancer Cell Metabolism and Pathogenicity. *Cell Chem Biol*. 2016;23(5):567-578. doi:10.1016/j.chembiol.2016.03.017.
244. Wright HJ, Hou J, Xu B, Cortez M, Potma EO, Tromberg BJ. CDCP1 drives triple-negative breast cancer metastasis through reduction of lipid-droplet abundance and stimulation of fatty acid oxidation. 2017:1-10. doi:10.1073/pnas.1703791114.
245. Rambold AS, Cohen S, Lippincott-Schwartz J. Fatty acid trafficking in starved cells: Regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev Cell*. 2015;32(6):678-692. doi:10.1016/j.devcel.2015.01.029.

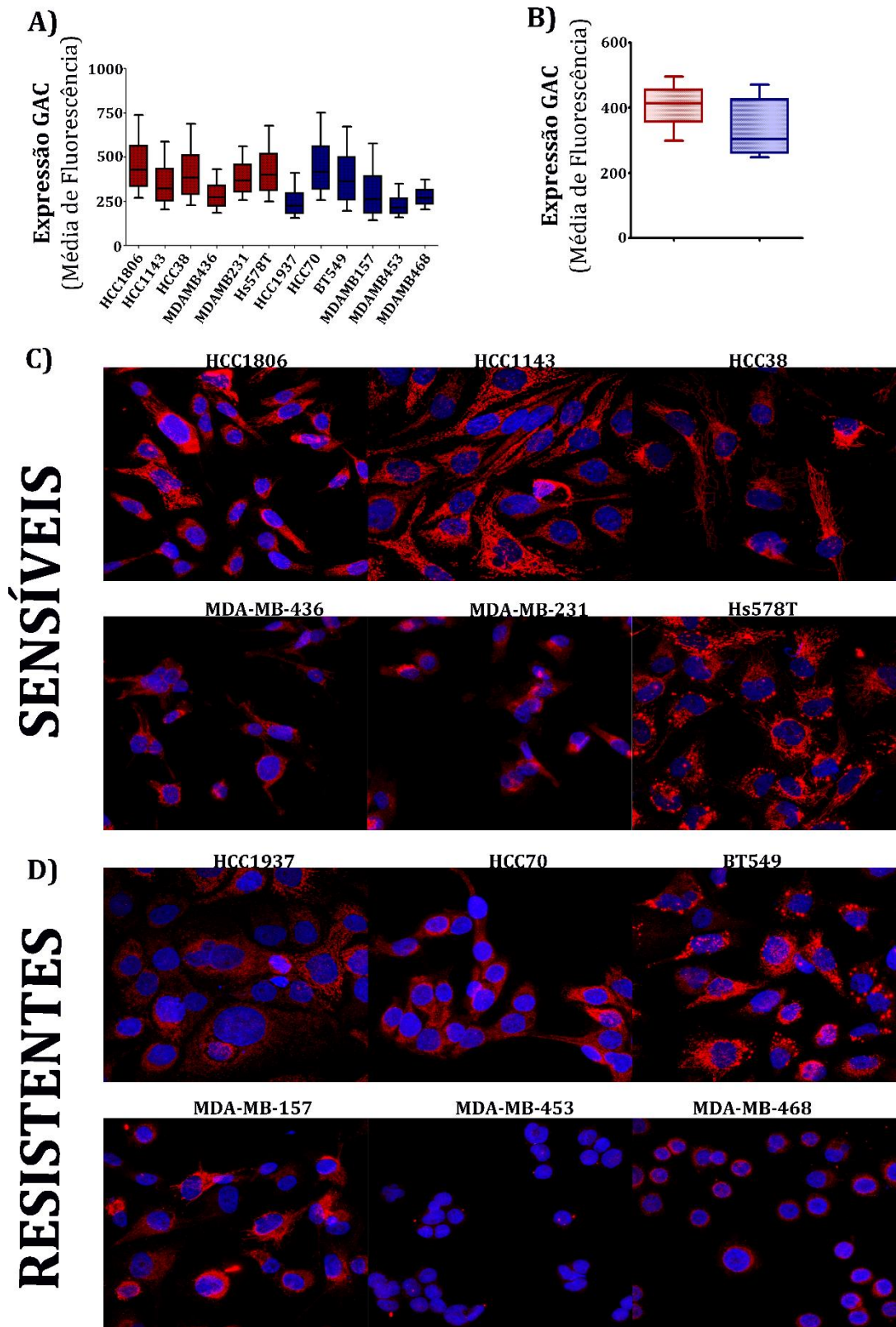
246. Edmunds LR, Sharma L, Lu J, et al. c-Myc Programs Fatty Acid Metabolism and Dictates Acetyl CoA Abundance and Fate *. 2014. doi:10.1074/jbc.M114.580662.
247. Karlic H, Lohninger S, Koeck T, Lohninger A. Dietary l-carnitine stimulates carnitine acyltransferases in the liver of aged rats. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(2):205-212. doi:10.1177/002215540205000208.
248. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
249. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82(1):70-77. doi:10.1016/0003-9861(59)90090-6.
250. Rajan N, Habermehl J, Coté M-F, Doillon CJ, Mantovani D. Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nat Protoc.* 2006;1(6):2753-2758. doi:10.1038/nprot.2006.430.
251. Wehrens R, Weingart G, Mattivi F. metaMS: An open-source pipeline for GC-MS-based untargeted metabolomics. *J Chromatogr B.* 2014;966:109-116. doi:10.1016/j.jchromb.2014.02.051.
252. Smyth GK. Limma: linear models for microarray data. In: R G, V C, S D, WH I, eds. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor.* New York: Springer; 2005:397-420.
253. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(7):e47-e47. doi:10.1093/nar/gkv007.
254. Varley KE, Gertz J, Roberts BS, et al. Recurrent read-through fusion transcripts in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;146(2):287-297. doi:10.1007/s10549-014-3019-2.
255. Daemen A, Griffith OL, Heiser LM, et al. Modeling precision treatment of breast cancer. *Genome Biol.* 2013;14(10):R110. doi:10.1186/gb-2013-14-10-r110.
256. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(D1):D991-D995. doi:10.1093/nar/gks1193.
257. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
258. Fraley C, Raftery AE, Murphy TB, Scrucca L. *Mclust Version 4 for R: Normal Mixture Modeling for Model-Based Clustering, Classification, and Density Estimation.*; 2012.
259. Carlson M. GO.db: A set of annotation maps describing the entire Gene Ontology.
260. Kardon JR, Yien YY, Huston NC, et al. Mitochondrial ClpX Activates a Key Enzyme for Heme Biosynthesis and Erythropoiesis. *Cell.* 2015;161(4):858-867. doi:10.1016/j.cell.2015.04.017.
261. Starkov AA. The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1147(1):37-52. doi:10.1196/annals.1427.015.
262. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007;12(5):913-922. doi:10.1007/s10495-007-0756-2.
263. Roucou X, Antonsson B, Martinou J-C. INVOLVEMENT OF MITOCHONDRIA IN APOPTOSIS. *Cardiol Clin.* 2001;19(1):45-55. doi:10.1016/S0733-8651(05)70194-6.
264. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:87-106. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073706.
265. Wang C, Youle RJ. The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annu Rev Genet.* 2009;43(1):95-118. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134850.
266. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(9):566-578. doi:10.1038/nrm3412.
267. Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2012;1817(10):1833-1838. doi:10.1016/j.bbabi.2012.02.033.
268. Mishra P, Chan DC. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Cell Biol.* 2016;212(4):379-387. doi:10.1083/jcb.201511036.
269. van der Blik AM, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(6):a011072-a011072. doi:10.1101/cshperspect.a011072.
270. Scott I, Youle RJ, Pike R. HHS Public Access. 2016:85-98. doi:10.1042/bse0470085.Mitochondrial.
271. Youle, R. J., & van der Blik AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science (80-).* 2012;337(6098):1062-1065. doi:10.1126/science.1219855.Mitochondrial.
272. Mishra P, Chan DC. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(10):634-646. doi:10.1038/nrm3877.
273. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(12):872-884. doi:10.1038/nrm3013.
274. Mishra P, Carelli V, Manfredi G, Chan DC. Proteolytic Cleavage of Opa1 Stimulates Mitochondrial Inner Membrane Fusion and Couples Fusion to Oxidative Phosphorylation. *Cell Metab.* 2014;19(4):630-641. doi:10.1016/j.cmet.2014.03.011.
275. Scott I, Logan DC. *Plant Mitochondria.* Vol 1305.; 2010. doi:10.1007/978-0-387-89781-3_2.

276. Chris Bakal and Dr. Julia Sero. Phenotypic Characterization of Mitochondria in Breast Cancer Cells using Morphology and Texture Properties. https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/CST_Phenotypic_Characterization_Mitochondria_BreastCancer.pdf.
277. Fedorec AJH. High Content Imaging Analysis of Mitochondrial Structure and Function. 2014.
278. Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001;108(8):1167-1174. doi:10.1172/JCI13505.
279. Erejuwa OO, Sulaiman S a., Ab Wahab MS. Evidence in support of potential applications of lipid peroxidation products in cancer treatment. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/931251.
280. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/360438.
281. Mendez-Lucas A, Hyro ova P, Novellasdemunt L, Vinals F, Perales JC. Mitochondrial Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK-M) Is a Pro-survival, Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Response Gene Involved in Tumor Cell Adaptation to Nutrient Availability. *J Biol Chem*. 2014;289(32):22090-22102. doi:10.1074/jbc.M114.566927.
282. Saraon P, Cretu D, Musrap N, et al. Quantitative Proteomics Reveals That Enzymes of the Ketogenic Pathway Are Associated with Prostate Cancer Progression. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12(6):1589-1601. doi:10.1074/mcp.M112.023887.
283. Kallinowski F, Davel S, Vaupell P, Baessler KH, Wagner K. Glucose, lactate, and ketone body utilization by human mammary carcinomas in vivo. *Adv Exp Med Biol*. 1985;191:763-773. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3832881>.
284. Tchou J, Sonnad SS, Bergey MR, et al. Degree of tumor FDG uptake correlates with proliferation index in triple negative breast cancer. *Mol Imaging Biol*. 2010;12(6):657-662. doi:10.1007/s11307-009-0294-0.
285. Thike AA, Cheok PY, Jara-Lazaro AR, Tan B, Tan P, Tan PH. Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. *Mod Pathol*. 2010;23(1):123-133. doi:10.1038/modpathol.2009.145.
286. Lu W, Pelicano H, Huang P. Cancer metabolism: is glutamine sweeter than glucose? *Cancer Cell*. 2010;18(3):199-200. doi:10.1016/j.ccr.2010.08.017.
287. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2010;35(8):427-433. doi:10.1016/j.tibs.2010.05.003.
288. Long B, Muhamad R, Yan G, et al. Quantitative proteomics analysis reveals glutamine deprivation activates fatty acid β - oxidation pathway in HepG2 cells. *Amino Acids*. 2016. doi:10.1007/s00726-016-2182-7.
289. Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism : fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Publ Gr*. 2013;13(4):227-232. doi:10.1038/nrc3483.
290. Wen Y-A, Xing X, Harris JW, et al. Adipocytes activate mitochondrial fatty acid oxidation and autophagy to promote tumor growth in colon cancer. *Cell Death Dis*. 2017;8(2):e2593. doi:10.1038/cddis.2017.21.
291. Wang YY, Attané C, Milhas D, et al. Mammary adipocytes stimulate breast cancer invasion through metabolic remodeling of tumor cells. *JCI insight*. 2017;2(4):e87489. doi:10.1172/jci.insight.87489.
292. Nieman KM, Kenny H a, Penicka C V, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med*. 2011;17(11):1498-1503. doi:10.1038/nm.2492.
293. D'Esposito V, Liguoro D, Ambrosio MR, et al. Adipose microenvironment promotes triple negative breast cancer cell invasiveness and dissemination by producing CCL5. *Oncotarget*. 2016;7(17). doi:10.18632/oncotarget.8336.
294. Rodrigues MF, Obre E, Melo FH, et al. Enhanced OXPHOS, glutaminolysis and beta-oxidation constitute the metastatic phenotype of melanoma cells. *Biochem J*. 2015;703-715. doi:10.1042/BJ20150645.
295. Pike LS, Smift AL, Croteau NJ, Ferrick DA, Wu M. Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2011;1807(6):726-734. doi:10.1016/j.bbabi.2010.10.022.
296. Pigs H, Yu XX, Drackley JK, Odle J. Rates of Mitochondrial and Peroxisomal β -Oxidation of Palmitate Change during Postnatal Development and Food Deprivation in Liver, Kidney and. 1997;(September 1996):1814-1821.
297. Kato K, Ogura T, Kishimoto A, et al. Critical roles of AMP-activated protein kinase in constitutive tolerance of cancer cells to nutrient deprivation and tumor formation. *Oncogene*. 2002;21(39):6082-6090. doi:10.1038/sj.onc.1205737.
298. Shi J, Fu H, Jia Z, He K, Fu L, Wang W. High Expression of CPT1A Predicts Adverse Outcomes: A Potential Therapeutic Target for Acute Myeloid Leukemia. *EBioMedicine*. 2016;14:55-64. doi:10.1016/j.ebiom.2016.11.025.
299. Cirillo A, Di Salle A, Petillo O, et al. High grade glioblastoma is associated with aberrant expression of

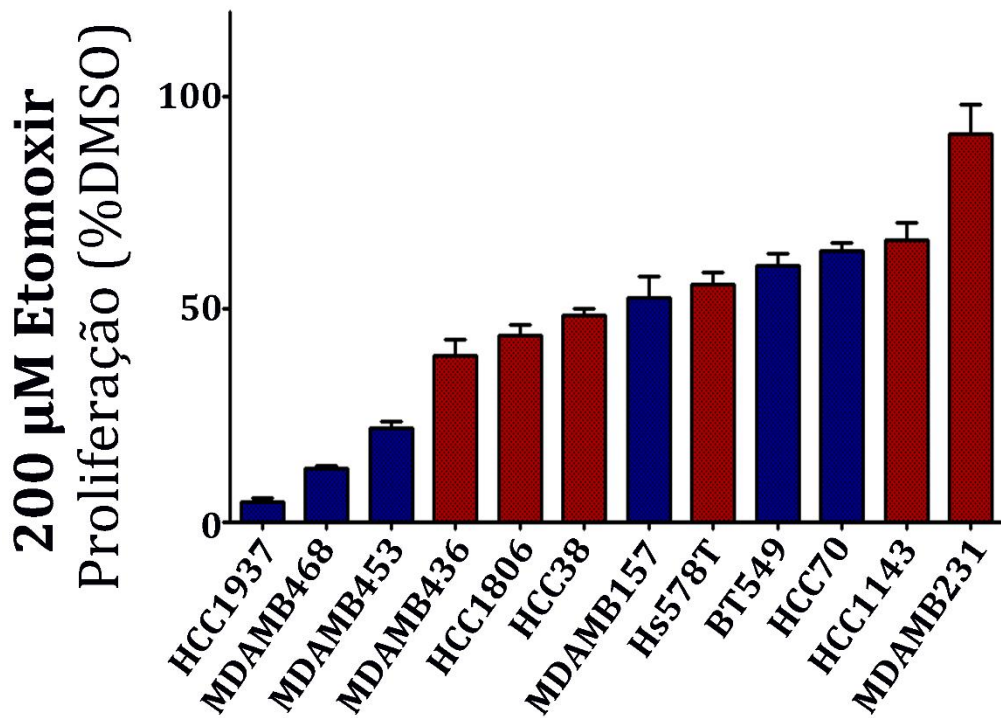
- ZFP57, a protein involved in gene imprinting, and of CPT1A and CPT1C that regulate fatty acid metabolism. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(6):735-741. doi:10.4161/cbt.28408.
300. Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G. Metabolic Control of Autophagy. *Cell.* 2014;159(6):1263-1276. doi:10.1016/j.cell.2014.11.006.
301. Thorburn A. Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis.* 2008;13(1):1-9. doi:10.1007/s10495-007-0154-9.
302. Hardie DG, Alessi DR. LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after. *BMC Biol.* 2013;11:36. doi:10.1186/1741-7007-11-36.
303. Buzzai M, Bauer DE, Jones RG, et al. The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid beta-oxidation. *Oncogene.* 2005;24(26):4165-4173. doi:10.1038/sj.onc.1208622.
304. Laderoute KR, Amin K, Calaoagan JM, et al. 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol Cell Biol.* 2006;26(14):5336-5347. doi:10.1128/MCB.00166-06.
305. David CJ, Chen M, Assanah M, Canoll P, Manley JL. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature.* 2010;463(7279):364-368. doi:10.1038/nature08697.
306. Edmunds LR, Sharma L, Kang A, et al. C-Myc programs fatty acid metabolism and dictates acetyl-CoA abundance and fate. *J Biol Chem.* 2014;289(36):25382-25392. doi:10.1074/jbc.M114.580662.
307. Stine ZE, Walton ZE, Altman BJ, Hsieh AL, Dang C V. MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discov.* 2015;5(10):1024-1039. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0507.
308. Camarda R, Williams J, Goga A. In vivo Reprogramming of Cancer Metabolism by MYC. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5(April):1-13. doi:10.3389/fcell.2017.00035.
309. Willis S, De P, Dey N, et al. Enriched transcription factor signatures in triple negative breast cancer indicates possible targeted therapies with existing drugs. *Meta Gene.* 2015;4:129-141. doi:10.1016/j.mgene.2015.04.002.
310. Fallah Y, Brundage J, Allegakoen P, Shajahan-Haq AN. MYC-Driven Pathways in Breast Cancer Subtypes. *Biomolecules.* 2017;7(3):53. doi:10.3390/biom7030053.
311. Horiuchi D, Kusdra L, Huskey NE, et al. MYC pathway activation in triple-negative breast cancer is synthetic lethal with CDK inhibition. *J Exp Med.* 2012;209(4):679-696. doi:10.1084/jem.20111512.
312. Gao, Ping E Al. c-Myc suppression of miR-23 enhances mitochondrial glutaminase and glutamine metabolism. *Nature.* 2009;458(7239):762-765. doi:10.1038/nature07823.c-Myc.
313. Zirath H, Frenzel A, Oliynyk G, et al. MYC inhibition induces metabolic changes leading to accumulation of lipid droplets in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(25):10258-10263. doi:10.1073/pnas.1222404110.
314. Dang C V. MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(8):1-15. doi:10.1101/cshperspect.a014217.
315. Lukey MJ, Greene KS, Erickson JW, Wilson KF, Cerione RA. The oncogenic transcription factor c-Jun regulates glutaminase expression and sensitizes cells to glutaminase-targeted therapy. *Nat Commun.* 2016;7:11321. doi:10.1038/ncomms11321.
316. Timmerman LAA, Holton T, Yuneva M, et al. Glutamine sensitivity analysis identifies the xCT antiporter as a common triple-negative breast tumor therapeutic target. *Cancer Cell.* 2013;24(4):450-465. doi:10.1016/j.ccr.2013.08.020.
317. Pegg AE. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life.* 2009;61(9):880-894. doi:10.1002/iub.230.
318. Stjernborg L, Heby O, Mamont P, Persson L. Polyamine-mediated regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase expression in mammalian cells. Studies using 5'-[(Z)-4-amino-2-butenyl]methylamino)-5'-deoxyadenosine, a suicide inhibitor of the enzyme. *Eur J Biochem.* 1993;214(3):671-676. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8319678>.
319. Miller-Fleming L, Olin-Sandoval V, Campbell K, Ralser M. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *J Mol Biol.* 2015;427(21):3389-3406. doi:10.1016/j.jmb.2015.06.020.
320. Seiler N. Catabolism of polyamines. *Amino Acids.* 2004;26(3). doi:10.1007/s00726-004-0070-z.
321. Ignatenko NA, Gerner EW. Growth arrest- and polyamine-dependent expression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human tumor cells. *Cell Growth Differ.* 1996;7(4):481-486. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9052989>.
322. Ichimura S, Hamana K, Neno M. Significant Increases in the Steady States of Putrescine and Spermidine/SpermineN1-Acetyltransferase mRNA in HeLa Cells Accompanied by Growth Arrest. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;243(2):518-521. doi:10.1006/bbrc.1998.8129.
323. Mandal S, Mandal A, Johansson HE, Orjalo A V., Park MH. Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(6):2169-2174. doi:10.1073/pnas.1219002110.

324. Mandal S, Mandal A, Park MH. Depletion of the polyamines spermidine and spermine by overexpression of spermidine/spermine N¹-acetyltransferase 1 (SAT1) leads to mitochondria-mediated apoptosis in mammalian cells. *Biochem J.* 2015;468(3):435-447. doi:10.1042/BJ20150168.

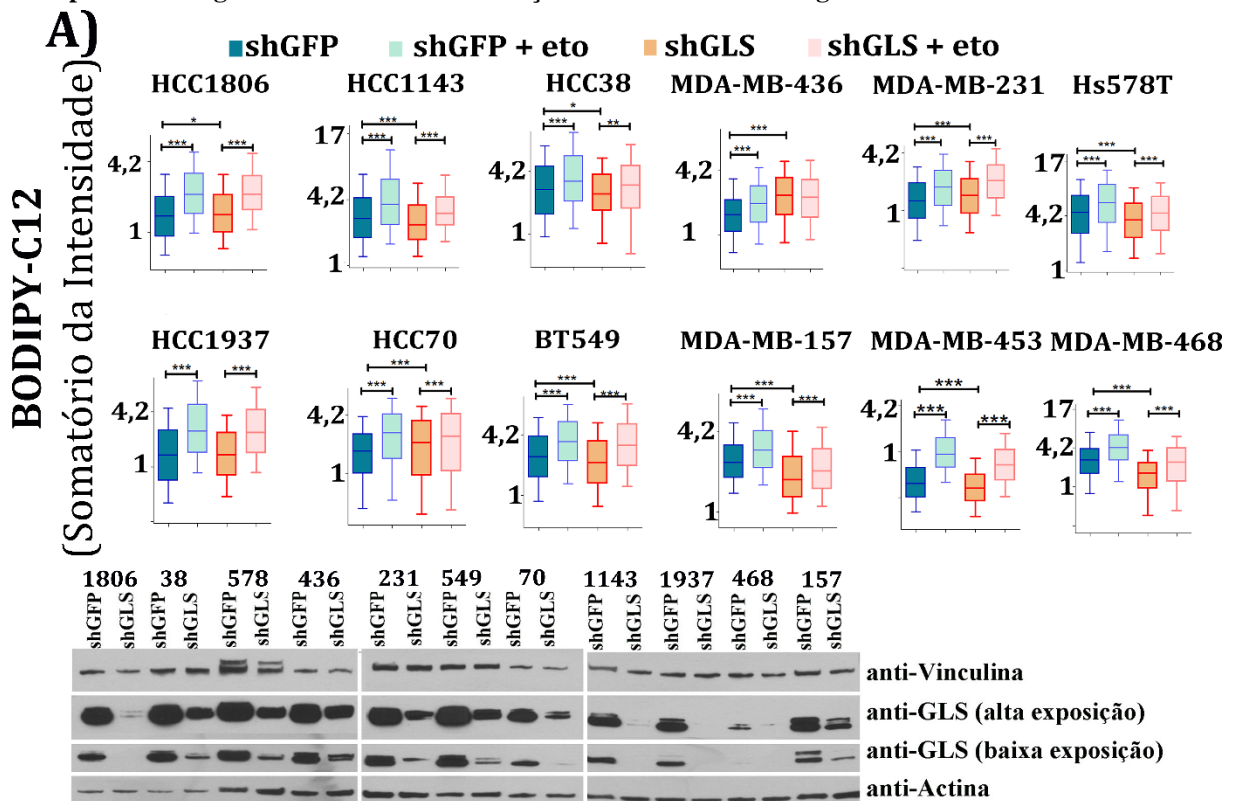
Apêndice 1: Figuras complementares



Apêndice 1. Figura 1. Medida de expressão de GAC por imunofluorescência
 Medida dos níveis de GAC por imunofluorescência pela média da intensidade por linhagens TN (A) e comparando a expressão de GAC entre os grupos sensíveis e resistentes (B). Imagens representativas da expressão de GAC nas linhagens sensíveis (C) e nas linhagens resistentes (D).

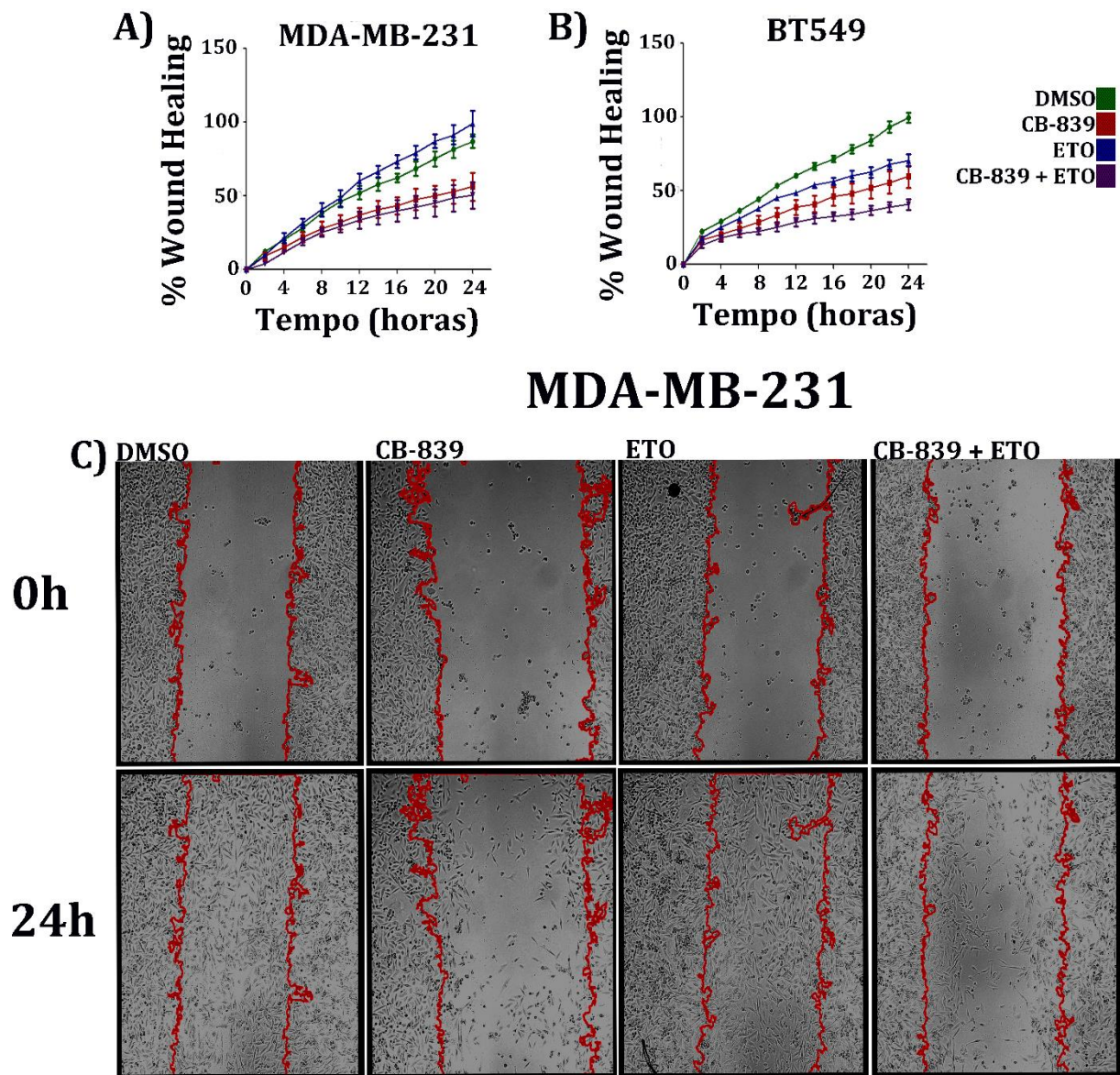


Apêndice 1. Figura 2. Sensibilidade à inibição de etomoxir em linhagens TN



Apêndice 1. Figura 3. Estudo da plasticidade metabólica em linhagens TN quando submetidas ao *knockdown* de *GLS*

Uso da sonda Bodipy-C12 nas 12 linhagens TN mostrando que o tratamento com CB-839 diminui a intensidade da sonda no interior celular, em contrapartida, o uso de etomoxir diminui a utilização deste análogo de ácido graxo, aumentando sua intensidade intracelular



Apêndice 1. Figura 4. Avaliação adicional do metabolismo de glutamina e oxidação de ácidos graxos para o fenótipo tumoral de linhagens TN.

(A) Curva de migração em 24 horas da linhagem MDA-MB-231 e (B) BT549. (C) Imagens representativas da migração de MDA-MB-231 durante 24 horas quando tratadas com CB-839 e/ou etomoxir.

Apêndice 2: Tabelas complementares

Apêndice 2. Tabela 1. Vias enriquecidas relacionadas ao metabolismo de lipídios a partir de genes DE entre linhagens sensíveis e resistentes

Via definida GO	<i>pvalue</i>	Genes DE	Genes Totais
Cellular lipid metabolic process	0,004549	31	1025
Lipid metabolic process	0,006214	37	1317
Positive regulation of phospholipid biosynthetic process	0,008545	2	8
Phospholipid biosynthetic process	0,011804	10	233
Phospholipase C-activating dopamine receptor signaling pathway	0,013492	2	10
Lipid biosynthetic process	0,013815	20	636
Positive regulation of phospholipid biosynthetic process by transcription from RNA polymerase II promoter	0,018288	1	1
Phospholipid metabolic process	0,019161	13	366
Acetyl-CoA metabolic process	0,019802	3	31
Regulation of phospholipid biosynthetic process	0,02342	2	13
Regulation of phospholipid metabolic process	0,025171	4	60
Fatty acid biosynthetic process	0,044616	6	144
Response to lipid hydroperoxide	0,046936	1	3

Apêndice 2. Tabela 2. Lista de genes DE entre linhagens resistentes e sensíveis relacionados ao metabolismo de lipídios

Gene	log2FC (Sensíveis/Resistentes)	PPEE	Gene	log2FC (Sensíveis/Resistentes)	PPEE
<i>BBOX1</i>	-4,90407	9,02E-06	<i>ISYNA1</i>	-1,99502	0,02723
<i>CXCL5</i>	-4,61871	8,93E-05	<i>TBC1D8</i>	-1,19723	0,031114
<i>ITGAL</i>	-4,54456	9,29E-05	<i>DBP</i>	-1,85412	0,036487
<i>CCBP2</i>	-4,26896	9,76E-05	<i>ALDH1A2</i>	-2,85253	0,037678
<i>CREB3L4</i>	-2,9157	0,000145	<i>RXFPI</i>	-2,96673	0,039347
<i>SLC44A4</i>	-4,50816	0,00016	<i>ACSS2</i>	-1,11187	0,040472
<i>XBPI</i>	-2,62853	0,000356	<i>CTNNBIP1</i>	-1,00936	0,042305
<i>PDE4B</i>	-2,45849	0,001102	<i>ST6GAL1</i>	-1,90832	0,042789
<i>PTCHD2</i>	-3,13336	0,001369	<i>PIK3C2B</i>	-1,61545	0,043245
<i>STOX1</i>	-1,8626	0,00156	<i>CRAT</i>	-2,18745	0,043452
<i>STARD10</i>	-2,62648	0,002993	<i>TRPM4</i>	-1,72202	0,044309
<i>PLA2G6</i>	-2,21432	0,004009	<i>AXIN2</i>	-1,54709	0,044309
<i>PIK3R1</i>	-1,81793	0,004324	<i>AGPAT9</i>	2,860684	0,000379
<i>P2RY6</i>	-3,0438	0,005789	<i>FEZF1</i>	4,282618	0,000458
<i>TM7SF2</i>	-2,1838	0,007476	<i>INPP5A</i>	1,428538	0,000584
<i>GGTA1P</i>	-3,18869	0,008539	<i>TESC</i>	3,864018	0,000712
<i>RND1</i>	-2,53649	0,009609	<i>BEX2</i>	3,254268	0,001042
<i>OSBPL5</i>	-2,22758	0,01209	<i>CD40</i>	3,77993	0,003528
<i>CYP27B1</i>	-2,30451	0,013013	<i>DGKG</i>	3,716074	0,005034
<i>CLN3</i>	-1,3927	0,013013	<i>ATP6V0A2</i>	1,011223	0,006936
<i>SAT1</i>	-1,8277	0,013852	<i>DLC1</i>	3,167731	0,009386
<i>FOXA1</i>	-2,98965	0,0155	<i>TBXAS1</i>	2,011774	0,009994
<i>PIGZ</i>	-1,97178	0,017384	<i>LEF1</i>	2,928563	0,014517
<i>WNT11</i>	-2,44018	0,019185	<i>CYP26B1</i>	2,156891	0,014809
<i>TRIB3</i>	-1,73657	0,02085	<i>CDC6</i>	1,168608	0,018259
<i>EGLN3</i>	-2,61148	0,021365	<i>ACVRL1</i>	2,789437	0,030451
<i>PIK3R3</i>	-1,77096	0,02179	<i>MAGEA11</i>	3,124213	0,030731
<i>VASH2</i>	-1,78277	0,021895	<i>SLCO1B3</i>	3,100086	0,031114
<i>RASIP1</i>	-2,50044	0,023931	<i>ODC1</i>	1,673538	0,044796
<i>LDLRAP1</i>	-1,01236	0,025271	<i>PDSS1</i>	1,13051	0,045674
<i>GGPS1</i>	-1,11044	0,025502	<i>CCND2</i>	2,752911	0,048742
<i>MYB</i>	-1,88719	0,025881	<i>TNFRSF10D</i>	2,502341	0,048857

Apêndice 2. Tabela 3. Genes DE relacionados ao metabolismo de poliaminas entre linhagens resistentes e sensíveis

Gene	log2FC (Sensíveis/Resistentes)	PPEE
<i>AZIN1</i>	0,304654	0,346441
<i>ODC1</i>	1,673538	0,001049
<i>SAT1</i>	-1,8277	0,000146
<i>SAT2</i>	0,546758	0,22129
<i>PAOX</i>	0,124388	0,805365
<i>SMOX</i>	-0,03133	0,955608
<i>SRM</i>	0,414939	0,366708
<i>AMD1</i>	0,179751	0,550611
<i>AGMAT</i>	0,74557	0,176305
<i>SMS</i>	-0,24052	0,520439
<i>OAZ1</i>	0,146058	0,677395
<i>OAZ2</i>	0,297359	0,218867
<i>OAZ3</i>	-2,35136	0,000219
<i>TPH1</i>	1,305767	0,067513
<i>HDC</i>	-1,5649	0,118405
<i>SULT1A2</i>	-2,09604	0,010201
<i>MOXD1</i>	-0,74496	0,353081
<i>TPH2</i>	-0,14952	0,881046
<i>ASMT</i>	-0,38179	0,691804
<i>DBH</i>	1,32819	NA
<i>MOXD2P</i>	-0,15689	0,865477
<i>AANAT</i>	-1,27016	0,050408
<i>PRG3</i>	-0,00612	0,994731

Apêndice 2. Tabela 4. Genes DE relacionados ao metabolismo de lipídios entre pacientes com baixa e alta expressão de GLS

Processo	Nome Gene	FoldChange (Baixo/Alto)	PPEE
Transporte Membrana Plasmática	ALB	127,4	0
	SLC27A1	1,79	0,00000000000000611
	SLC27A4	1,47	0,000000973
	FABP4	2,46	0,000000000626
	CD36	2,33	0,00000000183
Lipases	PNPLA2	2	0
	PNPLA4	2,4	0
	PNPLA6	-1,13	0,84
	MGLL	1,6	0,0002430
Acil-CoA sintetases	ACSL1	-1,24	0,8
	ACSL3	-1,01	0,96
	ACSL5	-1,33	0,066
	ACSM3	-1,29	0,22
	ACSF2	2,6	0,00000000381
Transporte	CPT1A	1,69	0,0000109
	CPT1B	1,6	0,0000238
	CPT1C	-1,05	0,82
	CPT2	1,29	0,000000141
	CRAT	5,75	0
	SLC25A20	1,42	0,00000000996
Beta-oxidação	ACADSB	4,62	0
	ACADS	2	0,0000000000541
	ACAD10	1,38	0,00000000391
	ACAD9	-1,20	0,046
	ACAD8	1,25	0,03
	ACADVL	1,34	0,0044
	ECHS1	1,54	0,000000000119
	HSD17B10	1,1	0,88
ACAA2	-1,3	0,056	
Oxidação de ácidos graxos de cadeia ímpar	MUT	-1,05	0,92
	MCEE	1,27	0,0057
	PCCA	1,5	0,000000377
	PCCB	1,13	0,32
Biossíntese de Triacilgliceróis	DGAT2	-2,04	0,00000000146
	AGPAT4	-2,15	0,00000000156
	AGPAT5	-1,63	0,00042
	AGPAT9	-3,33	0
	LPIN1	-3,2	0

Apêndice 2. Tabela 5. Lista de genes pertencentes a família Acil-CoA Sintetase e suas principais funções

Classe	Nome Genes	Função
Acil-CoA Sintetase de Ácidos Graxos de cadeias muito	SLC27A1	Tansporte pela membrana e acil-CoA ligase – Beta-oxidação Mitochondrial
	SLC27A2	Acil-CoA ligase – Peroxidação e Biossíntese
	SLC27A3	Acil-CoA ligase: Biossíntese
	SLC27A4	Tansporte pela membrana e acil-CoA ligase
	SLC27A5	Acil-CoA ligase –Biossíntese
	SLC27A6	Tansporte pela membrana
Acil-CoA Sintetase de Ácidos Graxos de cadeias longas	ACSL1	Acil-CoA ligase: Beta-oxidação mitocondrial e Biossíntese
	ACSL3	Acil-CoA ligase: Peroxidação e Biossíntese
	ACSL4	Acil-CoA ligase: Peroxidação e Biossíntese
	ACSL5	Acil-CoA ligase: Triglicerídeos e beta-oxidação mitocondrial
	ACLS6	Acil-CoA ligase –Biossíntese
Acil-CoA Sintetase de Ácidos Graxos de cadeias médias	ACSM1	Acil-CoA ligase: Peroxidação
	ACSM3	Acil-CoA ligase: Peroxidação e beta-oxidação mitocondrial
	ACSM4	Acil-CoA ligase: Peroxidação
	ACSM5	Acil-CoA ligase: Peroxidação
Acil-CoA Sintetase de Ácidos Graxos de cadeias curtas	ACSS2	Ativação de acetato para biossíntese de lipídios
	ACSS3	Ativação de acetato para biossíntese de lipídios
Outros	ACSF1	Activates acetoacetate to acetoacetyl-CoA
	ACSF2	Acil-CoA ligase: Beta-oxidação mitocondrial e Biossíntese
	ACSF3	Acil-CoA ligase: Biossíntese

Apêndice 2. Tabela 6. Lista de metabólitos identificados por análise *untargeted* de GC-MS

Metabólito	logFC (CB839/DMSO)	adj.P.Val (CB839/D MSO)	LogFC (ETO/DM SO)	adj.P.Val (ETO/DM SO)	logFC(CB+ETO/D MSO)	adj.P.Val (CB+ETO/D MSO)
2-Butenoic acid (1TMS)	-37147,8	0,014041	-34051,2	0,020708	37953,43	0,007598
Adenine (2TMS)	-837,302	0,493841	-2451,64	0,033848	-17,5498	1
Adenosine-5- monophosphate (5TMS)	-2505,89	0,207543	-2410,82	0,209627	-3294,95	0,068782
Alanine, beta- (3TMS)	-4802,23	0,487331	-10289,2	0,114961	-11903,6	0,041919
Allantoin (4TMS)	7,58E-14	1	675,1699	0,491414	0	1
Aminomalonic acid (3TMS)	1288,161	0,493841	94,90002	0,971961	-3043,46	0,068782
Asparagine (3TMS)	57564,16	0,147864	41627,6	0,246669	43225,21	0,198003
Aspartic acid (3TMS)	-82271,4	0,000347	-43817,7	0,014584	-69819,1	0,001173
Aspartic acid, N-acetyl- (3TMS)	611,7083	0,518878	-1418,32	0,151381	-230,279	0,904968
Butanoic acid, 4-amino- (3TMS)	-5093,68	0,720659	-6190,6	0,544264	-20128,8	0,048318
Citric acid (4TMS)	-69444,5	0,006817	-83120,7	0,002464	-43380	0,041919
Creatinine (3TMS)	7486,083	0,317938	-11132	0,151381	-11132	0,078718
Cystathionine (4TMS)	2995,493	0,147864	626,5779	0,82197	295,0644	0,940978
Cysteinyl-glycine (3TMS)	1016,712	0,493841	-8,24E-14	1	-1,04E-13	1
D,L-Homocystine (4TMS)	-277,86	0,750213	-11,8228	1	-277,86	0,765364
d-Erythrose (3TMS)	-12789,6	0,006142	-17516,6	0,00174	-15986,4	0,001173
Erythritol (4TMS)	5417,688	0,493841	8248,805	0,238283	9345,745	0,14456
Glutamic acid (3TMS)	-928171	8,05E-06	-417951	0,002461	-1164357	1,20E-06
Glutamine [-H2O] (3TMS) MP	-1700,55	0,525271	-1744,84	0,522409	675,9068	0,904968
Glutamine, DL- (3TMS)	436656,1	0,32878	-402429	0,334	89764,72	0,921436
Glycerol (3TMS)	-1783,66	0,937581	1571,645	0,945812	9667,599	0,313194
Glycerol-3-phosphate (4TMS)	7016,944	0,147864	4443,377	0,269677	15268,22	0,002394
Glycine (3TMS)	86819,45	0,147864	-173356	0,005324	-84154,5	0,075898
Histidine (3TMS)	6901,58	0,317938	7710,84	0,231775	11459	0,068782
Inositol, myo- (6TMS)	-52491	0,518878	-39605,6	0,636118	-60287,5	0,410267
Leucine (2TMS)	22409,49	0,790753	39183,05	0,540052	102899,9	0,075898
Lysine (4TMS)	7400,06	0,864121	2865,85	0,971961	32609,47	0,201516
Malic acid (3TMS)	-6749,25	0,147864	-6749,25	0,151381	-6749,25	0,078718
Methionine (2TMS)	2211,519	0,864121	-571,108	0,971961	6192,464	0,473396
N-Acetylglutamine (4TMS)	42817,35	0,147864	12614,46	0,694961	69531,24	0,016349
Octadecanoic acid (1TMS)	-3732,66	0,978038	-6065,47	0,945812	94125,55	0,041466
Phenylalanine (2TMS)	4645,968	0,787816	2808,389	0,888018	13824,82	0,201516
Phosphoric acid (3TMS)	-374684	0,147864	-333246	0,181296	743634,9	0,004828
Proline (2TMS)	113811,9	0,147864	44332,21	0,522409	143108,7	0,041466
Proline, 4-hydroxy-, trans- (3TMS)	30943,27	0,069155	12342,32	0,394141	24530,11	0,075898
Psicose (1MEOX) (5TMS) BP	34025,45	0,864121	104950,4	0,454207	122500	0,313194
Putrescine (4TMS)	12465,51	0,147864	-16166	0,040541	29093,99	0,001501
Serine (3TMS)	39813,83	0,205191	-11214,2	0,778062	40327,58	0,125278
Sorbitol (6TMS)	-497932	0,50658	-251590	0,779156	-147214	0,921436
Spermidine (5TMS)	-757,736	0,978038	-19412,2	0,046636	-11760,4	0,145552

Continuação da tabela

Spermine (6TMS)	-10517	0,398977	-16396,3	0,179361	-32351,3	0,007598
Tryptophan (3TMS)	4456,387	0,518878	-2508,81	0,778062	541,5361	0,987164
Uracil (2TMS)	-1367,02	0,263815	-1691,72	0,179361	-88,7405	0,987164
Urea (2TMS)	70739,25	0,63617	109767,3	0,378006	92431,19	0,440062
Valine (2TMS)	-957,422	0,987836	20243,53	0,544264	54418,94	0,075898

Guanylate-binding protein-1 is a potential new therapeutic target for triple-negative breast cancer

Melissa Quintero^{1*}, Douglas Adamoski^{1*}, Larissa Menezes dos Reis^{1*}, Carolline Fernanda Rodrigues Ascenção¹, Krishina Ratna Sousa de Oliveira¹, Kaliandra de Almeida Gonçalves¹, Marília Meira Dias¹, Marcelo Falsarella Carazzolle², Sandra M. G. Dias^{1†}.

* These authors contributed equally to the work.

† Corresponding author.

Correspondence and requests for materials should be addressed to:

Sandra MG Dias, PhD

Laboratório Nacional de Biociências - LNBio

Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM

Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000

Pólo II de Alta Tecnologia, Campinas, SP - 13083-100 - Brazil

Phone: +55 19 3512 3503; Fax: +55 19 3512 1006

E-mail: sandra.dias@lnbio.cnpem.br

Manuscrito submetido à BMC Câncer em 05 de janeiro de 2017

Revisores respondidos em 12 de maio de 2017 – Aguardando resposta.

(Fator de Impacto: 3,288. Qualis Capes Ciências Biológicas I: B1)

Abstract

Background: Triple-negative breast cancer (TNBC) is characterized by a lack of estrogen and progesterone receptor expression (*ESR* and *PGR*, respectively) and an absence of human epithelial growth factor receptor (*ERBB2*) amplification. Approximately 15–20% of breast malignancies are TNBC. Patients with TNBC often have an unfavorable prognosis. In addition, TNBC represents an important clinical challenge since it does not respond to hormone therapy.

Methods: In this work, we integrated high-throughput mRNA sequencing (RNA-Seq) data from normal and tumor tissues (obtained from The Cancer Genome Atlas, TCGA) and cell lines obtained through in-house sequencing or available from the Gene Expression Omnibus (GEO) to generate a unified list of differentially expressed (DE) genes. Methylome and proteomic data were integrated to our analysis to give further support to our findings. Genes that were overexpressed in TNBC were then curated to retain new potentially druggable targets based on *in silico* analysis. Knocking-down was used to assess gene importance for TNBC cell proliferation.

Results: Our pipeline analysis generated a list of 243 potential new targets for treating TNBC. We finally demonstrated that knock-down of Guanylate-Binding Protein 1 (*GBP1*), one of the candidate genes, selectively affected the growth of TNBC cell lines. Moreover, we showed that *GBP1* expression was controlled by epidermal growth factor receptor (EGFR) in breast cancer cell lines.

Conclusions: We propose that *GBP1* is a new potential druggable therapeutic target for treating TNBC with enhanced *EGFR* expression.

Key Words: Breast Cancer, Triple-negative Breast Cancer, Gene Expression, RNA-Seq, Transcriptomics, Therapeutic Target.

Background

The emergence of next-generation sequencing (NGS) technology has provided a large amount of data, much of which is publicly available^{1,2}. Specifically, RNA-Seq has been used for the estimation of RNA abundance^{3,4}, alternative splicing detection^{5–7}, and the discovery of novel genes and transcripts. As such, RNA-Seq has become an important tool in cancer studies⁶, contributing to reduced costs and less time being spent in benchtop experiments, thus speeding up the resolution of biological problems. However, a challenge remains in achieving intelligible data analysis and efficient laboratory validation.

Triple-negative breast cancer (TNBC) is characterized by a lack of estrogen and progesterone receptor expression (*ESR* and *PGR*, respectively) and an absence of human epithelial growth factor receptor (*ERBB2*) amplification. Approximately to 15–20% of breast malignancies are TNBC⁸. Patients with TNBC often exhibit unfavorable histopathologic features at diagnosis, mainly consisting of a higher histologic grade, larger tumor size, and frequent metastasis to the lymph nodes⁹. As a consequence, TNBC is associated with a shorter median time to relapse and death¹⁰. TNBC represents an important clinical challenge since it does not respond to hormone therapy, which targets the abovementioned receptors^{11,12}. Moreover, TNBC is highly heterogeneous¹³, indicating the necessity of identifying unifying molecular targets, which may help guide more efficient and less toxic therapeutic management^{14,15}.

Guanylate-Binding Protein-1 (*GBP1*) is a member of the large GTPase family and is induced by interferons¹⁶ and inflammatory cytokines¹⁷. *GBP1* is also transcriptionally regulated by epidermal growth factor receptor (EGFR). In glioblastoma^{18,19} and esophageal squamous cell carcinoma²⁰, *GBP1* upregulation via the EGFR signaling pathway contributes to tumor proliferation and migration both *in vitro* and *in vivo*. Moreover, *GBP1* is described as a component of the cytoskeletal gateway of drug resistance in ovarian cancer^{21,22}. *GBP1* expression is also linked to a lack of responsiveness to radiotherapy in some tumors²³, and *GBP1* is overexpressed in pancreatic cancer that is refractory to oncolytic virus therapy²⁴.

In this work, we utilized RNA-Seq data obtained from TNBC tissues as well as cell lines that were publicly available from The Cancer Genome Project (TCGA) and the Gene Expression Omnibus Portal (GEO), respectively, to search for new therapeutic targets for TNBC. To complement our findings, we also performed transcriptomics analyses of several TNBC cell lines. The obtained lists of overexpressed genes were inter-crossed and compared with data from normal tissues from the TCGA. Methylome and proteomic data were integrated to our analysis to give further support to our findings. Using this approach, we identified 243 genes, which were subsequently evaluated for their druggability potential. *GBP1* was the second gene on the list, and knock-down of *GBP1* in TNBC and non-TNBC

cell lines showed that its expression is important for TNBC cell growth. In addition, we demonstrated that *GBP1* expression is controlled by EGFR signaling in breast cancer cells. Thus, we present GBP1 as a new potential druggable target for TNBC with enhanced *EGFR* expression.

Methods

RNA sequencing and data processing. Total RNA extraction was performed using the RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Then, mRNA was isolated with either the Dynabeads mRNA purification kit (Life Technologies) or the TrueSeq RNA sample preparation kit v2 (Illumina) for samples sequenced at the High-Throughput Sequencing Facility (HTSF) of the University of North Carolina at Chapel Hill (UNC, USA) and the High-Performance Technologies Central Laboratory (LaCTAD) of the University of Campinas (UNICAMP, Brazil), respectively. After isolation, the mRNAs were fragmented in the presence of divalent cations and high temperatures and then employed for cDNA synthesis with random primers using the Superscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies) kit. The MDAMB231 and SKBR3 samples were sequenced at HTSF, while the MDAMB436, MDAMB468, BT549 and MCF7 samples were sequenced at LaCTAD. All samples were sequenced using the paired-end x 100 base pairs technique on the HiSeq2000 platform (Illumina). Level 3 TCGA RNA-Seq data (RNASeqV2 raw count estimates) and related clinical data (immunohistochemical results for ER, PR and HER2 TNBC markers) for 1,093 tumor tissues from the Breast Invasive Carcinoma (BRCA) dataset, as well as 112 normal breast tissue samples, were downloaded from the Genomic Data Commons Legacy Archive (National Cancer Institute) on November 10, 2016, from *legacy* database. Cell line RNA-Seq data (accession codes GSE58135²⁵ and GSE48213²⁶) were obtained from the Gene Expression Omnibus²⁷ by downloading raw FASTQ files from the DDBJ Sequence Read Archive²⁸ (DRA) or NCBI Sequence Read Archive (SRA)²⁹. FastQC³⁰ was used to evaluate the quality of the reads. Reads presenting a mean quality score below 30 were removed. Those that exhibited a quality score above this threshold but included bases at the extremities with a quality score below 20 were trimmed using Skewer³¹ following guidelines published elsewhere³², up to a minimum of 30 base pairs. The processed reads were aligned against the hg19 genome using STAR³³, and transcript abundance was estimated with RNA-Seq by Expectation-Maximization (RSEM)³⁴. We applied upper-quantile normalization to perform batch effects adjustments and render dataset from distinct sources comparable³⁵.

Assignment of breast cancer marker status in the TCGA cohort. The TCGA normalized log₂ RSEM values for the *ESR1*, *PGR* and *ERBB2* genes were adjusted to a bimodal curve using an approach published previously^{36,37}. Briefly, for each gene, log₂+1-transformed³⁸, upper quartile-normalized³⁵ gene expression was fitted for a 2-component Gaussian mixture distribution model with the R package mclust³⁹. The highest match between the assignment and clinical data (when available) was the criterion for selecting equal or variable variance between the two Gaussian fits. For the microarray validation datasets, the same approach was used, but log₂+1-transformed normalized intensity values were used instead.

Differential gene expression analysis. Differential gene expression analysis of the RNA-Seq data was performed with the R package DESeq2⁴⁰. The differentially expressed (DE) genes list was restricted to genes showing a fold-change higher or equal than +2 and lower or equal than -2 and a false discovery ratio (FDR) equal to or below 0.05. The microarray datasets were pre-processed using the justRMA function from affy⁴¹, and probes were pooled into genes with Weighted Correlation Network Analysis (WGCNA)⁴². For these data, the DE gene list was generated with limma⁴³ using eBayes fit. Heatmaps were constructed with the R package heatmap⁴⁴ using Pearson's correlation coefficient and the complete clustering method. Venn plots were constructed with the R package VennDiagram⁴⁵, and principal component analysis (PCA) plots were obtained with the R package ggbiplot⁴⁶.

Pathway enrichment, literature annotations and druggability. When possible, GeneIDs or UCSC gene names were translated into Human Genome Organisation (HUGO) annotations using R package org.Hs.eg.db⁴⁷. Gene Ontology^{48,49} annotations were obtained with the R package⁵⁰ GO.db⁵¹ (using Wallenius approximation and adjusting p-values with the FDR). We employed the R package RISmed⁵²

to retrieve published papers containing the target gene names and the keyword “triple-negative breast cancer” on November 10, 2016. Interaction network, structural information, structural druggable criteria and druggability rankings was assessed using the canSAR⁵³ database. Structural drug pockets were assessed using PockDrug⁵⁴.

DNA Methylation Analysis. The ratio of the methylated probe intensity and the overall intensity (sum of methylated and unmethylated probe intensities), or beta value, were obtained from the HumanMethylation450 BeadChip analysis of the TCGA BRCA samples. The data, downloaded from the Genomic Data Commons Archive (National Cancer Institute) on March 15, 2016, was both quantile normalized and logit transformed using waterMelon⁵⁵. TNBC, Non-TNBC and normal samples were separated and comparisons at probe-level were performed with limma^{43,56}. The closest transcription initiation site (TSS) and island definition according to the Hidden Markov Models CpG-Islands (HMM CG Islands)⁵⁷ were performed with FDb.InfiniumMethylation.hg19⁵⁸. Shore, shelf and open sea extension of CG Islands was determined with GenomicRanges⁵⁹. Circos plot⁶⁰ was performed with OmicCircos⁶¹.

Proteomics Analysis. The Cancer Proteomic Atlas (TCPA) Reverse Phase Protein Array (RPPA) data⁶² replicate-based normalized⁶³ were obtained from the TCPA data portal (<http://tcpaportal.org/tcpa/>), separated into TNBC, Non-TNBC and normal status and compared with limma^{43,56}. Mass spectrometry normalized and processed data available for the same tumor tissues were obtained from previous work⁶⁴. The limma^{43,56} package was used for the comparisons.

Cell culture. The triple-negative breast cancer cell lines BT549, HCC38, HCC1806, Hs578T, MDA-MB-157, MDA-MB-231, MDA-MB-436, and MDA-MB-468 and the non-triple-negative MCF7, SKBR3 and T47D lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum and incubated at 37°C under 5% CO₂ in a humidified atmosphere.

Quantitative PCR. RNA samples were extracted with the TRI Reagent (Sigma) following the manufacturer’s instructions. cDNA synthesis was performed using GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega) and a 12 μM concentration of a mixture of random hexamers and (dT)18 (7:5), according to the manufacturer’s instructions. PCR amplification was performed with Power SYBR Green PCR MasterMix (Applied Biosystems), as instructed by the manufacturer. Samples were analyzed on the Applied Biosystems 7500 real-time PCR system via the 2^{-ΔΔCt} method⁶⁵. The following primers were used: rRNA18S (5’-ATTCCGATAACGAACGAGAC-3’ and 5’-TCACAGACCTGTTATTGCTC-3’), RPLPO (5’-GCTCTGGAGAACTGCTGCCT-3’ and 5’-TGGCACAGTGA CTTACATGG-3’), GBP1 (5’-ACTTCAGGAACAGGAGCAAC-3’ and 5’-TATGGTACATGCCTTTCGTC-3’).

GBP1 knock-down and *in vitro* proliferation assay. The pLKO.1-TRC.puro cloning vector (a gift from David Root - Addgene plasmid # 10878) was modified in our laboratory to express the monomeric Kusabira-Orange2 fluorescence protein (mKO2) instead of the selection marker. The shRNA contained the following target sequences: Luc: 5’-CTTACGCTGAGTACTTCGAC-3’; GBP1_1: TRCN0000116119 (5’-CGACGAAAGGCATGTACCATA-3’); GBP1_2: TRCN0000116120 (5’-TGAGACGACGAAAGGCATGTA -3’). Annealed forward and reverse oligos were cloned into AgeI-EcoRI restriction sites. Viral particle packing was performed, followed by titration, at the LNBio Viral Vector Laboratory Facility. The viruses were transduced at a multiplicity of infection (MOI) of 0.75 with 8 μg/mL of hexadimethrine bromide (Sigma Aldrich, H9268) in 31.25 cells/mm², in triplicate. The medium was replaced after 24 hours of transduction and every 48 hours thereafter. After 96 and 192 hours of transduction, the cells were fixed with 3.7% formaldehyde in 1X phosphate buffered saline (PBS) for 20 min at room temperature and stained with 1.5 μM DAPI (in PBS 1X) for 10 min. Images were collected with an Operetta fluorescence microscope (Perkin Elmer) and analyzed with Columbus (Perkin Elmer). The total number of cells was determined by identifying DAPI-stained nuclei, and positive-for-transduction cells were identified as those exhibiting an mKO2 mean and contrast fluorescence intensity above a threshold defined in non-transduced cells (background signal). The percentage of proliferation (when the number of the cells at time 192 > time 96) as well as the percentage

of cell loss (when the number of the cells at time 192 < time 96) were calculated using the following equations: percentage of proliferation: $100 * \{[\text{shGBP1}(\text{Time}192/\text{Time}96)]/[\text{shLUC}(\text{Time}192/\text{Time}96)]\}$; cell loss: $100 * (1 - [\text{shGBP1}(\text{Time}192/\text{Time}96)])$. In order to determine GBP1 knockdown long-term effect, we cloned shGBP1 and shLuc sequences into pLKO1-TRC.puro and transduced four cells lines (HCC1806, MDA-MB-436, Hs578T, MDA-MB-231). After a week of puromycin selection, 31.25 cells were seeded per square millimeter into 96 wells plate, and fixed 24 hours later (day 1) as described above. Consecutive plates were fixed every 48 h up to 7 days. Number of nuclei was quantified as described above and displayed as the ratio to the number of cells at day 1. Cell cycle phase quantification was determined by DAPI staining as previously described⁶⁶.

Apoptosis assay. Apoptotic/necrotic cells were quantified by Propidium Iodide (PI) staining as previously described⁶⁷. After 7 days of transduction and puromycin selection, cells were collected (both adhered as well as those floating in the media), fixed in 70% ethanol, stained with PI and analyzed by BD FACS Canto II Flow Cytometer with a 488-nm laser line at the FL-3 channel. Control cells were treated with 1 μM Staurosporine to determine the hypodiploid (sub-G1) peak.

EGFR activation. Cell lines were serum starved for 24 hours and then treated with 50 ng/mL of epidermal growth factor (EGF, Sigma-Aldrich) for six hours. *GBP1* expression was quantified via qPCR, and EGFR activation was confirmed by immunoblotting. Cells were washed twice with cold PBS and lysed in lysis buffer (10 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaF, 2 mM PMSF, 10 mM Na_3VO_4 , 2 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 10 μM leupeptin, 1 μM pepstatin, 1% Triton X-100). Protein lysates were resolved in 4–20% gradient polyacrylamide SDS gels and transferred onto PVDF membranes via semi-dry electroblotting using six WypAll X60 (Kimberly-Clark) filter pads under alcohol-free buffer conditions⁶⁸ at 0.325 mA/mm² for 7 minutes. The membranes were blocked in 3% non-fat dry milk diluted in Tris Buffered Saline with 0.05% Tween 20, subsequently incubated with anti-p-EGFR (Y1068; Cell Signaling Technology), then washed and probed with HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma) for 1 hour at room temperature. Band detection was conducted with SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) followed by autoradiography film exposure.

Results

TNBC patient re-classification based on *ESR*, *PGR* and *ERBB2* expression data. Since some of the TCGA patients were not classified by immunohistochemistry (IHC) according to Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR) and Human Epidermal growth factor Receptor 2 (HER2) status (Additional File 1: Figure S1A), we used the corresponding normalized gene (*ESR*, *PGR* and *ERBB2*, respectively) expression levels (determined using a previously proposed approach^{36,37}; Additional File 1: Figure S1B) to define their tissues marker status. For this purpose, the distribution of the expression levels of each gene was fitted with several bimodal mixture possibilities, and the results were compared with the available IHC information (Additional File 1: Figure S1C). The best bimodal model combination achieved 95.3% overall agreement with the available information (Additional File 1: Figure S1D and E) and was used for classification (Additional File 2: Table S1).

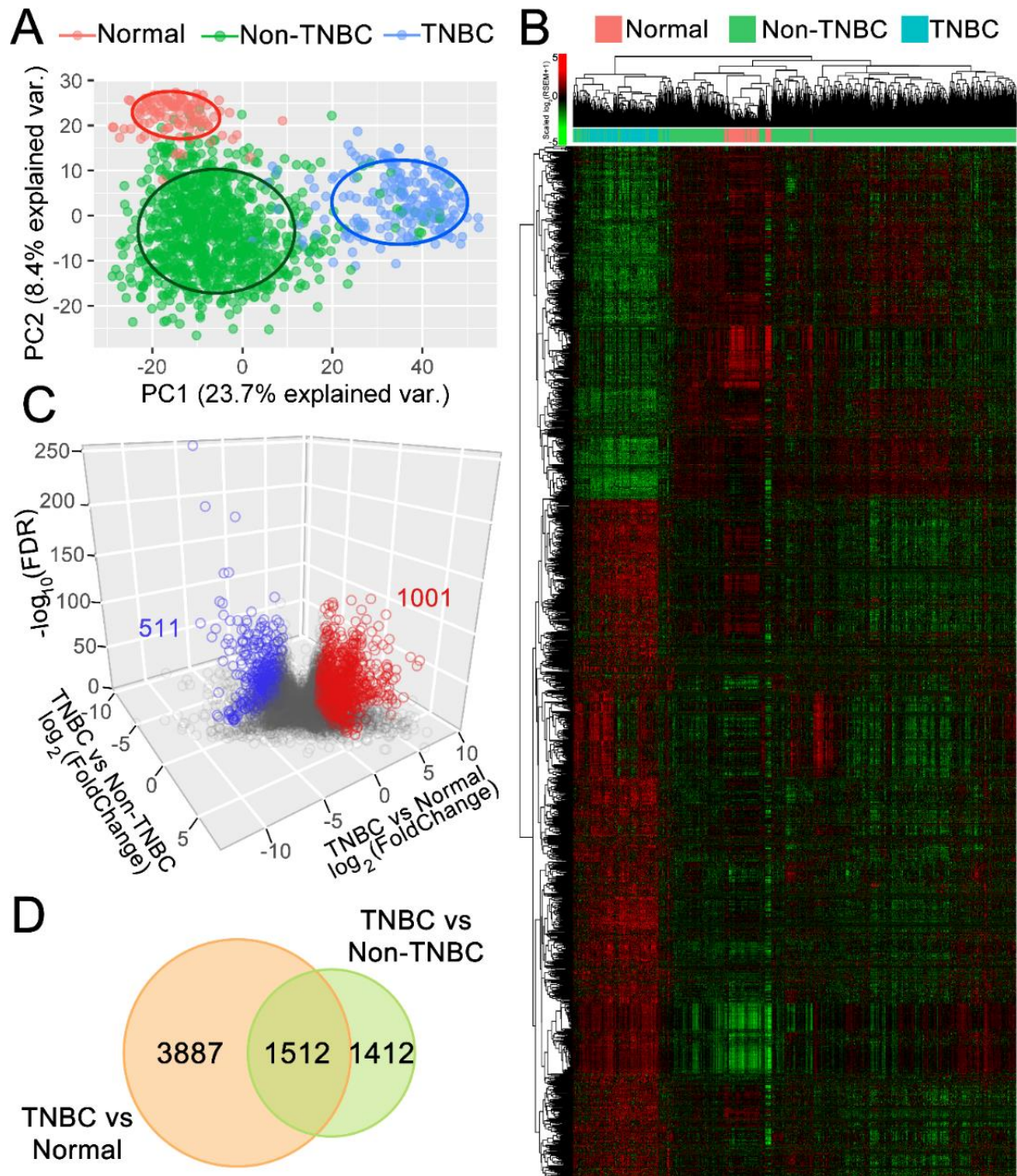


Figure 1: DE genes in TNBC versus non-TNBC tumor tissues and TNBC versus normal tissues obtained from TCGA. Principal component analysis (A) and heatmap clustering (B) performed with the DE genes revealed a clear separation between TNBC, non-TNBC and normal tissues. Correlations were obtained through Pearson coefficient analysis; unsupervised clustering was conducted via a complete method, and both axis and $\log_2(\text{RSEM}+1)$ values were scaled by line. (C) 3D Volcano plot showing non-DE (gray circles) and DE (blue circles, downregulated; red circles, upregulated) genes. Genes showing $\text{FC} \geq +2$ and $\text{FC} \leq -2$ with $\text{FDR} \geq 0.05$ were considered up- and downregulated, respectively. On axis Z, $-\log_{10}(\text{FDR})$. (D) Venn diagram showing that 1,512 genes were equally DE when TNBC versus non-TNBC and TNBC versus normal tissues were compared.

TNBCs exhibit a distinct gene expression pattern. RNA-seq data from 194 TNBC and 899 non-TNBC cases (Additional File 1: Figure S1F and G) were employed to define DE genes using the DESeq2^{40,69} routine (Additional File 3: Table S2). Similarly, a DE list was generated by comparing TNBC with normal tissues (Additional File 4: Table S3). A total of 2,924 DE genes were identified when TNBC was compared with non-TNBC, while 5,399 DE genes were identified between TNBC and normal tissues (Additional File 5: Figure S2A and B, respectively). The DE list efficiently separated both pairs of groups, as denoted by unsupervised (Figure 1A) and supervised (Additional File 5: Figure S2C and D) PCA. The same trend was observed when a hierarchical clustering analysis was conducted (Figure 1B). Curiously, TNBC tissues presented greater spatial separation for both components in the comparison with normal tissues versus the comparison with non-TNBC tumors, as further demonstrated by exclusive clustering. A total of 1,512 DE genes were shared between the two lists, with 1,001 genes being upregulated (fold-change (FC) $\geq +2$) and 511 being downregulated (FC ≤ -2), with a FDR equal to or less than 0.05 (Figure 1C and D and Additional File 6: Table S4).

TNBC cell lines are good surrogates for studying the disease. With the aim of using cell lines to validate the new targets, we first compared the gene expression profiles of the cell lines with tumor tissues. To this end, we sequenced four TNBC (MDA-MB-231, BT549, MDA-MB-436 and MDA-MB-468) and two non-TNBC cell lines (MCF7 and SKBR3; data processing with Skewer³¹, shown in Additional File 7: Figure S3A), referred to as “in-house” cell lines herein. The RNA-Seq results were confirmed by comparing the expression levels of 48 genes (displayed as \log_2 RSEM+1) with the data obtained through qPCR ($1/\Delta C_t$). The obtained Spearman correlations varied between 0.40 (MCF7) and 0.67 (SKBR3) (Additional File 7: Figure S3B). To complement our analysis, we added the RNA-Seq data from other six TNBC cell lines (MDA-MB-157, Hs578T, HCC70, HCC1806, HCC1937 and HCC1143) and two non-TNBC cell lines (T47D and ZR75-1), which were available from GEO (see Additional file 8, Table S5, for a description of all presented data). All 14 cell lines were rendered comparable after proper normalization, despite variations in the applied sequencing methods (Additional File 7: Figure S3C). We first confirmed the TNBC status of the cell lines by verifying *ESR1*, *PGR1* and *ERBB2* expression levels (Additional File 9: Figure S4). A total of 4,033 DE genes were identified between the TNBC and non-TNBC cell lines, with 2,300 being upregulated and 1,733 being downregulated (Additional File 10: Figure S5A; Additional File 11: Table S6). As observed in the patient tissue data, unsupervised PCA clearly separated TNBC from non-TNBC cell lines (Additional File 10: Figure S5B), which was confirmed through hierarchical clustering (Additional File 10: Figure S5C).

By crossing the TNBC and non-TNBC DE gene lists obtained from the tissue and cell line analyses with the list of DE genes obtained in the comparison of TNBC versus normal tissues (Tri-dimensional plot in Figure 2A; Two-dimensional view in Additional File 12: Figure S6; Gene list in Additional File 13: Table S7), we identified 134 common downregulated and 243 common upregulated genes (Figure 2B). Curiously, pairwise correlations between fold-changes revealed a positive Pearson correlation of 0.35 in the comparison of TNBC vs. non-TNBC tissues with TNBC vs. non-TNBC cell lines (Additional File 12: Figure S6, most right), indicating agreement in the overall differential expression profiles. We then performed Gene Ontology (GO) analysis to verify whether the two types of samples exhibited common enriched biological processes, molecular functions and cellular components. Several of these processes and pathways were equally enriched in TNBC versus non-TNBC in both tissues and cell lines (Additional File 14: Figure S7). Considering our results together, we conclude that TNBC cells are distinct from normal tissues, which creates an interesting window for searching for therapeutic targets. Moreover, established cell lines retain a high resemblance to tumor tissues, making them good surrogates for testing potential new targets for treating TNBC.

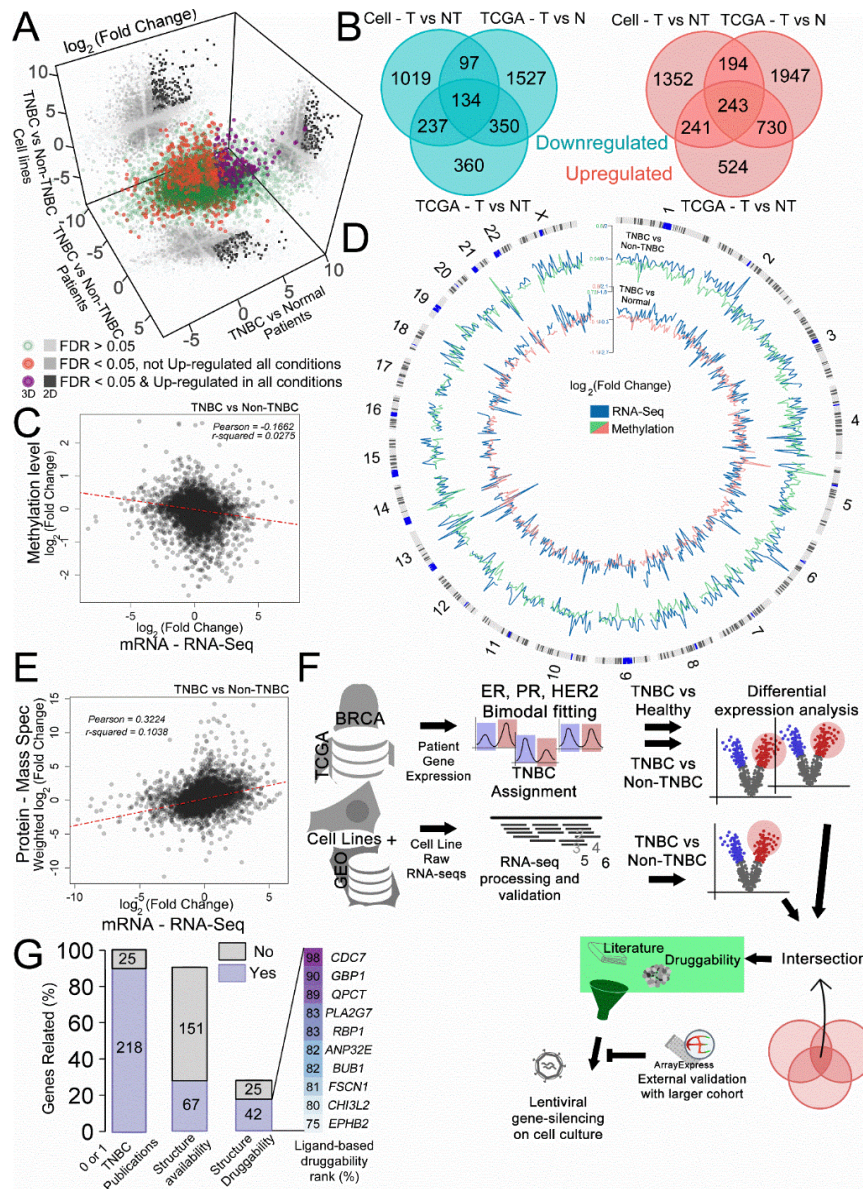


Figure 2: Transcriptomics and proteomics druggability analysis generated a list of new potential protein targets to treat TNBC.

(A) 3D correlation plot between FC of DE genes originating from comparisons of TNBC versus non-TNBC tissues, TNBC versus normal tissues and TNBC tissues versus non-TNBC cell lines. 2D projections of upregulated genes from each pairwise comparison are shown in dark gray. Unifying DE genes exhibiting an $FDR \leq 0.05$ and an $FC \geq +2$; $FDR \leq 0.05$ and $FC \leq -2$; or an $FDR > 0.05$ are shown with purple, orange and green circles, respectively. (B) Venn diagrams showing that 134 genes (B, left) were equally downregulated, while 243 (B, right) were equally upregulated in all three comparisons. (C) Probes covering CpG islands were related to genes based on TSS proximity and their methylation status (values for different probes were averaged) were correlated to the gene expression FC (TNBC x Non-TNBC). (D) Circos plot comparing CpG islands methylation FC (green or pink lines) with gene expression FC (blue line) in the TNBC x Non-TNBC (outer circle) or TNBC x normal (inner circle) (chromosome ideogram denoted in the most outer circle). Values for both methylation and gene expression FC were averaged within every 5 Mbp. FC opposite spikes indicate that the higher the methylation FC of group of island, the lower the gene expression FC of the associated region, and vice-versa. (E) Protein level FC (as obtained from a published MS dataset⁶⁴ performed with the same TCGA BRCA samples used in this work) and gene expression FC correlation in the comparison TNBC x Non-TNBC. (F) Pipeline used for discovering new protein targets for treating TNBC. (G) Number of genes from the final list found in two or more publications (25) or in 0 or 1 publication (218) following the PubMed query “gene name + triple-negative breast cancer”. The genes that were non-cited or were only cited once were then evaluated in canSAR as either having an available protein structure (67) or not (151), followed by a cutoff of being structurally druggable (42) or not (25). Among the 42 genes with a druggable structure, the top 10 assessed by the ligand-based druggability percentile are listed.

CpG methylation status of potential regulatory regions concur with expression level of DE genes.

Aside from the transcriptomic and genomic information available from the TCGA, the project also makes available methylation and proteomic (Reverse Phase Protein Array, RPPA) data for most of the samples found in the platform. DNA methylation is the most-studied epigenetic modification in mammalian cells and is characterized by the addition of a methyl group at the carbon-5 position of cytosine residues within CpG dinucleotides. Intrigued whether there was or not a correlation between the methylation status of CpG islands with the gene expression FC variation found in the TNBC versus non-TNBC and TNBC versus normal comparisons, we crossed the transcriptomic with the methylome data. To do so, DNA methylation data (Additional File 15: Figure S8A) was quantile normalized (Additional File 15: Figure S8B), logit transformed (Additional File 15: Figure S8C) and differentially methylated regions (DMR) defined in TNBC versus Non-TNBC and TNBC versus Normal tissue (Additional File 15: Figure S8D-E, Additional file 16: Table S8). Within the generated list of hypermethylated ($FC \geq +2$) and hypomethylated ($FC \leq -2$) regions found in the TNBC samples (in comparison to non-TNBC or normal samples) is a region already described for the PPFIA3 gene⁷⁰. Similarly, we found the islands cg10029842 and cg17473600 (chr1-47207; exon of *LHX8*) as hypermethylated in TNBC samples, as already described⁷⁰. Hypermethylation (as opposed to hypomethylation) of both islands are related to lower survival time in TNBC patients⁷⁰. Of note, we observed more hypomethylated (than hypermethylated) probes in TNBC, concurring with previous publications⁷¹.

DMRs may be present at CpG islands (regions larger than 200pb in length with $> 50\%$ GC content), shores (up to 2kb from CpG islands), shelves (2-4kb from CpG islands) and open-sea (isolated CpG in the genome)⁷². CpG islands placed at regions nearby to transcriptional start sites (TSS), when hypermethylated, are highly likely to cause gene downregulation, the opposite also being true⁷³.

When we analyzed only probes covering CpG islands, associated them to genes based on TSS proximity and related their methylation FC with the gene expression FC obtained from the TNBC x Non-TNBC comparison, we found a negative Pearson correlation of ~ -0.17 (Figure 2C). This data indicates that promoter region hypermethylation may partially explain the alteration in the expression level (the higher the methylation status, the lower the mRNA level) seen in the TNBC x Non-TNBC comparison. Coherence between higher gene expression level and lower methylation status (as well as the other way around) can be overall appreciated in the Circos plot of the Figure 2D. We concluded that alteration on the expression level status of the TNBC tissues (compared to Non-TNBC) can be partially explained by the methylation level of CpG islands placed nearby to the TSS of these genes.

TNBC x Non-TNBC gene expression fold change overall agrees with protein level fold change.

Higher or lower gene expression levels do not necessarily correlate to protein levels. We used the RPPA data to calculate protein FC in TNBC (compared to Non-TNBC and normal tissues). Then, we compared the protein FC with the gene expression FC of the TNBC versus Non-TNBC and TNBC versus normal tissues comparisons and found a Pearson correlation of 0.73 (Additional file 17: Figure S9A) and 0.46 (Additional file 17: Figure S9B), respectively. In parallel, we used mass spectrometry (MS) data available for the same BRCA group of patients used in our gene expression analysis⁶⁴ to evaluate the correlation between gene expression and protein level FC in TNBC versus Non-TNBC. Equally to the comparison performed with the RPPA data, the MS comparison displayed a positive Pearson correlation of 0.32 (Figure 2E and Additional file 17: Figure S9C). In summary, we found a positive correlation amongst gene expression and protein level FC in the evaluated gene lists.

Common overexpressed genes and druggability criteria used to reveal new potential targets for TNBC.

Using all of the gathered information, we created a pipeline for selecting new targets (Figure 2F). To do so, we took a closer look at the list of overexpressed genes. For 10% of the genes, there were at least two published papers linking them to TNBC (Figure 2G). The remaining 90% were then evaluated with the canSAR platform to search for druggable targets. canSAR is an integrated knowledge base that combines data on biology, pharmacology, structural biology, cellular networks and clinical annotations to provide druggability predictions⁷⁴. Out of the remaining 218 targets, 67 had available structure information, 42 of which presented structure-based druggability (Figure 2G), as they showed potential small molecule binding pockets in an analysis based on the ChEMBL Strudel (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/drugability/>) (DrugEBility) methodology. Among these genes, 10

exhibited ligand-based druggability scores falling within the 75% percentile or above defined for all of the proteins in the platform (Figure 2G). This parameter is an easy way to assess how a target's druggability compares with that of all other targets in the proteome and aims to estimate the likely druggability of a target based on the chemical properties and bioactivity parameters of small molecule compounds (including molecular weight, med-chem friendliness and ligand-efficiency) that have been tested against the protein itself and/or its homologues. If the target binds drug-like compounds, it is more likely to be druggable than a target that only binds compounds with very un-drug-like properties.

Guanylate-binding protein 1 (GBP1) is more expressed in TNBC. Cell Division Cycle 7 (*CDC7*), the first in the final top 10 list, has recently been described as a therapeutic target to treat TNBC^{75,76}. *GBP1* was listed second in the final list of potential druggable targets. *GBP1* is a member of an interferon-inducible gene family, the p65 guanylate-binding proteins (GBPs). GBPs are structurally related to the dynamins and another known antiviral protein family, the Mx proteins. *GBP1* is clearly overexpressed in TNBC tissues (Figure 3A, left) and cell lines (Figure 3A, right) and has at least 5 possible binding pockets for drug interactions (Figure 3B) as calculated by PockDrug⁵⁴. Moreover, *GBP1* protein level is also enhanced in TNBC compared to non-TNBC samples as evaluated by MS protein analysis (Figure 3C). The preferentially higher expression of *GBP1* in TNBC tissues *versus* non-TNBC tissues was further confirmed in 7 other microarray datasets (totaling 1,915 patients; Figure 3D), confirming *GBP1* as a potential new druggable target for this disease. All of the datasets were processed following the same approach used for the TCGA datasets (Additional File 18: Figure S10A). Our final list of overexpressed genes was finally crosschecked with the lists of overexpressed genes obtained from these 7 external microarray datasets, revealing intersections varying from 22% to 85% (Additional File 18: Figure S10B and C). Finally, by looking at the *GBP1* methylation status, we found an open-sea DMR in the 5' UTR region of the gene (Figure 3E, lower scheme), which is hypomethylated in TNBC samples when compared to normal and Non-TNBC samples (Figure 3E). This finding provides potential regulatory mechanism behind *GBP1* higher expression level on TNBC.

In order to access the impact of *GBP1* expression on the disease prognosis, we used the Nearest Centroid Classifier for Area Under Curve optimization (NCC-AUC) model⁷⁷ to integrate patient 5-years survival status with RNA expression level. By using a λ of 10^{-5} and θ -score cutoff of 10^{-5} , the analysis showed that ~17% of our final gene target list would be potential targets based on the impact of their expression level on patient survival, which did not include *GBP1* (Additional file 19: Table S9). Indeed, we verified that there is no difference on *GBP1* expression level in patients with less than 5 years survival time (Additional file 20: Figure S11) compared to patients with more than 5 years survival time ($p=0.49$). Altogether, our data show that *GBP1* is more expressed (and is also present at higher protein level) in TNBC, which may be related to hypomethylation of a CpG open-sea region present at the 5'UTR. *GBP1* higher expression did not affect TNBC patient prognosis.

Guanylate-binding protein 1 (GBP1) knock-down exclusively affects TNBC cell growth. Having shown that TNBC cell lines are good surrogates for studying the disease, we next confirmed that *GBP1* is more highly expressed in TNBC cell lines than in non-TNBC cell lines via qPCR (Figure 4A). We then tested the importance of *GBP1* for TNBC cell proliferation compared with non-TNBC cells. We assayed eight TNBC and three non-TNBC cell lines by knocking-down *GBP1* with two different shRNA sequences (with knock-down efficiencies of 68% and 81% as assessed via qPCR, Additional File 21: Figure S12A) and using a sequence targeting the Luciferase gene (*Luc*) as a negative control. Overall, knocking-down *GBP1* with either of the shRNA sequences resulted in more profound effects on the proliferation of TNBC cells than non-TNBC cells (Figure 4B and C). To evaluate long-term impact of *GBP1 knockdown* on cells that responded either dying (HCC1806 and MDS-MB-436) or proliferating less (Hs578t and MDA-MB-231) after *GBP1 knockdown*, we transduced cell lines and selected them to stably express the shRNA sequences. After checking the knocking down efficiency of the transduced cell lines (Additional File 21: Figure S12B), we evaluated cell proliferation for 7 days. The data showed that, while Hs578t and MDA-MB-231 maintained the slower proliferation behavior seeing on the endpoint assay (with the exception of the shRNA #1 tested on Hs578t), HCC1806 and MDA-MB-436 selected cells had their growth profoundly affected by the *knockdown* (Figure 4D), likely because of the increased rate of cell death seeing for these cells (Figure 4E and Additional File 21: Figure S12C). Accordingly, MDA-MB-231 cells expressing the sh*GBP1* #1 and #2, compared to control sh*Luc*, present a slight (but significant) percentage increase of cells in the G0-G1 phase, and a slight but significant percentage decrease of cells in the S phase, indicating cell growth arrest at the G0-G1 phase

(Additional File 21: Figure S12D-E). HCC1806 cells responded on the opposite direction (Additional File 21: Figure S12D-E). In summary, we demonstrated that GBP1 is overexpressed and important for the survival of a subgroup of TNBC cells.

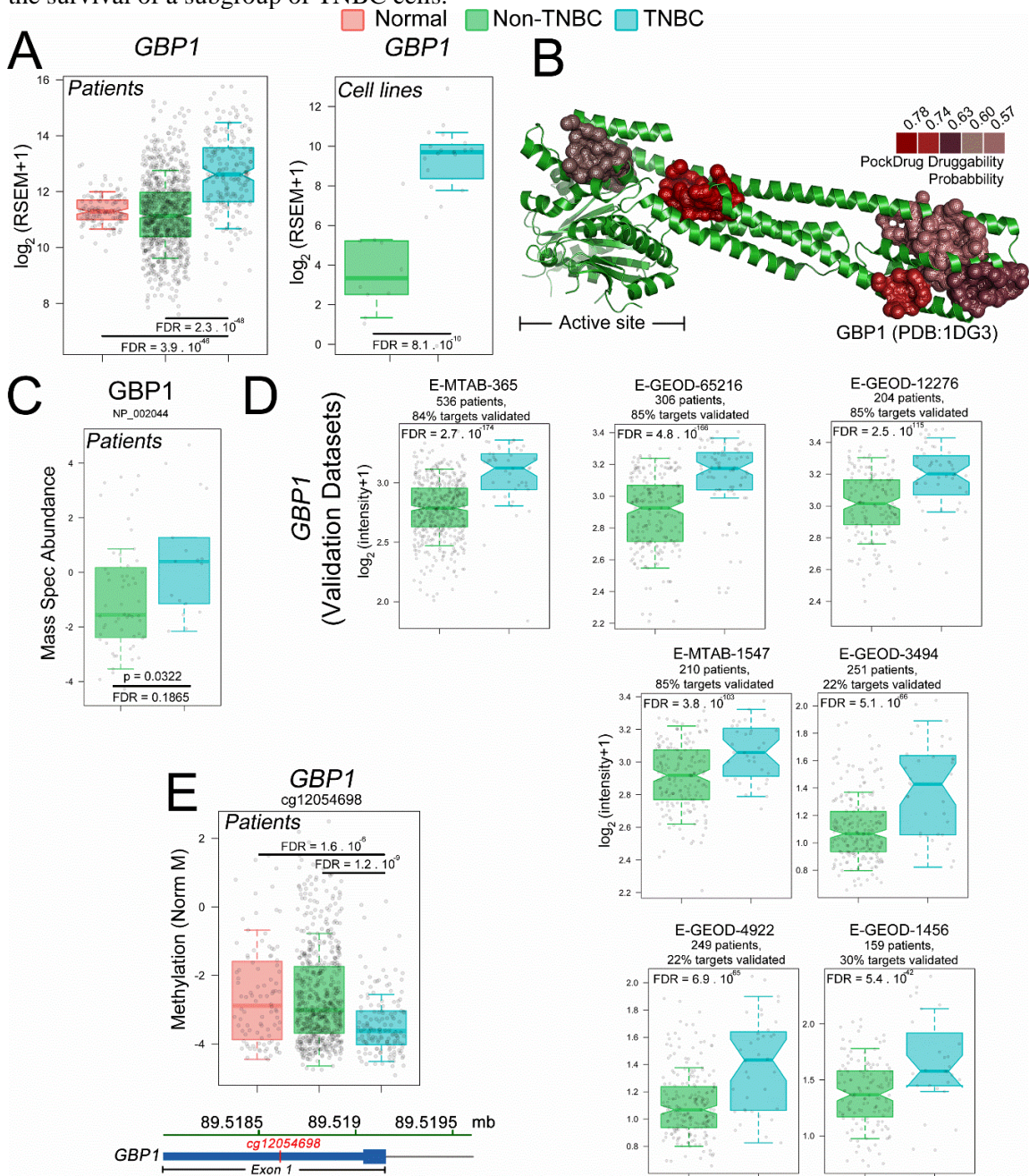


Figure 3: Multiple evidence sources makes GBP1 arise as potential target for TNBC.

(A) GBP1 is more highly expressed in TNBC than in non-TNBC and normal tissues (left) and in TNBC versus non-TNBC cell lines (right). FDR values were obtained from the DESeq2 comparisons. (B) Cartoon representation of the human GBP1 protein structure (PDB ID 1DG3), displaying the 5 highest-scoring potential small molecule binding pockets according to PockDrug⁵⁴. (C) MS evaluation of GBP1 protein level in Non-TNBC and TNBC samples. P-Value and FDR value were calculated with limma. (D) Seven microarray datasets external-to-our-pipeline analysis confirmed GBP1 upregulation in TNBC versus non-TNBC tissues. FDR values were derived from limma comparisons. (E, lower) GBP1 gene scheme denoting the open-sea probe cg12054698 location within the exon 1. (E, upper) Methylation status (as defined by M-values) for the cg12054698 in Normal, Non-TNBC and TNBC samples, showing hypomethylation in TNBC. FDR values calculated with limma. As for all the displayed box-plots, log₂-transformed upper-quantile values were used, with the whiskers extending to half of the interquartile range. Gray circles denote each sample. Notches, when present, denotes the 95% confidence intervals of the median.

GBP1 interaction network. To provide information on the functional connection of GBP1 with other cellular proteins, we performed an interaction network analyzes as implemented by the canSAR

platform. GBP1 either physically interact (directly or indirectly) or is functionally related to several proteins (Additional File 22: Supplementary Figure S13). GBP1 expression is induced by Interferon Regulatory factors (IRF) 2, 3 and 9, coherent with the GBP1 being a member of an interferon-inducible family⁷⁸. GBP1 is also a transcriptional target of the STAT 1 (which acts as a heterodimer with STAT2), a downstream effector of the interferon signaling pathway⁷⁹. The Protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1) methylates arginine residues of several proteins, including histones. GBP1 arginine methylation functionally connects PRMT1 to GBP1. Interferon-stimulated gene 15 (ISG15), a protein that adds itself covalently to other proteins (in a process similar to ubiquitination), was shown to physically interact with GBP1⁸⁰. Finally, the Specificity protein 1 (SP1), a transcriptional factor that controls many different cellular process, also binds to GBP1⁸¹. FNTA and FNTB are both subunits of the farnesyltransferase and the geranylgeranyltransferase complexes, which transfer a farnesyl or geranylgeranyl moieties to proteins, affecting their function. In summary, network interaction analysis performed by canSAR highlight the already known interplay of GBP1 with the interferon signaling pathway and implicate that disturbing GBP1 function in cells have the potential to impact such pathway. It also reveals binding partners related to diverse functions in the cells and may point to some yet unexplored roles of GBP1.

EGFR drives *GBP1* expression in breast cancer. EGFR is one of the major biomarkers of TNBC, predicting a poor outcome of the disease⁸², and it has been reported as a new target for treating TNBC⁸³. As expected, *EGFR* was found to be overexpressed in TCGA TNBC tissues compared with expression in non-TNBC tissues (Figure 4F, upper panel), in the in-house sequenced and GEO cell lines (Figure 4F, lower panel). RPPA analysis also confirmed that EGFR protein level is enhanced in TNBC compared to non-TNBC (Additional File 23: Figure S14). EGFR is known to control *GBP1* expression in glioblastoma and esophageal carcinoma¹⁸⁻²⁰, and (not surprisingly) we verified a positive correlation between *EGFR* and *GBP1* expression levels when TNBC and non-TNBC tissues (Pearson correlation coefficient = 0.41; Figure 4G, left panel) and cell lines (Pearson correlation coefficient = 0.67; Figure 4G, right panel) were compared. We also compared EGFR protein levels (according to the RPPA data) with *GBP1* expression levels, obtaining a Pearson correlation coefficient of 0.28 (Figure 4H). Furthermore, we confirmed the EGFR-signaling-dependent expression of GBP1 in breast cancer cell lines via qPCR (Figure 4I). A positive correlation was not observed when we compared *GBP1* and Y1173 or Y1068 EGFR phosphorylation levels in the patient tissue samples (data not shown) using the RPPA data. We conclude that EGFR controls *GBP1* expression in breast cancer cells.

Discussion

Several works have used transcriptomic analysis to improve the classification of TNBC and to obtain new predictive markers and therapeutic targets for the disease^{25,26,37,84-87}. In our approach, we integrated RNA-Seq data from normal and tumor tissues (obtained from TCGA) and from cell lines that were sequenced in-house or were available from the GEO databank. A unifying DE gene list was obtained from the comparisons of normal x TNBC tissues, TNBC x non-TNBC tissues and TNBC x non-TNBC cell lines. Methylome and proteomic data were integrated to our analysis to give further support to our findings. A total of 243 genes were shown to be exclusively overexpressed in TNBC tissues and established cell lines and, importantly, were more highly expressed in TNBC than in non-transformed breast epithelial tissues. Subsequently, we searched for novelty by removing genes that have already been strongly linked to TNBC by analyzing publications listed in PubMed. Finally, we subjected our list to druggability scoring using the multidisciplinary canSAR platform. With the canSAR platform, we were able to predict gene products that could be used as therapeutic targets based on protein structure availability, the presence of potential small molecule binding pockets and information regarding the pre-existence of bio-active compounds (drugs or chemical probes) that have already been tested on a target or its homologues. Thus, we combined transcriptomic and proteomic approaches to enhance our chances of identifying proteins with true potential to become new therapeutic targets.

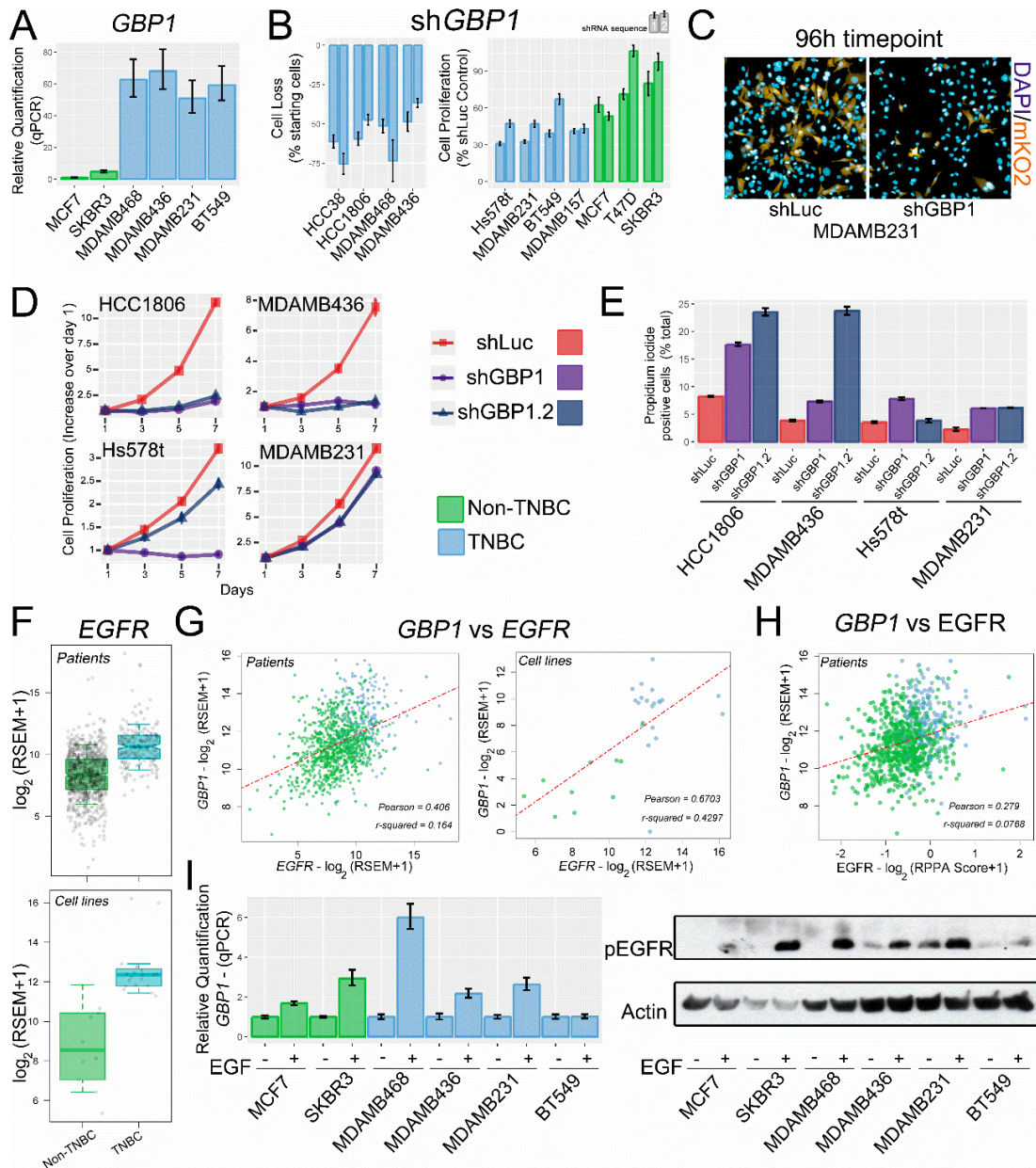


Figure 4: TNBC are more sensitive to GBP1 knock-down than non-TNBC cells. GBP1 expression is controlled by EGFR.

(A) GBP1 mRNA levels were evaluated via quantitative PCR in different cell lines. (B) GBP1 knock-down (shGBP1) using pLKO.mKO2 system for 96 h affected the growth of TNBC cells more effectively than that of non-TNBC cells, as assessed using two shRNA sequences. An shRNA targeting non-human gene luciferase (shLuc) was used as a control. Data were split between cells that died (left) and cells that proliferated less (right) after *knockdown*. (C) Representative fluorescence microscopy images of MDA-MB-231 after 96 hours of GBP1 knock-down compared with shLuc. DAPI staining of nuclei is shown in light blue, and mKO2 fluorescence of cells positive for viral transduction is shown in yellow. The image highlights that shGBP1 decreased the number of cells that were positive for shGBP1 expression. (D) Cell proliferation assay (performed over 7 days) of cell lines selected to stably express the shGBP1 and shLuc sequences. (E) Propidium iodide incorporation assay was performed to evaluate the fraction of cells that are in apoptosis/late necrosis state. EGFR is more highly expressed in TNBC than non-TNBC tissues (F, top) and cell lines (F, down). The FDR value was absent in DESeq2 comparisons due to outlier removal. (G) GBP1 and EGFR expression levels are highly correlated in tissues (left) and cell lines (right). (H) GBP1 expression level positively correlates with EGFR total protein level. Log₂-transformed upper-quantile RSEM expression values were used, with whiskers extending to half of the interquartile range. Gray circles denote each sample. Notches denote the 95% confidence interval of the median. (I) MDA-MB-231 cells were serum starved for 24 hours and then stimulated with 50 ng/mL of EGF for six hours. Western blotting (right) confirmed that the treatment increased EGFR stimulation (increase of Tyr1068 phosphorylation). qPCR (left) showed that, with the exception of BT549, all tested cell lines responded to EGF stimulation by increasing GBP1 expression. Error bars denote one standard error of the experimental replicates.

Moreover, by comparing the GO signatures of the cell lines and tissue transcriptomic data, we showed that cell lines could serve as good surrogates for testing these potential new targets, and we used them to show that *GBP1* (the second highest ranked gene on the final list) knock-down selectively affected TNBC cell growth. *GBP1* expression is controlled by EGFR in glioblastoma^{18,19} and esophageal squamous head and neck cancers²⁰ and is important for proliferation and tumor invasion. In addition, *GBP1* is linked to radiotherapy resistance in head and neck tumors²³ and is a component of the cytoskeletal gateway of drug resistance in ovarian cancer^{21,22}, especially for paclitaxel, which is a common therapeutic choice for treating TNBC⁸⁸. Class III β -tubulin plays an important role in the development of drug resistance to paclitaxel by allowing the incorporation of *GBP1* into microtubules. Upon entering the cytoskeleton, *GBP1* binds to pro-survival kinases, such as Proto-oncogene Serine/threonine-protein kinase pim-1 (*PIM1*), and initiates a signaling pathway that induces resistance to paclitaxel⁸⁹. Indeed, a 4-aza podophyllotoxin derivative was demonstrated to act as a potent *in vitro* inhibitor of the *GBP1*:*PIM1* interaction, which is a property that is maintained *in vivo* in ovarian cancer cells resistant to paclitaxel⁹⁰. Taken together, these findings confirm *GBP1* as a druggable protein.

It is well known that the TNBC is a very heterogeneous breast cancer subtype⁹¹. In saying so, it was not out of surprise that the tested TN cell lines responded heterogeneously to the *GBP1* knockdown: Out of the 8 tested cell lines, while 4 presented increased cell death, 4 responded by decreasing cell proliferation in comparison to control. Moreover, *GBP1* expression level did not impact on patient's 5 years survival as evaluated by the NCC-AUC model. Indeed, we observed that the cell lines that were more impacted by *GBP1* knockdown are, following a molecular sub-classification of the disease³⁷, Basal-like 1 (BL1) and 2 (BL2) cells (with the exception of MDA-MB-436). On the other hand, the cell lines that had only its proliferation affected after *GBP1* knockdown are, all of them, mesenchymal (M) or mesenchymal stem-like subtypes (MSL)³⁷. Top gene ontologies for the BL1 and BL2 subtype are heavily enriched in cell cycle and cell division components and pathways, as well as growth factor signaling. Differently, the M and MSL subtype display gene ontologies that are heavily enriched in components and pathways involved in cell motility, ECM receptor interaction, and cell differentiation pathways. The MSL, in particular, presents enrichment of genes associated with stem cells and mesenchymal stem cell-specific markers, and low expression of claudins³⁷. We hypothesize that higher expression levels of *GBP1* may have a more severe impact on the survival of a subgroup of TNBC patients with specific molecular markers.

EGFR is overexpressed in a high proportion of the TNBC cases^{82,92} and is a marker of a poor prognosis⁹³⁻⁹⁵. Although *EGFR* has been successfully used as a therapeutic target for many tumor types⁹⁶, unencouraging results have been obtained in clinical trials (in both mono- and adjuvant therapy protocols) conducted in TNBC patients⁹⁷. Failure to induce inhibition of Akt has been reported as a major cause of resistance to *EGFR* inhibitors^{97,98}. Moreover, nuclear *EGFR* (n*EGFR*) can enhance resistance to anti-*EGFR* therapies and correlates with poor overall survival in breast cancer. Inhibition of n*EGFR* nuclear translocation leads to subsequent accumulation of *EGFR* on the plasma membrane, which greatly enhances the sensitivity of TNBC cells to cetuximab⁹⁹. We demonstrated that *GBP1* expression correlates with *EGFR* expression (and protein levels) in both tissues and breast cancer cell lines. In most of the tested cell lines, we showed that the *GBP1* expression level responded to *EGFR* stimulation by epidermal growth factor.

Conclusions

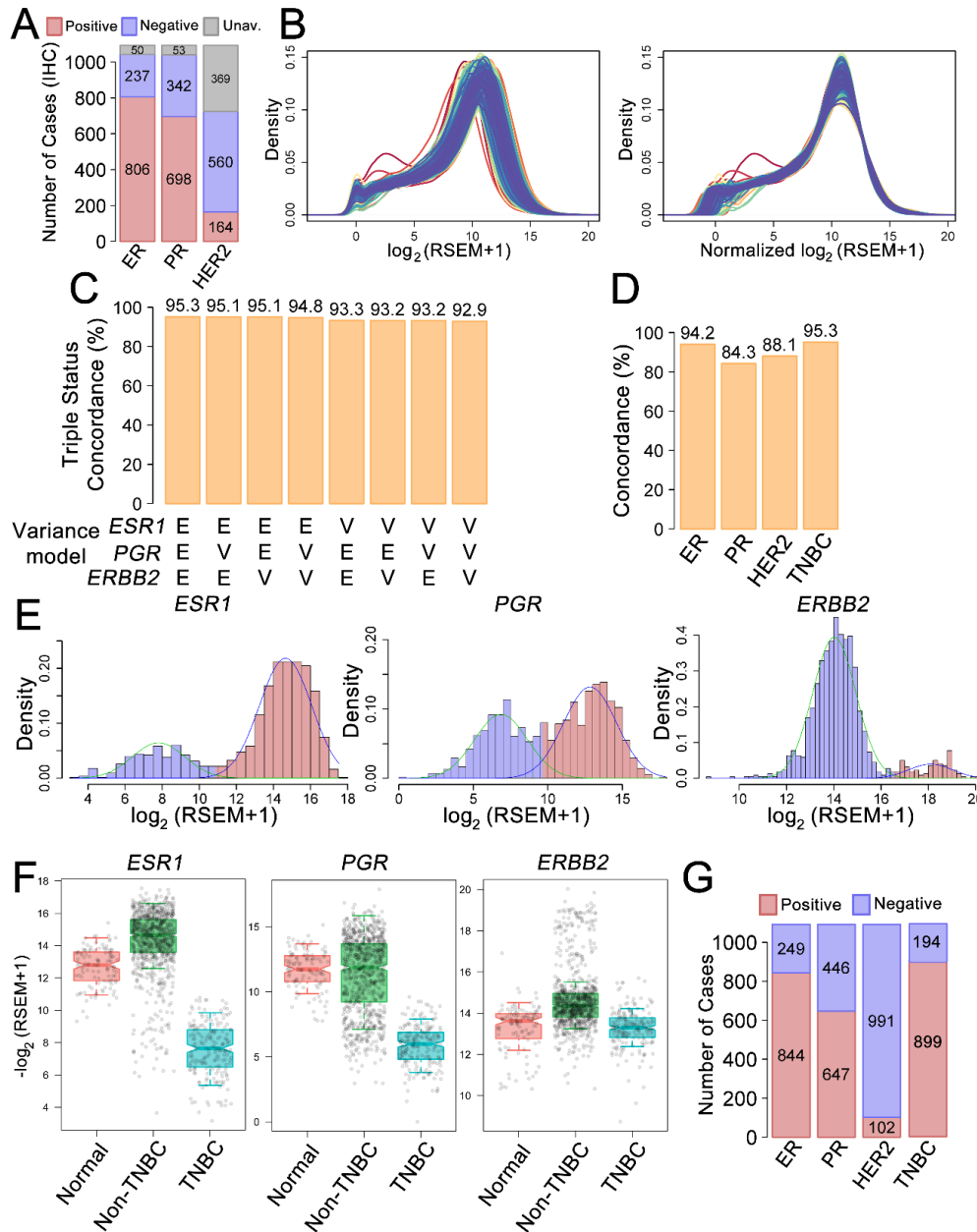
TNBC is an aggressive histological breast cancer subtype with limited treatment options and very poor prognosis following progression after standard chemotherapeutic regimens. For that, finding new therapeutic targets to fight this disease is of great importance. In this work, by using a combination of transcriptomics and proteomics analysis, we generated a list of 243 potential new therapeutic targets for treating TNBC. Second on this list, we show that *GBP1* expression correlates with *EGFR* stimulation and is important for TNBC cell proliferation. In summary, we propose that *GBP1* is a new potential druggable therapeutic target for treating TNBC with enhanced *EGFR* expression.

List of abbreviations

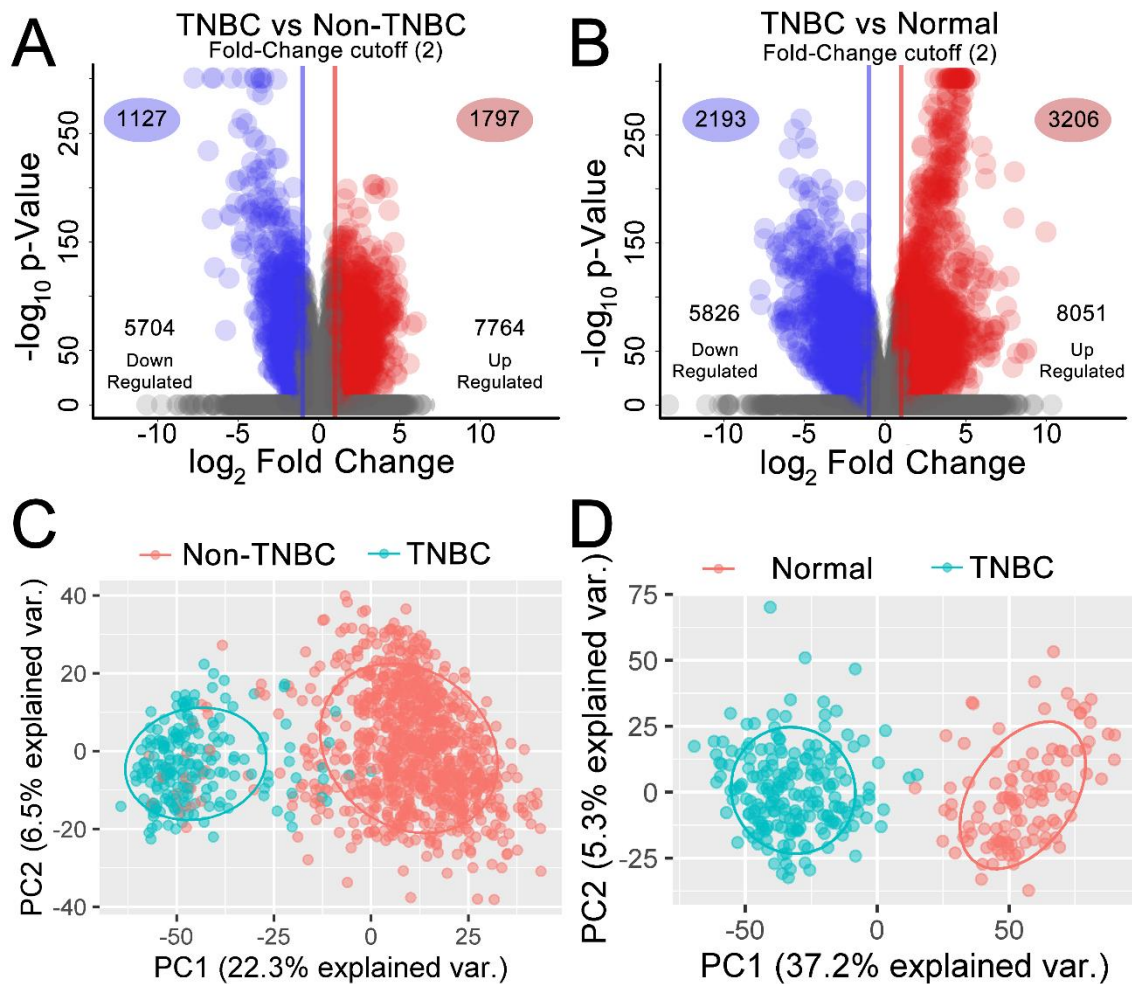
ATCC: American Type Culture Collection; BL1: Basal-like 1; BL2: Basal-like 2; BRCA: Breast Invasive Carcinoma; DE: differentially expressed; DRA: DDBJ Sequence Read Archive; EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid; EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor; ER: Estrogen receptor

protein; ERBB2: epithelial growth factor receptor gene; ESR: Estrogen receptor gene; PGR: progesterone receptor gene; FC: fold change; FDR: false discovery ratio; GBP1: Guanylate-Binding Protein 1; GBPs: guanylate-binding proteins; GEO: Gene Expression Omnibus; GO: Gene Ontology; HER2: Epidermal growth factor Receptor 2 protein; HTSF: High-Throughput Sequencing Facility; HUGO: Human Genome Organisation; IHC: immunohistochemistry; LaCTAD: High-Performance Technologies Central Laboratory; Luc: luciferase; MOI: multiplicity of infection; M: Mesenchymal; mKO2: monomeric Kusabira-Orange 2 fluorescence protein; MSL: Mesenchymal stem-like; Na₃VO₄: Sodium orthovanadate; NaCl: Sodium chloride; NaF: Sodium fluoride; NCC-AUC: Nearest Centriod Classifier for Area Under the Curve; nEGFR: nuclear Epidermal Growth Factor Receptor; NGS: Next-generation Sequencing; PBS: phosphate buffered saline; PCA: principal component analysis; PCR: Polymerase chain reaction; EGF: Epidermal Growth Factor; PIM1: Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase pim-1.; PMSF: Phenylmethanesulfonyl fluoride; PR: Progesterone receptor protein; PVDF: Polyvinylidene difluoride; RNA-Seq: mRNA sequencing; RPPA: Reverse phase protein array; RSEM: RNA-Seq by Expectation-Maximization; SDS: Sodium dodecyl sulfate; SRA: NCBI Sequence Read Archive; TCGA: The Cancer Genome Atlas; TNBC: Triple-Negative Breast Cancer; Tris-HCl: Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride; UCSC: University of California, Santa Cruz; UNC: University of North Carolina at Chapel Hill; UNICAMP: University of Campinas; WGCNA: Weighted Correlation Network Analysis.

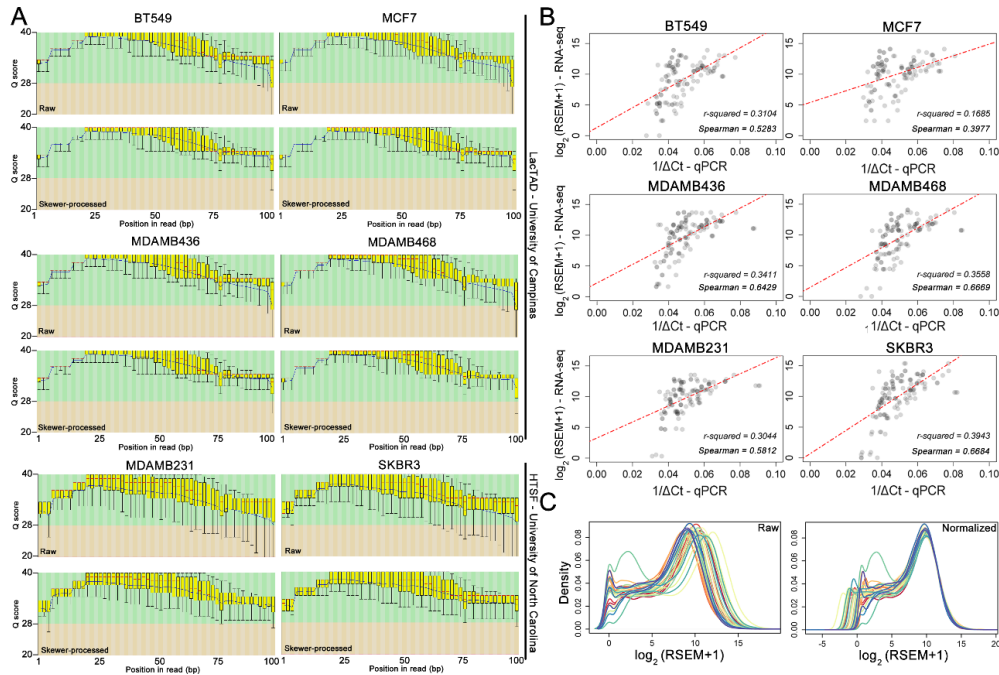
Apêndice 4: Material Suplementar “Guanylate-binding protein-1 is a potential new therapeutic target for triple-negative breast cancer “



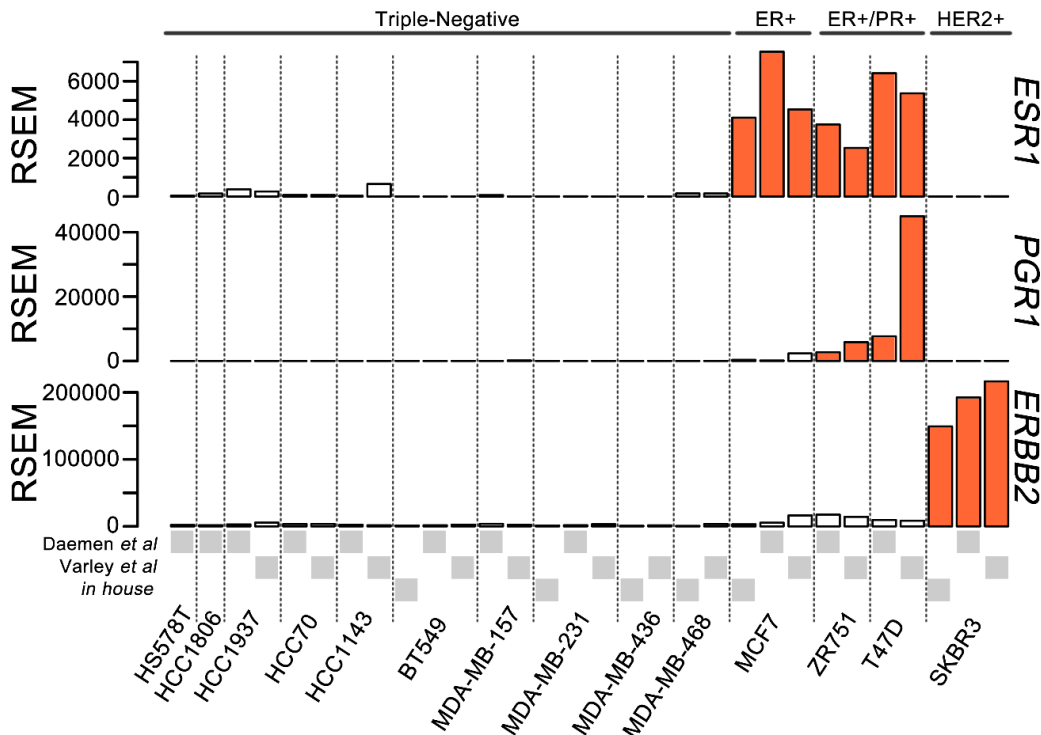
Additional File 1. Figure S1. Assignment of breast cancer marker status according to TCGA using RNA expression levels. (A) Number of samples positive for ER, PR and Her2, as determined via IHC and available from the TCGA. In more than 30% of the tissues, at least one of the markers was not classified. (B) Density graph of the raw \log_2+1 transformed RSEM of all genes in the 1,100 samples RNA-Seq dataset, showing that the maximum density values largely deviated around an RSEM of 10 (left). Normalization performed with upper-quantile³⁵ methodology harmonized all of the datasets (right). (C) mClust³⁹ was used to fit bimodal distribution patterns and define samples that were positive or negative for the expression of *ESR1*, *PGR* and *ERBB2*. To do so, some assumptions were made and tested to search for the best combination of assumptions based on the percentage of agreement with the available IHC data. “E” denotes “equal variance between populations”, and “V” denotes “variable variance between populations”. (D) Concordance between expression (using the EEE combination) and IHC data for each marker as well as for all three combined. (E) Bimodal fits, as implemented by mClust with the EEE combination, highlighting samples that are negative (purple) and positive (light pink) for *ESR1* (left), *PGR* (middle) and *ERBB2* (right). (F) Boxplots of the \log_2 -transformed upper-quantile RSEM of the *ESR1*, *PGR* and *ERBB2* markers in normal, non-TNBC and TNBC tissues. The whiskers extend to half of the interquartile range. Gray circles denote each sample. Notches denote the 95% confidence interval of the median. (G) Assignment of marker status assignment based on RNA expression levels.



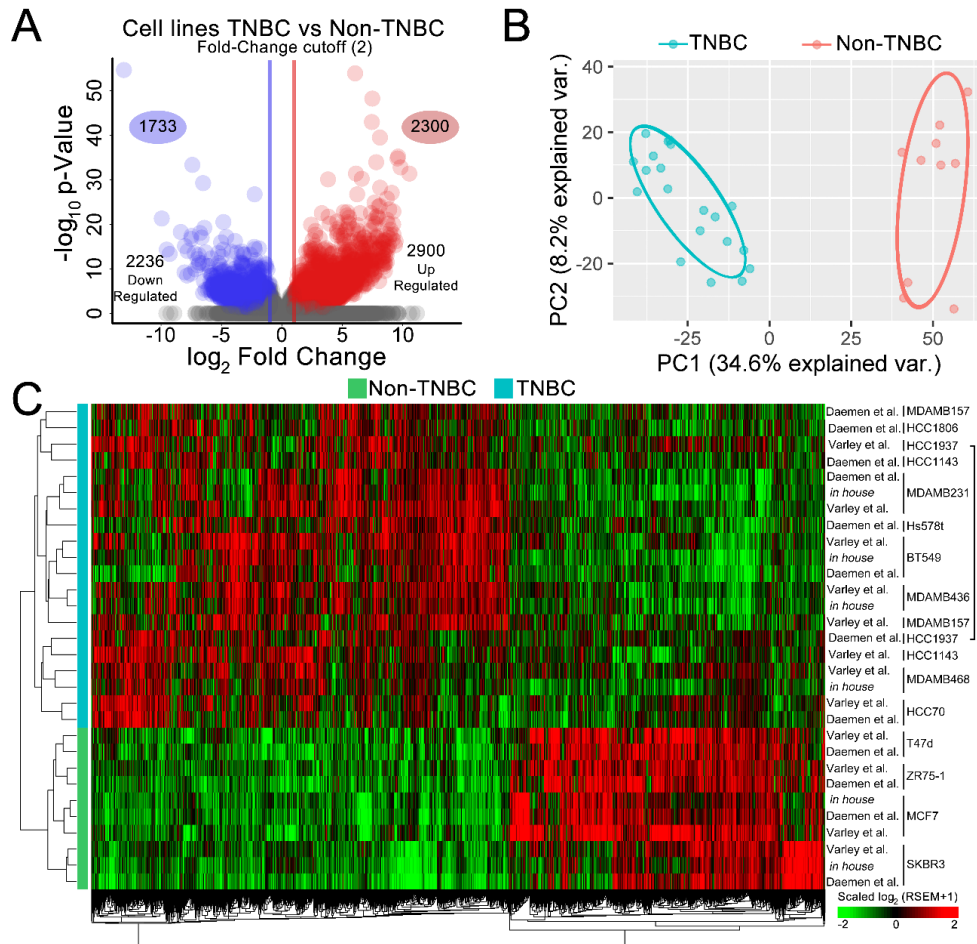
Additional File 5. Figure S2. Analysis of TNBC *versus* non-TNBC and TNBC *versus* normal DE genes from the TCGA samples. Volcano plot of the FC of the genes TNBC *versus* non-TNBC (A) and TNBC *versus* normal (B) comparisons. Non-DE (or DE but with a p-value > 0.05) genes are indicated with gray circles, while DE genes are indicated with blue circles when downregulated and red circles when upregulated. Genes showing an FC $\geq +2$ and FC ≤ -2 , with an FDR ≥ 0.05 , were considered up- and downregulated, respectively. The numbers outside the circles refer to all genes that passed the FDR cutoff, while the numbers inside the circles are DE genes that passed both the FDR and fold-change cutoffs. Principal component analysis using DE genes obtained from TNBC *versus* non-TNBC (C) and TNBC *versus* normal tissues (D) comparisons. PCA correlations are denoted with circles around the samples.



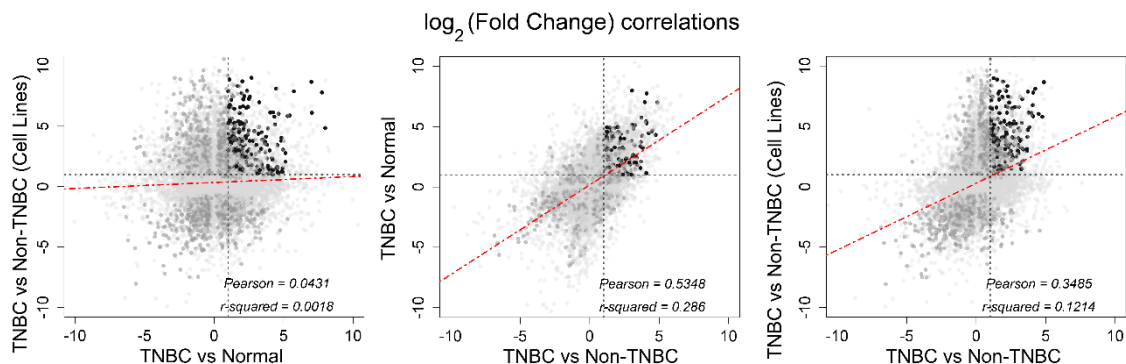
Additional File 7. Figure S3. Quality assessment of RNA-Seq data. (A) FastQC³⁰ plot of the Phred scores of each nucleotide position of all reads before and after Skewer³¹ trimming for BT549, MCF7, MDAMB436 and MDAMB468, sequenced at LaCTAD-UNICAMP, and MDAMB231 and SKBR3, sequenced at HTSF-UNC. (B) RNA-Seq data from in-house-sequenced cell lines were evaluated for reproducibility by comparing the log₂ RSEM +1 values of 48 genes with the obtained qPCR 1/ΔCt values. Density of raw log₂-transformed RSEM values for the in-house-sequenced and Varley *et al.*²⁵ and Daemen *et al.*²⁶ datasets (C, left) and the normalized RSEMs (C, right), showing success in the harmonization of all data, despite variations in sample preparation and sequencing.



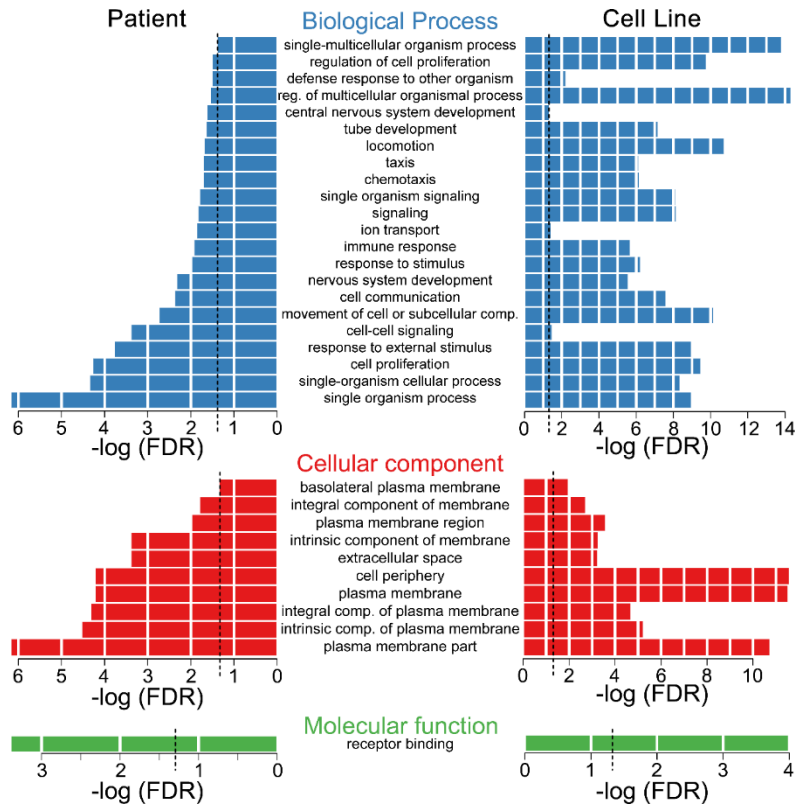
Additional File 9. Figure S4. Cell lines exhibit the expected *ESR*, *PGR* and *ERBB2* marker expression status. Linear range of RSEM from *ESR1* (upper), *PGR1* (middle) and *ERBB2* (lower) for the *in house* and external RNA-Seq datasets. Gray boxes below data indicate the study related to the dataset (*in house*, Varley *et al.*²⁵ and Daemen *et al.*²⁶).



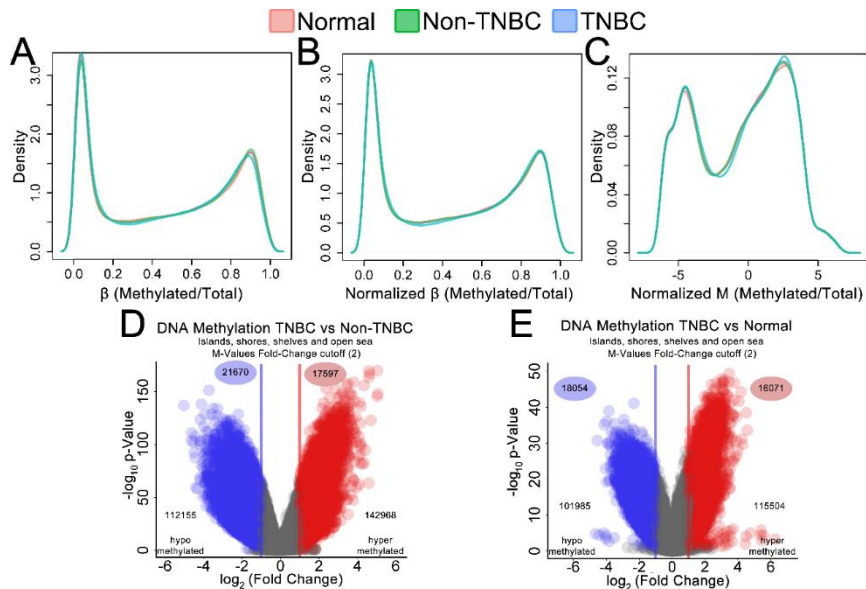
Additional File 10. Figure S5. Analysis of DE genes in TNBC *versus* non-TNBC cell lines. (A) Volcano plot of the FC and p-values of the genes. Non-DE (or DE but with p-value > 0.05) genes are shown with gray circles, and DE genes are shown with blue circles when downregulated and red circles when upregulated. Genes with an FC $\geq +2$ and an FC ≤ -2 , with an FDR ≥ 0.05 , were considered up- and downregulated, respectively. The numbers outside of circles refer to all genes that passed the FDR cutoff, while the numbers inside of circles are DE genes that passed both the FDR and fold-change cutoffs. Principal component analysis (B) and correlation heatmap (C) using DE genes obtained from the comparison. PCA correlations are denoted with circles around the samples. Heatmap correlations were obtained through Pearson coefficient analysis; unsupervised clustering was conducted via the complete method, and both axis and $\log_2(\text{RSEM}+1)$ values were scaled by line.



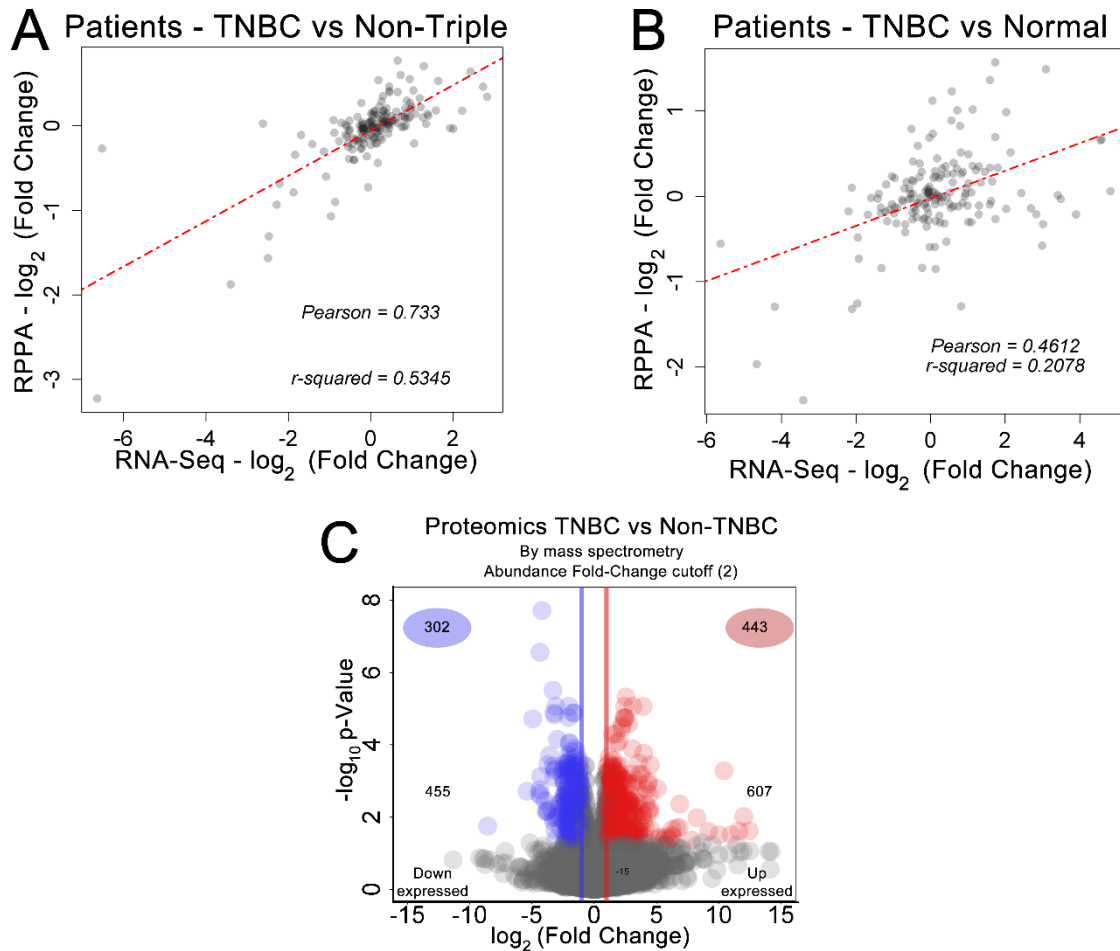
Additional File 12. Figure S6. Correlation plots. 2D correlation plots (equivalent to the 2D projections in Figure 2A) of the FC of DE genes obtained from the comparisons of TNBC *versus* non-TNBC cell lines and TNBC *versus* normal tissues (left), TNBC *versus* normal tissues and TNBC *versus* non-TNBC tissues (middle), and TNBC *versus* non-TNBC cell lines and TNBC *versus* non-TNBC tissues (right).



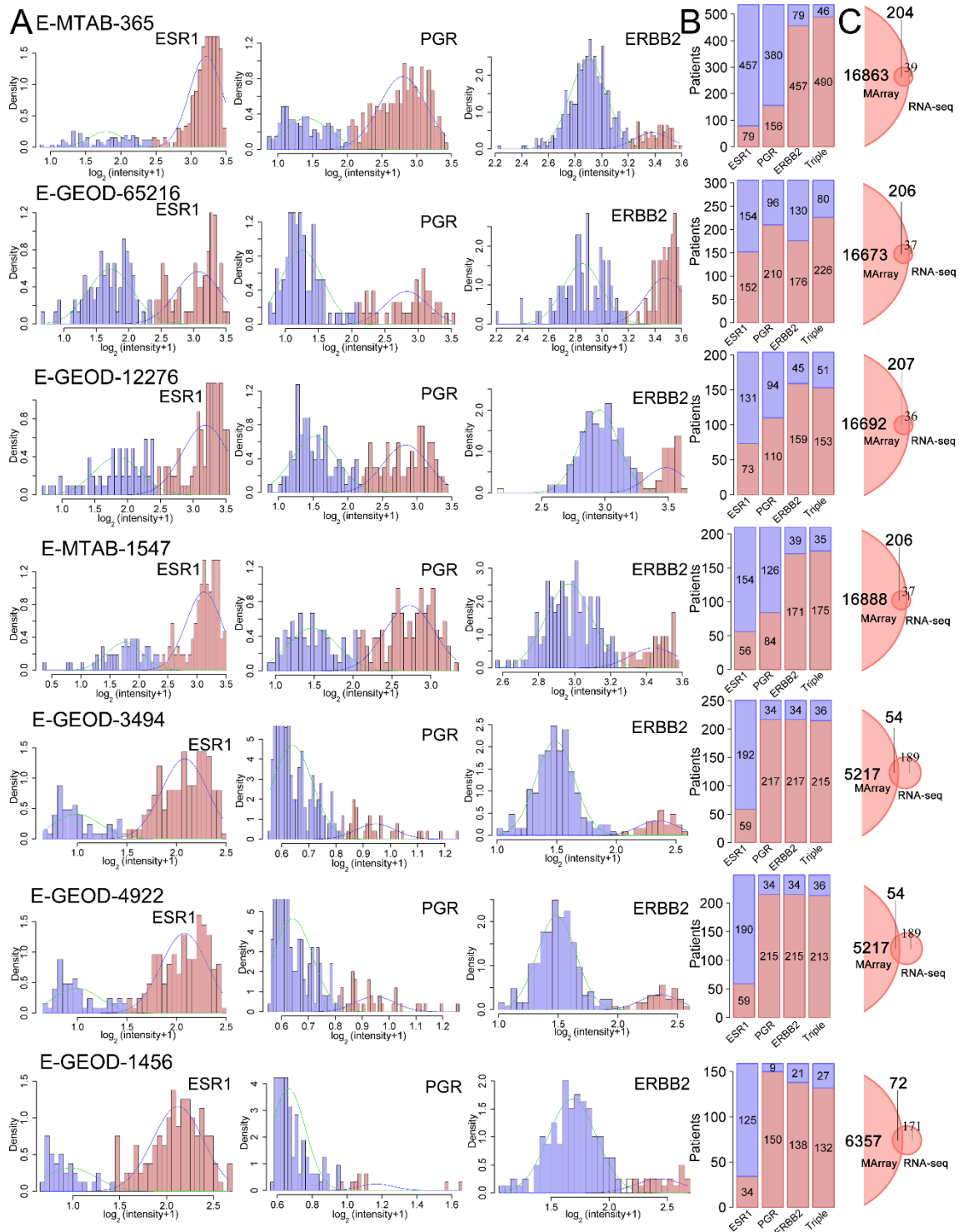
Additional File 14. Figure S7. GO analysis of altered pathways in TNBC tissues and cell lines (compared with non-TNBC samples). Biological processes (blue), cellular components (red) and molecular functions (green) equally enriched in TNBC tissues (left) and cell lines (right). These pathways point to events occurring on the membrane, associated with signaling activity and cell motility. Each box denotes 1 order of magnitude of FDR reduction; dashed black lines highlight an FDR = 0.05.



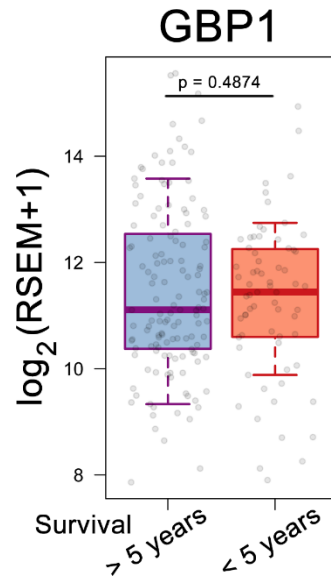
Additional File 15. Figure S8. Analysis of Infinium HumanMethylation450 BeadChip methylation array from 876 TCGA samples, including TNBC, Non-TNBC and normal tissues. (A) Raw Kernel density plot from β methylation ratios (methylated / total signal) for each category (TNBC, Non-TNBC or normal tissue). (B) Quantile normalized Kernel density plot of β methylation ratios, as implemented by wateRmelon⁵⁵. (C) Quantile normalized Kernel density plot of M-Values (Logit transformation of β normalized ratios), showing the peaks alignment. Volcano plot of the FC and adjusted p-values of the methylation probes in TNBC vs Non-TNBC (D) and TNBC vs normal (E) comparisons. Non-differentially methylated (DM) probes (or differentially methylated one but with p-value > 0.05) are shown as gray circles. DM probes are shown as blue circles when hypermethylated and red circles when hypomethylated. Probes with a FC $\geq +2$ or an FC ≤ -2 , with an FDR < 0.05, were considered hyper- and hypomethylated, respectively. The numbers outside of circles refer to all probes that passed the FDR cutoff, while the numbers inside of circles are DM probes that passed both the FDR and fold-change cutoffs.



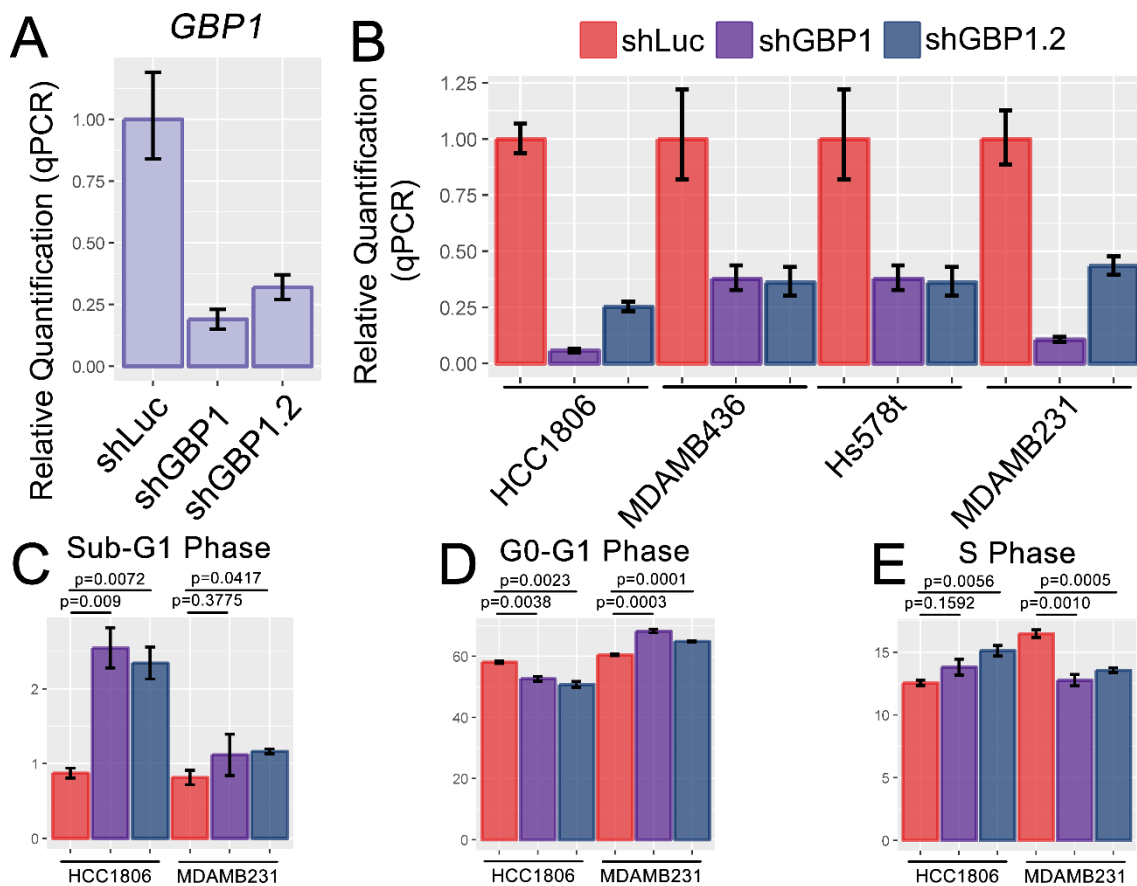
Additional File 17. Figure S9. Proteomic analysis of BRCA tissues by using the RPPA and MS data. (A) Comparison between protein level FC (available from RPPA) and mRNA level FC in TNBC vs Non-TNBC (A) and TNBC vs normal (B) comparisons. RPPA data are limited to only 160 proteins. (C) Volcano plot of the FC versus adjusted p-values of proteins from MS dataset⁶⁴ in TNBC vs Non-TNBC comparison. Non-DE (or DE but with p-value > 0.05) proteins are shown as gray circles, and DE proteins are shown as blue circles when down-regulated and red circles when up-regulated. Proteins with an FC $\geq +2$ and an FC ≤ -2 , with an FDR < 0.05, were considered up- and down-regulated, respectively. The numbers outside of circles refer to all proteins that passed the FDR cutoff, while the numbers inside of the circles are DE proteins that passed both the FDR and fold-change cutoffs.



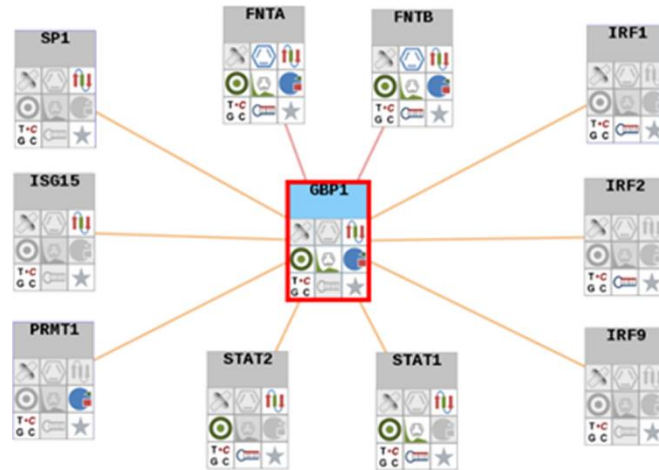
Additional File 18. Figure S10. Evaluation of external Array Express datasets. (A) E-MTAB-365, E-GEOD-65216, E-GEOD-12276, E-MTAB-1547, E-GEOD-3494, E-GEOD-4922 and E-GEOD-1456 expression profiles of ESR1, PGR and ERBB2 and bimodal adjustment (green for samples with lower expression and blue for samples with higher expression). (B) Number of tissues negative (pink) and positive (purple) for each marker as well as for all three markers. (C) Venn diagrams between our identified target list and the upregulated genes identified through TNBC versus non-TNBC analysis of all external datasets. At the intersection of the smaller (genes from our list) and larger circles (upregulated genes from the external datasets), the numbers and percentages of genes in agreement are provided, positioned upwards.



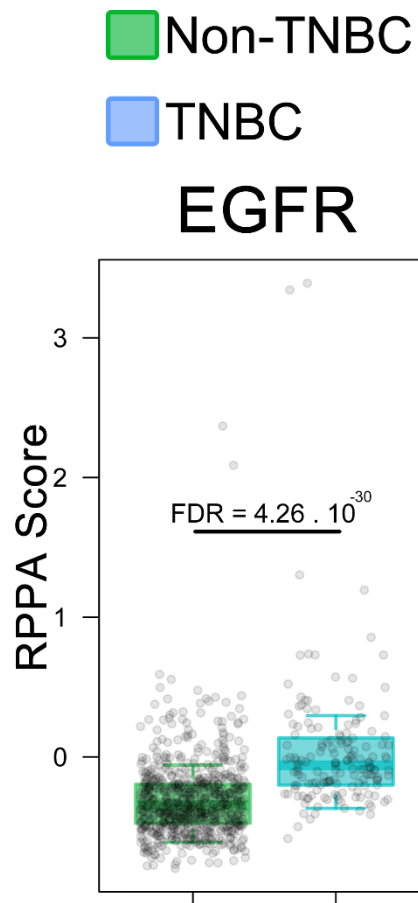
Additional File 20. Figure S11. Expression level of *GBP1* in patients divided by survival time (more than 5 years survival or less than 5 years survival). The whiskers extend to half of the interquartile range. Gray circles denote each sample. Notches denote the 95% confidence interval of the median. P-Value from Welch's t-test.



Additional File 21. Figure S12. *GBP1* knockdown evaluation and its effect on cell cycle. (A) qPCR of MDA-MB-231 after *GBP1* knock-down, as performed in the end-point assay. (B) qPCR of HCC1806, MDA-MB-231, Hs578t and MDA-MB-231 cells transduced and selected with puromycin to stably express the shRNA sequences. Cell Cycle analysis using DNA content evaluation (as determined by DAPI intensity staining) was executed after imaging attached cells by microscopy. Cells were classified being at the SubG1 (C), G0-G1 (D) or (E) S phase. Error bars represents standard error of the mean. P-Values from Welch's t-tests.



Additional File 22. Figure S13. GBP1 Interaction network as defined with the canSAR platform.



Additional File 23. Figure S14. Boxplot of RPPA EGFR protein level comparing Non-TNBC with TNBC samples. The whiskers extend to half of the interquartile range. Gray circles denote each sample. Notches denote the 95% confidence interval of the median.

Anexo 1: Autorização da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do CNPEM

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: 2015-46

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança do CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

Título do projeto: Estudo de vias anapleróticas alternativas à glutamina em câncer de mama triplo-negativo.

Pesquisador responsável: Sandra Martha Gomes Dias

Experimentador: Larissa Menezes dos Reis

Classe de risco do OGM: Risco I Risco II

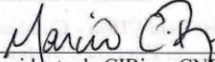
Nível do treinamento do experimentador: -Iniciação científica, -mestrado, -doutorado, -doutorado direto, -pós-doutorado, -nível técnico, -outro, especifique: _____

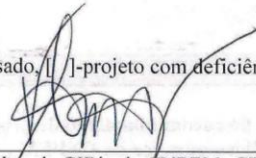
Resumo do projeto: O câncer de mama triplo-negativo é caracterizado pela ausência dos receptores de hormônios progesterona e estrogênio e do receptor de membrana HER2 e, por isso, não responde aos tratamentos convencionais da doença. Alterações no metabolismo celular estão ligadas ao surgimento e progressão deste tipo tumoral, sendo, portanto, novas promessas na busca de alvos terapêuticos. O consumo excessivo de glutamina é parte das alterações metabólicas sofrida por diversos tipos tumorais, sendo importante para a anaplerose ou reposição dos intermediários do Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA) que são utilizados em vias biossintéticas da célula. Estudos realizados sugerem que a dependência de glutamina é variada em linhagens de câncer de mama triplo-negativo. Ensaios de qPCR de células privadas de glutamina ou de células pouco dependentes deste aminoácido versus células dependentes, mostraram o aumento na expressão de genes relacionados principalmente às vias de glicólise/gliconeogênese e metabolismo de lipídeo (beta-oxidação), sugerindo a participação dessas vias na compensação da falta de glutamina (ou baixa necessidade deste nutriente) para manutenção do ciclo do TCA. O presente projeto tem como objetivo o estudo dessas vias nas linhagens MDA-MB-157, MDA-MB-468 e BT549, pouco dependentes de glutamina. Como estratégia, realizaremos knock down dos genes que tiveram suas expressões aumentadas na ausência de glutamina em cada linhagem e avaliaremos o impacto desse bloqueio em adição à ausência de glutamina por ensaios de proliferação, apoptose, formação de colônia e migração/invasão. Para o estudo dos nutrientes responsáveis pela compensação da ausência de glutamina e os processos celulares em que esses estão envolvidos, utilizaremos cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), utilizando nutrientes marcados (13C e 15N).

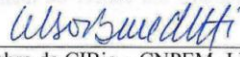
Os genes ACAA2 (humano, *Homo sapiens*), PCCB (humano, *Homo sapiens*), PC (humano, *Homo sapiens*), PCK (humano, *Homo sapiens*), mKO2 (Coral, *Fungia concinna*, com adição de mutações) e as sequências regulatórias de GLS (humano, *Homo sapiens*) serão clonados em vetores retrovirais murinos para avaliar efeitos da superexpressão. O *knockdown* será realizado por meio de vetores lentivirais codificando sequências de RNAi. Os vetores retrovirais e lentivirais utilizados são defectivos, não se replicam, não são patogênicos e nem infecciosos. O experimentador recebeu treinamento de biossegurança e está sendo orientado pelo supervisor para o cumprimento de todos os requisitos necessários para manipulação, armazenamento e descarte de OGM risco II, conforme regulamentações da CTNBio e ANVISA


A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 5/8/2015.

Parecer final: -projeto aprovado, []-projeto recusado, []-projeto com deficiências, comentários anexo.

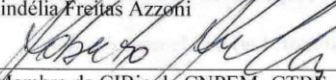

Presidente da CIBio – CNPEM-LNBio
Marcio Chaim Bajgelman


Membro da CIBio da CNPEM -CTBE
Fabio Márcio Squina


Membro da CIBio – CNPEM -LNBio
Celso Eduardo Benedetti


Membro da CIBio da CNPEM -CTBE
Sindélia Freitas Azzoni


Membro da CIBio – CNPEM -LNBio
Carolina Borsoi Moraes H. Freitas


Membro da CIBio da CNPEM -CTBE
Roberto Ruller

[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]



Anexo 2: Declaração de direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **AUMENTO DE BETA-OXIDAÇÃO CONFERE RESISTÊNCIA À INIBIÇÃO DE GLUTAMINASE EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 29 de agosto de 2017

Assinatura : Larissa Meneses dos Reis
Nome do(a) autor(a): **Larissa Meneses dos Reis**
RG n.º 459811228

Assinatura : Sandra Martha Gomes Dias
Nome do(a) orientador(a): **Sandra Martha Gomes Dias**
RG n.º M7854719