



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN Y DEL PROTEOMA MITOCONDRIAL
DE LOS SUBTIPOS MOLECULARES LUMINAL A Y BASAL-LIKE DE CÁNCER
DE MAMA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. ARIADNA JAZMÍN ORTEGA LOZANO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. VICENTE MADRID MARINA

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CD. UNIVERSITARIA, CD.MX., AGOSTO DE 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos Institucionales

Se agradece a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 637627 para realizar mis estudios de doctorado y por el apoyo económico con número de proyecto A1-S7495, al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con número de proyecto IN202219 e IN200922, y al programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (PAIP) 5000-9105 de la Facultad de Química.

A mi tutor principal el Dr. José Pedraza Chaverri por su asesoría y apoyo durante la realización de mis estudios de doctorado.

A mi comité tutorial conformado por el Dr. Vicente Madrid Marina y el Dr. Alejandro García Carrancá por su asesoría y recomendaciones durante el desarrollo del trabajo.

Agradecimientos personales

Al Dr. José Pedraza Chaverri por recibirme, apoyarme y permitirme trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Omar Emiliano Aparicio Trejo por su asesoramiento y ayuda en los experimentos de respirometría.

Al M. en C. Alfredo Briones Herrera por su asesoramiento y ayuda en los experimentos de potencial de membrana y de respirometría.

Al M. en C. Leopoldo Gómez Caudillo por su ayuda con los análisis estadísticos de proteómica.

A mis compañeras de laboratorio, especialmente a la Dra. Tania Gómez Sierra y a la Dra. Alexis Paulina Jiménez Uribe por los buenos momentos y consejos compartidos.

Dedicatoria

A mis padres y familia por todo su apoyo y amor incondicional.

Y a ti por ser el recuerdo de amor, fuerza y perseverancia constante.

“Alea iacta est”

Julio Cesar

Índice

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción.....	3
1.1. Clasificación molecular del cáncer de mama	4
1.2. Factores de riesgo asociados al cáncer de mama	6
1.3. Mitochondria y cáncer	6
1.3.1. Dinámica mitocondrial	7
1.3.2. Biogénesis mitocondrial y mitofagia.....	8
1.3.3. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	9
1.3.4. Reprogramación del metabolismo energético en el cáncer	10
1.3.4.1. Efecto Warburg	11
1.3.4.2. OXPHOS.....	12
1.3.4.3. Firma bioenergética	13
1.3.5. Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	14
1.4. Proteómica y cáncer.....	14
2. Justificación.....	15
3. Hipótesis	16
4. Objetivos	17
4.2. Objetivo general.....	17
4.3. Objetivos particulares	17
5. Materiales y Métodos	17
5.1. Reactivos	17
5.2. Cultivo celular.....	18

5.3. Extracción de proteínas totales	19
5.4. Western blot	19
5.5. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	21
5.6. Estimación de masa mitocondrial.....	21
5.7. Determinación de la producción mitocondrial ROS	22
5.8. Control respiratorio celular	22
5.9. Análisis estadístico.....	23
5.10. Análisis del proteoma mitocondrial en tumores con cáncer de mama ..	23
6. Resultados	26
6.1. Reducción de la fisión mitocondrial en la línea celular MDA-MB-231 y aumento de la fusión mitocondrial en la línea celular MCF7.....	26
6.2. Biogénesis mitocondrial y mitofagia en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama	28
6.3. Desacoplamiento mitocondrial en las líneas MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama.....	31
6.4. Sobreexpresión de HIF-1 α asociada a la reprogramación metabólica en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama	33
6.5. Estado funcional mitocondrial en líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama	34
6.6. Aumento de la producción de ROS en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama	36
6.7. Proteoma mitocondrial de los subtipos moleculares luminal A y basal-like de cáncer de mama	38
6.8. Alteraciones mitocondriales características en el cáncer de mama de tipo A luminal y basal-like	42

6.9. Firma proteómica de la OXPPOS en cáncer de mama luminal A y basal-like	45
7. Discusión.....	48
8. Conclusiones.....	54
9. Perspectivas.....	55
10. Bibliografía.....	56

Índice de figuras

Figura 1. Estimación del número de casos y muertes de los 10 tipos de cáncer con mayor incidencia en mujeres de todas las edades de todo el mundo en el 2020. ...	3
Figura 2. “Hallmarks del cáncer.....	11
Figura 3. Efecto Warburg.	12
Figura 4. Flujo del proceso de análisis estadístico y bioinformático de los datos proteómicos de las muestras de cáncer de mama.	25
Figura 5. Dinámica mitocondrial en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama.....	27
Figura 6. Aumento de la masa mitocondrial en la línea celular MDA-MB-231 y reducción de la masa mitocondrial en la línea celular MCF7.	29
Figura 7. Aumento de los marcadores de mitofagia en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama. (A) Western Blots representativos.....	31
Figura 8. Disminución del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama.	32
Figura 9. Reprogramación metabólica en líneas celulares MC7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama.....	34
Figura 10. Eficiencia respiratoria mitocondrial de las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama.	35

Figura 11. Aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231.	37
Figura 12. Análisis de agrupamiento jerárquico.	39
Figura 13. Análisis del proteoma mitocondrial de los tumores luminal A y basal-like.	41
Figura 14. Alteraciones mitocondriales características en el cáncer de mama de tipo luminal A y basal-like.....	44
Figura 15. Perfiles de expresión de proteínas de la OXPHOS en los subtipos luminal A y basal-like del cáncer de mama.....	47
Figura 16. Esquema integrativo de las alteraciones en la dinámica y bioenergética mitocondrial en los subtipos moleculares luminal A y basal-like.	54

índice de tablas

Tabla 1. Inmunoperfil característico e incidencia para los subtipos moleculares de cáncer de mama.....	5
--	---

Índice de abreviaturas y acrónimos

Abreviatura	Significado
$\Delta\Psi_m$, PMM	Potencial de membrana mitocondrial
ΔpH	Gradiente de protones
ACP	Análisis de componentes principales
AMPK	Cinasa activada por monofosfato de adenina
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina bovina
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CI	NADH-ubiquinona oxidoreductasa
CII	Succinato-Q oxidoreductasa
CIII	Ubiquinona citocromo c oxidoreductasa
CIV	Citocromo c oxidasa
CV	ATP sintasa
CI-NDUFB8	NADH-ubiquinona oxidoreductasa- subcomplejo beta subunidad 8
CII-SDHB	Succinato-Q oxidoreductasa- subunidad de azufre de hierro
CIII-UQCR2	Subunidad 2 del complejo citocromo b-c1
CIV-MTCO1	Citocromo c oxidasa-subunidad 1
CV-ATP5A	Subunidad alfa de la ATP sintasa F1
CR	Control respiratorio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Drp1	Proteína 1 relacionada con la dinamina
EDTA	Ácido de etilendiaminotetracético
ETC	Cadena de transporte de electrones
FIS	Fisión mitocondrial
FUS	Fusión mitocondrial
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2
HCl	Ácido clorhídrico
HIF1 α	Factor inducible por hipoxia 1 α

LC3	Cadena ligera asociada a microtúbulos 3
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem
MIT	Mitofagia
MMO	Organización de membrana mitocondrial
Mnf1	Mitofusina 1
Mnf2	Mitofusina 2
mtARNP	Ácido ribonucleico polimerasa mitocondrial
NRF 1	Factores respiratorios nucleares 1
NaF	Fluoruro de sodio
Na ₃ VO ₄	Ortovanato de sodio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sodio dibásico
Na ₄ P ₂ O ₇	Pirofosfato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NRF 2	Factores respiratorios nucleares 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
Opa1	Atrofia óptica 1
OXPHOS	Sistema de fosforilación oxidante
p62	Proteína del gen SQSTM1
P	Respiración asociada a la OXPHOS
pAKT	Proteína cinasa B fosforilada
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos
PC	Componentes principales
PGC-1 α	Receptor gamma 1 α activado por el proliferador de peroxisomas
Pink1	Cinasa 1 inducida por PTEN
PMSF	Fluoruro de fenimetilsulfonilo
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
TBS-T	Solución amortiguadora salino de tris con Tween 20 al 0.1%
TFAM	Factor de transcripción A mitocondrial
RE	Receptor de estrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP	Receptor de progesterona

SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SQSTM1 (p62)	Sequestosoma 1
TCA	Ciclo del ácido tricarbóxico
TCGA	Atlas del Genoma del Cáncer
TEMED	1,2-bis (dimetilamino) etano
VDAC	Canal de aniones dependiente de voltaje
Wb	Western blot

Resumen

El cáncer de mama es el más prevalente y de mayor mortalidad entre las mujeres de todo el mundo. Aunque la clasificación molecular del cáncer de mama ha sido una herramienta útil para el diagnóstico y la predicción del tratamiento del cáncer de mama, aún continúa en desarrollo para mejorar el diagnóstico y encontrar nuevas dianas terapéuticas. La disfunción mitocondrial es una característica crucial del cáncer, que puede asociarse a la agresividad de esta enfermedad. Aunque la importancia de la dinámica mitocondrial en el cáncer es bien reconocida, su implicación en el contexto de la función mitocondrial y la bioenergética en los subtipos moleculares de cáncer de mama ha sido poco explorada. En este estudio, mediante experimentos para evaluar la función mitocondrial, bioenergética en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, y análisis estadísticos y bioinformáticos del proteoma mitocondrial de tumores de cáncer de mama clasificados como luminal A y basal-like, demostramos que los tumores basal-like presentan una alteración en la dinámica de la fusión y fisión mitocondrial; una función mitocondrial deteriorada pero no completamente inactiva; y un fenotipo Warburg, asociado a la disminución de los complejos I y III del sistema de fosforilación oxidante (OXPHOS). Junto con los resultados obtenidos en las líneas celulares y el análisis del proteoma mitocondrial, se propusieron dos firmas mitocondriales: una firma que refleja alteraciones en las funciones mitocondriales y una segunda firma exclusivamente de OXPHOS, que permiten distinguir entre tumores luminal A y basal-like de cáncer de mama.

Abstract

Breast cancer (BC) is the most prevalent cancer and the one with the highest mortality among women worldwide. Although the molecular classification of BC has been a helpful tool for diagnosing and predicting the BC treatment, developments are still being made to improve the diagnosis and find new therapeutic targets. Mitochondrial dysfunction is a crucial feature of cancer, which can be associated with cancer aggressiveness. Although the importance of mitochondrial dynamics in cancer is well recognized, its involvement in mitochondrial function and bioenergetics in BC molecular subtypes has been scantily explored. In this study, we combined mitochondrial function and bioenergetics experiments in MCF7 and MDA-MB-231 cell lines with statistical and bioinformatics analyses of the mitochondrial proteome of luminal A and basal-like tumors. We demonstrate that basal-like tumors exhibit a vicious cycle between mitochondrial fusion and fission; impaired but not completely inactive mitochondrial function; and the Warburg effect, associated with decreased oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes I and III. Together with the results obtained in cell lines and mitochondrial proteome analysis, two mitochondrial signatures were proposed: one signature reflecting alterations in mitochondrial functions and a second signature exclusively for OXPHOS, which allow us to distinguish between luminal A and basal-like tumors.

1. Introducción

El cáncer de mama es la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad entre las mujeres de todo el mundo. De acuerdo con los datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2020 se detectaron 2.2 millones de casos y se registraron 685,000 fallecimientos causados por esta enfermedad (Figura 1). Se estima que para el 2040 se registrarán aproximadamente 3.2 millones de casos de cáncer de mama y un millón de decesos por esta enfermedad y que una de cada 12 mujeres enfermará de cáncer mama, lo que lo convierte en un problema de salud mundial [1].

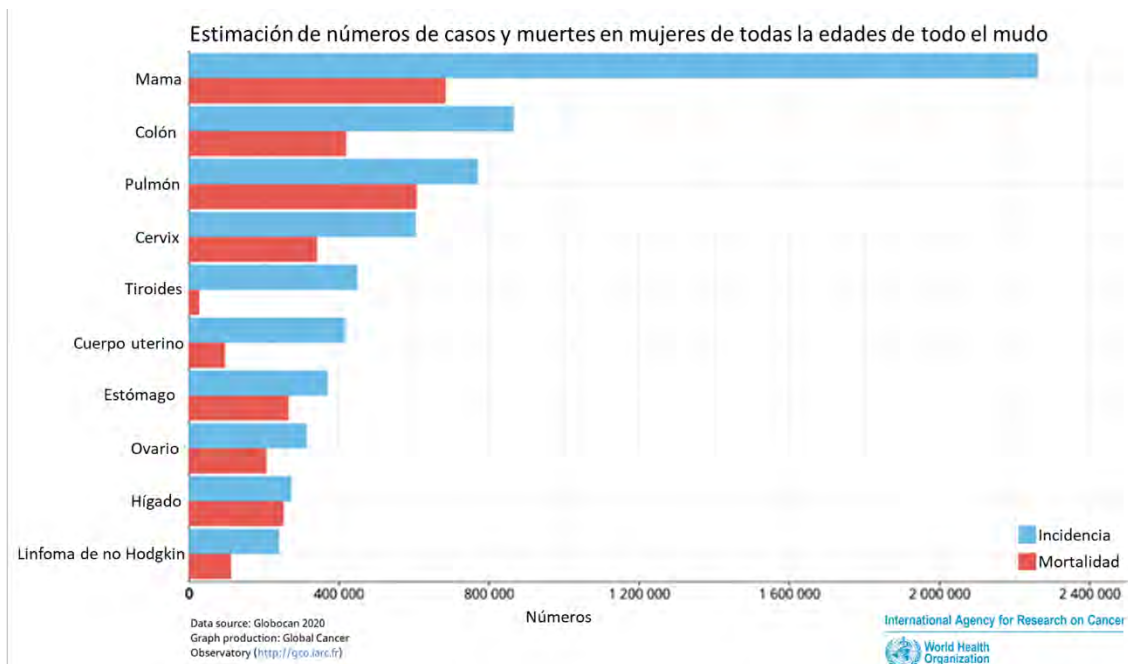


Figura 1. Estimación del número de casos y muertes de los 10 tipos de cáncer con mayor incidencia en mujeres de todas las edades de todo el mundo en el 2020. El cáncer de mama es la neoplasia que ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad entre las mujeres de todo el mundo. De acuerdo con los datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2020 se detectaron 2.2 millones de casos y se registraron 685,000 fallecimientos causados por esta enfermedad. Modificado de Globocan 2020 [2].

El cáncer de mama es una enfermedad que se caracteriza por una gran complejidad y heterogeneidad a nivel biológico, molecular y clínico [3]. Actualmente, en el diagnóstico del cáncer de mama se toman en cuenta varias características clínicas

y moleculares del tumor. Clínicamente, se evalúa el tamaño del tumor, estado ganglionar y el grado de invasión, sin embargo, a través de estos parámetros no se refleja la heterogeneidad que caracteriza a esta enfermedad [4].

1.1. Clasificación molecular del cáncer de mama

Los estudios moleculares basados en el análisis de los perfiles de expresión de los genes de tumores de cáncer de mama han permitido redefinir la clasificación de esta enfermedad principalmente en cuatro subtipos moleculares: luminal A, luminal B, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y basal-like [5]. Adicionalmente, a nivel clínico se ha demostrado que la detección por inmunohistoquímica de los receptores de estrógenos (RE), progesterona (RP), HER2 y del marcador de proliferación Ki-67 proporcionan información útil y altamente coherente con la clasificación molecular (Tabla 1) [5,6].

El perfil característico para el subtipo luminal A es positivo para el receptor de estrógenos y/o progesterona, HER2 negativo y una expresión menor del 14% del marcador de proliferación Ki-67 (RE+ y/o RP±, y HER2- y Ki-67<14%). Los tumores clasificados como luminal B se caracterizan por ser RE+ y/o RP±, y HER2± y Ki-67>14%. El subtipo HER2 se caracteriza por la ausencia de receptores de estrógeno y de progesterona y un aumento de expresión de HER2 (RE-, RP- y HER2+). Y el subtipo basal-like se caracteriza por la ausencia de expresión de estos tres biomarcadores (RE-, RP- y HER2-), por lo que es también conocido como triple negativo [4,5]. La determinación de estos marcadores y la incorporación de la clasificación molecular del cáncer de mama a la clínica ha sido de gran valor, ya que refleja la gran heterogeneidad biológica que caracteriza a esta enfermedad, provee un diagnóstico y tratamiento más preciso, y también permite predecir el riesgo de recurrencia [7].

En este trabajo fueron seleccionados los subtipos moleculares luminal A y basal-like para su estudio, debido a que son dos tipos de cáncer de mama con diferente incidencia en la población y con características clínicas y moleculares contrastantes. El cáncer de mama luminal A es el subtipo con mayor incidencia, representa entre

el 50 y 60% de todos los casos de cáncer de mama diagnosticados [6]. Debido a que estos tumores se caracterizan por expresar los RE y RP son considerados como tumores hormono dependientes, por lo que las mujeres diagnosticadas con este tipo de cáncer de mama presentan mejor respuesta a las terapias endocrinas (hormonales) como el tamoxifeno o los inhibidores de la aromatasa [6,8,9]. Además, se ha observado que los tumores de tipo luminal A son menos agresivos, de bajo grado, tienen menor tasa de recaída, mayor probabilidad de supervivencia [8].

Mientras que el cáncer de mama basal-like representa aproximadamente el 10-20% de todos los casos de cáncer de mama diagnosticados. Se caracterizan por su alta agresividad y capacidad proliferativa en comparación del resto de los subtipos moleculares de cáncer de mama [10]. Debido a que este tipo de tumores se caracterizan por la ausencia de expresión de los RE, RP y HER2 es considerado terapéuticamente huérfano, ya que no expresa un blanco al cual se pueda dirigir una terapia específica. Por esta razón, es que se dedican mayores esfuerzos en la búsqueda de potenciales marcadores de utilidad terapéutica [11,12].

Subtipo	Inmunoperfil	Incidencia
Luminal A	RE+ y/o RP±, Her2- y Ki67<14%	50-60%
Luminal B	RE+ y/o RP±, Her2± y Ki67>14%	10-20%
Her2+	RE-, RP- y Her-2+	15-20%
Basal-like	RE-, RP- y Her-2-	10-20%

- Refleja la heterogeneidad biológica
- Mejor diagnóstico
- Predicción de respuesta terapéutica
- Predicción riesgo de recurrencia

Tabla 1. Inmunoperfil característico e incidencia para los subtipos moleculares de cáncer de mama. El cáncer de mama se puede clasificar en cuatro subtipos moleculares principalmente, el subtipo luminal A se caracteriza por ser positivo para el receptor de estrógenos (RE) y/o progesterona (RP), negativo para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y una expresión menor del 14% del marcador de proliferación Ki-67; el luminal B por ser RE+ y/o RP±, y HER2± y Ki-67>14%; el subtipo HER2 por ser RE-, RP- y HER2+ y el subtipo basal-like por ser RE-, RP- y HER2-, por lo que es también conocido como triple negativo.

1.2. Factores de riesgo asociados al cáncer de mama

Entre los factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer de mama se encuentran, el factor hereditario, las mutaciones genéticas, historial reproductivo, y el estilo de vida. Sin embargo, alrededor del 50% de los casos de cáncer de mama no se encuentran asociados a mutaciones genéticas o al factor hereditario

Se sabe que la existencia de antecedentes familiares con cáncer de mama incrementa el riesgo hacia las mujeres para presentar esta enfermedad. Sin embargo, aproximadamente el 10% de los casos de cáncer de mama se encuentran relacionados al factor hereditario [7]. Se ha identificado que las mujeres que presentan mutaciones en los genes supresores de tumores *BRCA1* y *BRCA2*, están asociadas con el 90 % de los cánceres de mama hereditarios [3].

Adicionalmente, factores relacionados al estilo de vida como la falta de actividad física, la obesidad, el consumo de alcohol y el tratamiento hormonal sustitutivo se encuentran asociados con alrededor del 20% de los casos de cáncer de mama [7]. Adicionalmente, la menarquía, el comienzo de la menopausia después de los 55 años de edad, son otros factores de riesgo asociados con el desarrollo del cáncer de mama [3].

1.3. Mitocondria y cáncer

La mitocondria es un orgánulo multifacético y altamente dinámico. Entre las funciones en la que las mitocondrias se encuentran involucradas están la generación de adenosín trifosfato (ATP) para la generación de energía celular, el almacenamiento de calcio para la señalización celular y en la mediación de los procesos de proliferación y muerte celular [13]. La homeostasis y función mitocondrial está regulada por la interacción entre la dinámica mitocondrial, la biogénesis y la mitofagia. Esta regulación contribuye a la adaptación de las células al ambiente celular [14,15].

Por otra parte, entre los procesos mitocondriales que se han encontrado alterados en la carcinogénesis se encuentran la dinámica mitocondrial, la biogénesis

mitocondrial, la mitofagia, el potencial de membrana mitocondrial, el metabolismo energético mitocondrial, el sistema de fosforilación oxidante (OXPHOS) y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés) [14,16].

Por lo tanto, la mitocondria se ha convertido en un orgánulo clave para la comprensión de la biología del cáncer, y un blanco para la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico y terapéuticos para el tratamiento del cáncer, debido a su relación con el conjunto de alteraciones características de la carcinogénesis. Incluso, algunos grupos de investigación han llegado a considerar al cáncer como una enfermedad mitocondrial que induce la reprogramación metabólica celular [13,17]. Estas alteraciones en el metabolismo energético pueden estar relacionadas con alteraciones estructurales y funcionales de la mitocondria [18].

1.3.1. Dinámica mitocondrial

La dinámica mitocondrial es un proceso altamente regulado, el cual involucra los procesos de fusión y fisión mitocondrial, los cuales se encargan de la remodelación de la red mitocondrial. Alteraciones en la dinámica mitocondrial provocan alteraciones en la morfología mitocondrial, las cuales tienen como resultado la formación de fragmentos mitocondriales largos o cortos dentro de las células vivas [19,20]. La fusión y fisión mitocondrial se llevan a cabo en respuesta a señales de ciclo celular, hipoxia, cambios en la demanda energética y estrés celular [21].

La fisión es importante durante la mitosis para asegurar una distribución uniforme a las células hijas, pero también ocurre durante la mitofagia y en apoptosis. Mientras que la fusión es promovida por el crecimiento de fuentes de carbono, que inducen la expresión de proteínas de la cadena respiratoria, el incremento de crestas mitocondriales y la formación de super complejos de la cadena respiratoria [21].

La fusión mitocondrial está mediada por las mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2), y por la proteína de atrofia óptica 1 (Opa1). Mientras que la fisión mitocondrial está mediada principalmente por la proteína 1 relacionada con la dinamina (Drp1) y por la proteína de fisión mitocondrial 1 (Fis1) [19,21].

En diferentes tipos de cáncer, como el melanoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides y glioblastoma, se ha observado un aumento de la fisión mitocondrial. Este incremento de la fisión mitocondrial en las células cancerosas puede estar correlacionado con la reprogramación metabólica, la progresión del ciclo celular, agresividad y el aumento de las capacidades de migración y metástasis. Por lo tanto, se considera que la inhibición de Drp1 como estrategia terapéutica debe de resultar en la disminución de la capacidad de proliferación del tumor [19,22,23]. Además, se reportado que las proteínas asociadas con la fusión mitocondrial, Mfn1, Mfn2 y Opa1 son esenciales para la angiogénesis tumoral, y su posible relación con el incremento de consumo de oxígeno y producción de ATP celular en cáncer de hígado, actuando como promotores del crecimiento [21,22].

1.3.2. Biogénesis mitocondrial y mitofagia

La masa mitocondrial de las células se encuentra regulada por los procesos de biogénesis mitocondrial y mitofagia. Estos dos procesos se encuentran estrechamente regulados en respuesta al estrés celular, a la disponibilidad de nutrientes, daño oxidante y al estado redox [24].

La biogénesis mitocondrial se encuentra regulada por la coordinación de la expresión de proteínas nucleares y mitocondriales necesarias para la biogénesis mitocondrial [24,25]. La biogénesis mitocondrial es necesaria para la producción de energía y el crecimiento celular y es inducida en ciertas condiciones de privación de nutrientes y en respuesta al estrés oxidativo [25]. Entre los genes implicados en la biogénesis mitocondrial se encuentran los factores respiratorios nucleares 1 y 2 (NRF 1 y 2). La actividad transcripcional de estos factores nucleares depende de la expresión y activación del coactivador del receptor gamma 1 α activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1 α), que estimula la expresión de numerosos genes implicados en la biogénesis mitocondrial, incluidos genes que regulan la replicación, como el ácido ribonucleico polimerasa mitocondrial (mtARNP) dirigida por el ácido desoxirribonucleico (DNA), así como también la transcripción y traducción del factor de transcripción A mitocondrial (TFAM) del genoma mitocondrial [13,26].

Se ha encontrado que la biogénesis mitocondrial en el cáncer puede promover o limitar esta enfermedad; esto puede estar en función del tipo de tejido, la etapa del tumor, del ambiente celular y de factores exógenos. La biogénesis mitocondrial puede ser promotora en los tumores al aumentar la generación de metabolitos y energía. En contraparte, se sugiere que puede tener actividad supresora ya que al generarse nuevas mitocondrias estas pueden promover el metabolismo oxidante, lo que limitaría la generación de ROS y la estabilización del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF1 α) [24].

La mitofagia es necesaria para reemplazar las mitocondrias dañadas o no deseadas, como control de calidad mitocondrial y también es activada cuando hay privación de nutrientes [19,27]. La despolarización de la membrana mitocondrial externa desencadena la activación de la cinasa 1 inducida por PTEN (PINK1), que fosforila a Mfn2, lo que le permite actuar como receptor de la ubiquitina ligasa E3 Parkin, permitiendo el reclutamiento selectivo de la proteína Parkin en la membrana externa de las mitocondrias externas. Adicionalmente, Parkin puede ubiquitinar a la proteína Mfn1 y al canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) lo que crea un sitio de acoplamiento para la maquinaria de autofagia que involucra a las proteínas de la cadena ligera asociada a microtúbulos 3 (LC3), p62/sequestosoma1 (SQSTM1) [24,26,28].

Del mismo modo que la biogénesis mitocondrial, la mitofagia puede tener una actividad pro o anti tumorigénica en las células cancerosas, dependiendo del tipo y estado del tumor. Se ha planteado como estrategia terapéutica la inhibición de la mitofagia, con el propósito de aumentar la producción de ROS mitocondriales, lo que tendría como consecuencia la muerte de las células tumorales [24,28,29].

1.3.3. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

El $\Delta\Psi_m$ es un indicador de la función mitocondrial global y del metabolismo mitocondrial, en el que influyen, el suministro de sustratos y la demanda de ATP [30]. El $\Delta\Psi_m$ es generado por las bombas de protones que involucra la participación de los complejos NADH-ubiquinona oxidorreductasa (CI), ubiquinona citocromo c oxidorreductasa (CIII) y citocromo c oxidasa (CIV) de la cadena transportadora de

electrones, el cual es un componente esencial para el almacenamiento de energía durante la OXPHOS. Junto con el gradiente de protones (ΔpH), el $\Delta\Psi\text{m}$ forma el potencial de transmembrana que se aprovecha para producir ATP. Los niveles de $\Delta\Psi\text{m}$ en la célula se mantienen relativamente estables, aunque pueden producirse fluctuaciones limitadas como reflejo de la actividad fisiológica normal. Un descenso o un aumento prolongado de los niveles de $\Delta\Psi\text{m}$ pueden inducir una pérdida de la viabilidad celular y ser la causa de diversas patologías. Entre otros factores, el $\Delta\Psi\text{m}$ desempeña un papel clave en la homeostasis mitocondrial mediante la eliminación selectiva de las mitocondrias disfuncionales. También es una fuerza motriz para el transporte de iones y proteínas que son necesarios para un funcionamiento mitocondrial saludable [30,31].

En las células cancerosas, la formación y el mantenimiento del $\Delta\Psi\text{m}$ depende de varios factores, como la entrada de sustratos respiratorios en las mitocondrias, la actividad de la cadena transportadora de electrones, de la demanda de ATP y el equilibrio entre el ATP generado por las mitocondrias y el ATP glicolítico, entre otros [30,32].

1.3.4. Reprogramación del metabolismo energético en el cáncer

Las actividades metabólicas en las células normales se basan principalmente en la OXPHOS, que es más eficiente para generar ATP que la glicólisis. Sin embargo, una de las características metabólicas de las células cancerosas es el incremento de la glicólisis y una reducción de la actividad de la OXPHOS [33]. Por lo tanto, el estudio y la comprensión de la relación de la mitocondria con las alteraciones del metabolismo energético de las células cancerosas es de gran importancia para lograr una mayor comprensión de la biología del cáncer. Dentro de los *hallmarks* del cáncer se encuentra la reprogramación del metabolismo energético, el cual se encuentra directamente relacionado con la mitocondria (Figura 2). La reprogramación del metabolismo energético se ha asociado principalmente a alteraciones en la OXPHOS y en el metabolismo glicolítico de las células cancerosas.

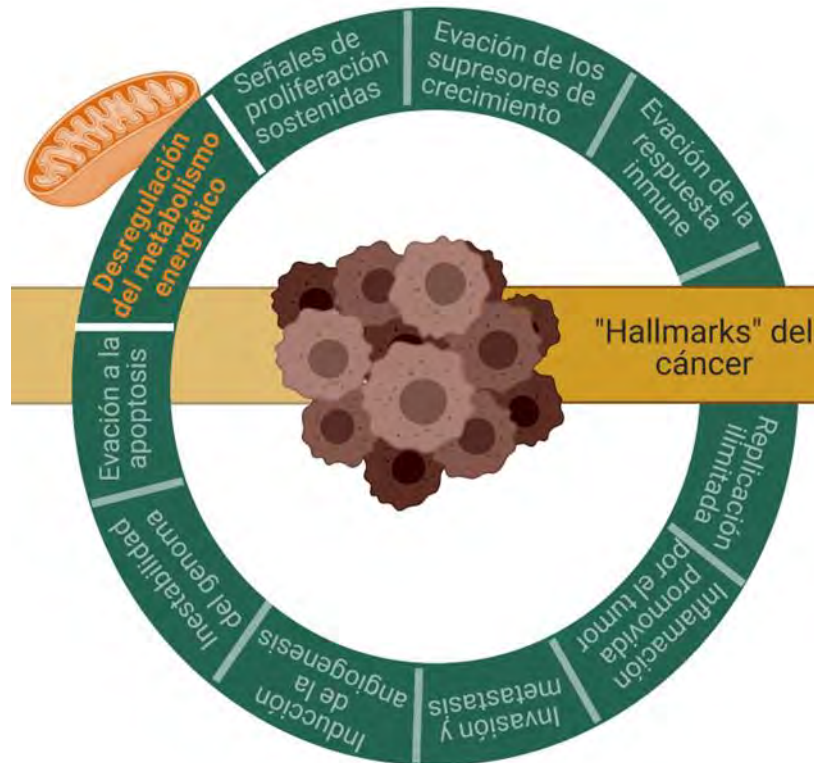


Figura 2. Hallmarks del cáncer. Se han identificado como *hallmarks*, o rasgos del cáncer a la desregulación del metabolismo energético, a las señales de proliferación sostenida, evasión de los supresores de crecimiento, evasión al sistema inmune, a la capacidad de replicación ilimitada, a la inflamación promovida por el tumor, invasión y metástasis, inducción de la angiogénesis, inestabilidad del genoma y a la evasión de la apoptosis. Imagen creada con Biorender.

1.3.4.1. Efecto Warburg

El científico alemán Otto Warburg fue el que describió por primera vez en la década de 1920 el cambio de metabolismo energético en las células cancerosas, el cual también se conoce como efecto Warburg [33].

Este efecto o fenotipo Warburg de las células cancerosas se caracteriza principalmente por un incremento de la glicólisis y producción de ácido láctico, y una disminución de la OXPHOS (Figura 3). A pesar de que a través de la glicólisis se obtiene un menor número de ATP's (2 ATP) que mediante la OXPHOS (36 ATP), esta reprogramación metabólica tiene como propósito principal cubrir la demanda energética y la producción de nuevos componentes celulares necesarios para la proliferación de las células cancerosas. La glicólisis aeróbica en muchos cánceres

es un resultado impulsado por varios factores, como la activación de oncogenes, la pérdida de supresores de tumores, el microambiente hipóxico, la mutación del ADN mitocondrial (ADNmt) y el tejido de origen [33,34].

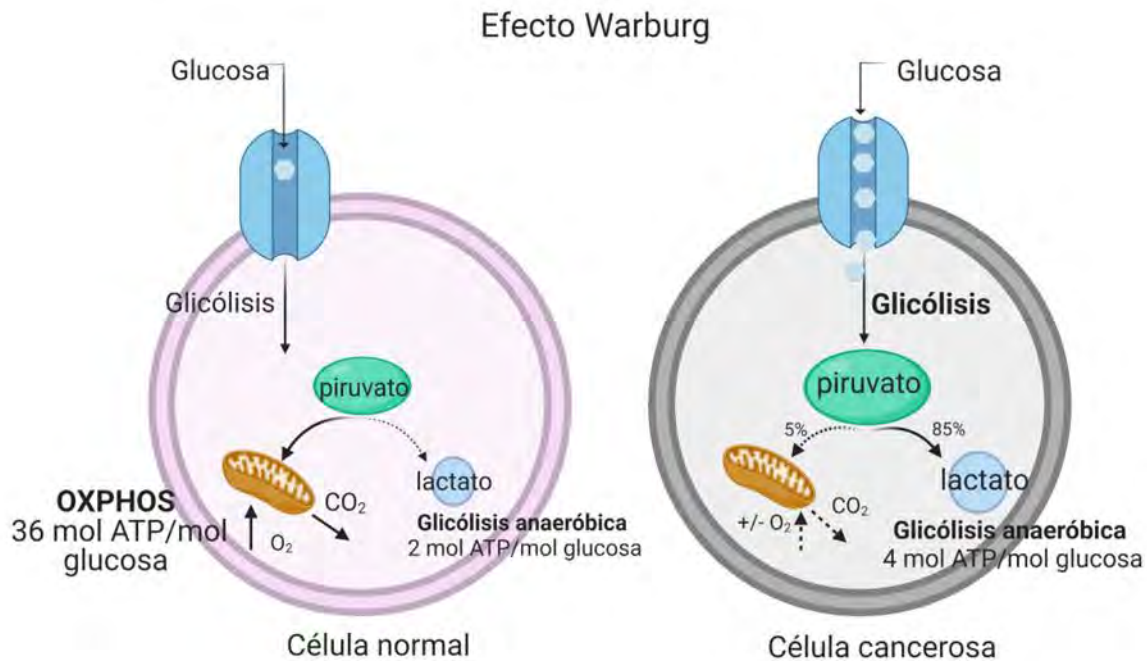


Figura 3. Efecto Warburg. Se observa que en la mitocondria de una célula normal la fosforilación oxidante (OXPHOS) es la principal vía de obtención de adenosín trifosfato (ATP). Mientras que, para una célula cancerosa la principal vía de obtención de ATP es la glicólisis, aún en presencia de oxígeno, lo que provoca el incremento de generación de piruvato y lactato. Figura creada con Biorender.

1.3.4.2. OXPHOS

La ruta metabólica de OXPHOS genera ATP mediante el transporte de electrones a una serie de complejos de proteínas transmembrana en la membrana interna mitocondrial, conocida como cadena de transporte de electrones (ETC). A medida que los electrones pasan a través de los complejos ETC multiproteicos I a IV, los complejos I, III y IV bombean protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana. Cuando OXPHOS está activo, hay un alto gradiente de protones a través de la membrana, y los protones fluyen desde el espacio intermembrana interno hacia la matriz mitocondrial a través del complejo de la ATP sintasa (CV), lo que impulsa la síntesis de ATP. Trece de las subunidades implicadas en la

OXPPOS se encuentran codificadas por el ADN mitocondrial. Las subunidades restantes (aproximadamente 85 subunidades) están codificadas por el ADN nuclear [35,36].

Como se mencionó anteriormente, las células cancerosas se caracterizan por un incremento de la actividad glicolítica en comparación con las células normales, lo que ha llevado a muchos a suponer que la función de la OXPPOS está subregulada en las células cancerosas [36]. La evidencia sugiere que las mutaciones del DNA mitocondrial ocurren con mayor frecuencia en las células cancerosas que en las células normales, esto puede deberse a la mayor generación de ROS en las mitocondrias de las células cancerosas [37–39]. Sin embargo, en los últimos años este punto de vista ha sido debatido ya que se ha encontrado sobre regulada la OXPPOS en ciertos tipos de cáncer, como leucemias, linfomas, adenocarcinoma ductal pancreático, y carcinoma endometrial, esto contribuye a que los cánceres progresen, incluso esto puede ocurrir cuando la glucólisis se encuentra activa. Por lo tanto, esta información refleja que las mitocondrias son funcionales en las células cancerosas, que el cáncer es una enfermedad extremadamente heterogénea y que cada tipo de cáncer tiene características metabólicas individuales, y que para ciertos tipos de cáncer es plausible el uso de inhibidores de la OXPPOS [35,40].

1.3.4.3. Firma bioenergética

La comprensión del metabolismo energético ha sido de gran utilidad en el estudio del cáncer, ya que permite sospechar la existencia de un daño mitocondrial y reflejar el estado celular de las células cancerosas.

Una de las formas de reflejar el estado energético celular es a través de la firma bioenergética, la cual consiste en la relación entre el metabolismo glicolítico y el mitocondrial. Una de las formas de reflejar la relación del metabolismo glicolítico y mitocondrial es mediante la medición de la proteína cinasa activada por monofosfato de adenina (AMPK) y de HIF1 α . Esta relación se encuentra fuertemente relacionada con el efecto Warburg, debido a que existe una superposición entre las vías de señalización de AMPK y HIF, ya que ambas están involucradas en la respuesta al

estrés energético, aunque la relación es compleja, con resultados tanto opuestos como cooperativos según el contexto [27]. Por lo tanto, a través de esta relación entre AMPK y HIF1 α es posible reflejar el estado metabólico de las células cancerosas [42].

La reducción en la disponibilidad de oxígeno significa que las células deben adaptar su programa metabólico para mantener las reacciones catabólicas y anabólicas que dependen de la disponibilidad de ATP que normalmente suministra la OXPHOS. En general, se considera que la señalización de HIF1 respalda la producción de ATP en condiciones anaerobias y regula a la baja la OXPHOS, lo que reduce la dependencia en la célula de la producción de energía dependiente del oxígeno [15,27,42].

1.3.5. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las mitocondrias son la principal fuente generadora de ROS. El aumento de generación de ROS por la mitocondria es una característica destacada de las células cancerosas, este incremento puede deberse a alteraciones en la cadena transportadora de electrones, al aumento de la demanda metabólica, a la reducción de la eliminación de ROS, al estrés replicativo inducido por oncogenes y a la dinámica mitocondrial alterada [14,16].

Experimentalmente se ha probado como terapia alternativa la explotación de los niveles de ROS en las células tumorales por encima del umbral homeostático crítico ya que es incompatible con el crecimiento o con la supervivencia de las células tumorales pero tolerable por las células normales; esta estrategia podría mejorar la actividad de la quimioterapia [16,19]. De hecho, la eficacia de algunos agentes genotóxicos utilizados en la clínica, como el cisplatino, dependen de la producción de ROS [16].

1.4. Proteómica y cáncer

La aplicación de la proteómica basada en la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) en el estudio de enfermedades

complejas como el cáncer permite la identificación y cuantificación de las proteínas, lo que hace posible obtener una caracterización más completa. Estos avances han tenido un gran impacto en la comprensión de la biología como en el diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades [43].

Adicionalmente, la implementación de herramientas bioinformáticas y la aplicación de métodos estadísticos multivariados en el análisis de los datos proteómicos han sido de gran aporte para lograr la integración e interpretación de la gran cantidad de datos generados por proteómica basada en LC-MS/MS. Ya que las pruebas univariantes como el análisis de varianza (ANOVA), cuantifican la variación de expresión individual de las proteínas, pero no tienen en cuenta la interrelación de las diferentes proteínas. Mientras que, las técnicas multivariantes, como el análisis de componentes principales (ACP) permite reflejar la interrelación de las proteínas, lo que posibilita la integración de los procesos biológicos [44].

Además, la aplicación de estas herramientas en el análisis de los datos permite la identificación de perfiles característicos que permiten la detección de alteraciones moleculares, lo que tiene un impacto en la comprensión a nivel funcional de la enfermedad, así como también en la identificación de biomarcadores ya sea de uso diagnóstico o terapéutico.

2. Justificación

A pesar de la gran cantidad de estudios histológicos, bioquímicos y moleculares que se han realizado para la comprensión y diagnóstico del cáncer de mama, aún se continua con la búsqueda de más elementos que ayuden a su comprensión, y búsqueda de biomarcadores de diagnóstico y tratamiento. La búsqueda de estos elementos son un gran reto, dado a la gran heterogeneidad del cáncer de mama. La clasificación molecular del cáncer de mama es un modelo que aún continua en desarrollo. Sin embargo, ha sido de gran ayuda para la comprensión de la biología de esta enfermedad, para dar un diagnóstico y tratamiento más adecuado.

Por otra parte, a pesar de las evidencias que existen de la participación de la mitocondria en el cáncer, aún es poco conocida la dinámica celular de estos procesos en el cáncer de mama y su correlación con la clasificación molecular. Además, el cambio en el metabolismo energético es una de las alteraciones que se encuentra en diferentes tipos de cáncer. Por lo tanto, caracterizar el proteoma mitocondrial de los subtipos moleculares del cáncer de mama, ayudará a comprender la participación de la mitocondria en el cáncer de mama.

Además, la aplicación de la proteómica en el estudio del cáncer de mama ha sido una herramienta de gran ayuda para la comprensión del cáncer de mama. Sin embargo, la caracterización de su proteoma ha sido poco estudiado. Además, existe la problemática de una falta de correlación entre los diferentes estudios, posiblemente debido a la falta de estandarización experimental, a la heterogeneidad del material biológico que se usan en los diferentes estudios y también a que una gran mayoría de estos trabajos se han realizado con base a la clasificación histopatológica.

Con base en lo anterior, y la importante participación de la mitocondria en el desarrollo del cáncer, establecer firmas proteómicas mitocondriales de los subtipos moleculares de cáncer de mama permitirá reconocer proteínas y procesos característicos de cada subtipo molecular, lo que sería de utilidad para la comprensión de la heterogeneidad y complejidad del cáncer de mama y además para proponer biomarcadores que apoyen al diagnóstico.

3. Hipótesis

Los perfiles proteómicos mitocondriales reflejarán las alteraciones en la dinámica, masa, bioenergética y generación de ROS mitocondrial de los subtipos moleculares luminal A y basal-like de cáncer de mama.

4. Objetivos

4.2. Objetivo general

Evaluar la dinámica, función y bioenergética mitocondrial en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB-231, y establecer perfiles proteómicos mitocondriales cuantitativos para los subtipos luminal A y basal-like de cáncer de mama que reflejen el estado metabólico y los procesos que se encuentren estrechamente relacionados a la mitocondria.

4.3. Objetivos particulares

1. Evaluar los procesos de fusión y fisión mitocondrial en las líneas celulares MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231.
2. Evaluar la masa mitocondrial en las líneas celulares MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231.
3. Evaluar el metabolismo energético mitocondrial en las líneas celulares MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231.
4. Evaluar ROS mitocondrial en las líneas celulares MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231.
5. Identificar las diferencias de abundancia de los proteomas mitocondriales de los subtipos luminal A y basal-like de cáncer de mama.
6. Definir los procesos biológicos característicos de los subtipos luminal A y basal-like de cáncer de mama.
7. Definir una firma proteómica mitocondrial para los subtipos luminal A y basal-like de cáncer de mama.

5. Materiales y Métodos

5.1. Reactivos

Los siguientes reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA): antimicina A, acrilamida, persulfato de amonio, azul de bromofenol, dimetilsulfóxido (DMSO), albumina bovina (BSA), oligomicina, rotenona, dodecil sulfato de sodio (SDS), 1,2-bis (dimetilamino) etano (TEMED), glicerol, glicina, fluoruro de fenimetilsulfonilo (PMSF), Ponceau S, deoxicolato de sodio, fluoruro de sodio (NaF),

ortovanato de sodio (Na_3VO_4), fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), pirofosfato de sodio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$), tris base, azul tripano, Tween-20, β -mercaptoetanol y anticuerpo contra proteína de unión a ubiquitina p62 (p62, P0067). Los medios Eagle modificado de Dulbecco F12 (DMEM/F12) y el medio Rosewell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) fueron adquiridos en In Vitro, S.A. (Ciudad de México, México). El estuche de cultivo para células de mama epiteliales fue adquirido en Laboratorios Metrix, S.A. de C.V. (Ciudad de México, México). El suero fetal bovino (SFB) y la penicilina/estreptomocina fueron adquiridos en Biowest (Riverside, MO, EUA). Los siguientes reactivos fueron adquiridos en J.T. Baker (Xalostoc, Edo. México, México): cloruro de calcio (CaCl_2), etanol, ácido de etilendiaminotetracético (EDTA), bicarbonato de sodio (NaHCO_3), ácido clorhídrico (HCl), isopropanol, metanol, and cloruro de sodio (NaCl). El cocktail de inhibidores de proteasas fue adquirido en Roche Applied Science (Mannheim, Alemania). Los anticuerpos primarios contra LC3 (ab48394), Opa1 (ab42364), Parkin (ab77924), PGC-1 α (ab106814), PINK1 (ab23707) y contra subunidades de la OXPHOS (ab110413) fueron adquiridos en Abcam (Cambridge, MA, EUA). Los anticuerpos contra AMPK (sc-109906), Drp1 (sc-2898), HIF1 α (sc-10790), Mfn1 (sc-50330), y NRF2 (sc271571) fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, EUA). El anticuerpo contra Mfn2 (D2D10) fue adquirido en Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA). Los anticuerpos secundarios IRDye® (680RD, 926–68074; 800RD, 926–32214; 680RD, 926–68073; 800RD, 926–32212; 800CW, 926–32213) fueron adquiridos en LI-COR Inc. (Lincoln, NE, EUA). Las sondas JC-1, MitoSOX™ Red, MitoTracker™ Green FM y Hoechst 33342 y la escalera de peso molecular BlueElf- preteñida (5 a 245 kDa) fueron adquirido en Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). El colorante Coomassie G250 fue adquirido en BioRad (Hercules, CA, EUA).

5.2. Cultivo celular

Se realizó el cultivo de las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, representativas de los subtipos moleculares de cáncer de mama luminal A y basal-like, respectivamente, y de la línea celular epitelial de mama no tumorigénica MCF10A.

Las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 se cultivaron en medio RPMI suplementado con SFB al 10% y antibiótico-antimicótico al 1%. La línea celular MCF10A se cultivó en medio DMEM-F12 suplementado con SFB al antibiótico-antimicótico al 1%, hidrocortisona 0.5 µg/mL, factor de crecimiento endotelial 10 ng/mL e insulina 5 µg/mL. Las tres líneas celulares se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ de atmósfera humificada. Las células fueron cosechadas hasta que los cultivos alcanzaron una confluencia entre el 80-90% con tripsina a 200 × g, 4°C, 5 min. Posteriormente, el precipitado celular que se generó de la centrifugación se resuspendió con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y se centrifugó nuevamente. Los precipitados celulares de esta última centrifugación se almacenaron a -70°C hasta su uso. Fueron obtenidas tres réplicas biológicas de cada línea celular.

5.3. Extracción de proteínas totales

Para la extracción de proteínas totales, los *pellets* celulares de cada una de las líneas celulares se resuspendieron y se sonicaron con 500 µl del amortiguador de radioinmunoprecipitación (RIPA): Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, deoxicolato de sodio al 0.5 %, NP-40 al 1%, SDS al 0.1% suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (NaF 25 mM, Na₃VO₄ 1 mM, PMSF 1 mM, Na₄P₂O₇ 1 mM) y coctel inhibidor de proteasas 1X, durante tres ciclos de 10 s cada uno a 4°C. Los lisados celulares se centrifugaron a 15,000 × g, durante 10 minutos a 4°C, los sobrenadantes de las centrifugaciones se recuperaron y se almacenaron a -70°C hasta su uso. La concentración de proteínas totales se determinó por el método de Bradford [45].

5.4. Western blot

Para la inmunodetección de cada una de las proteínas, se desnaturalizaron cantidades iguales de proteína (30 µg), se diluyeron 1:6 en amortiguador Laemmli (Tris-HCl 60 mM, pH 6.8, SDS al 2 %, glicerol al 10%, β-mercaptoetanol al 5%, azul de bromofenol al 0.01 %) y se sumergieron en agua hirviendo durante 5 min, excepto por las muestras que se usaron para determinar los niveles de subunidades

de la OXPHOS. Los extractos de proteínas se separaron mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), mediante transferencia húmeda a 100V durante 1:30 h a 4°C. Después de la transferencia, las membranas fueron bloquearon con leche sin grasa al 5% en TBS-T (amortiguador salino de tris con Tween 20 al 0.1%), en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se lavaron dos veces en agitación con TBS-T durante 5 min cada lavado y posteriormente se incubaron durante toda la noche a 4°C en agitación con los siguientes anticuerpos primarios: Mfn1 (1:200), Mfn2 (1:500), Opa1 (1:200), Drp1 (1:00), PINK (1:200), Parkin (1:500), p62 (1:500), PGC1 α (1:500), NRF2 (1:200), OXPHOS (1:500) LC3 (L7543), AMPK (1:500) y HIF1 α (1:500). Después, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T durante 10 min cada lavado y se incubaron con su respectivo anticuerpo secundario (1:10,000) en agitación durante 1 h, a temperatura ambiente, en oscuridad. Terminada la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T y una vez con TBS durante 5 min. La detección de las bandas se realizó por fluorescencia con el equipo Odyssey Sa infrarrojo (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). El procesamiento de las señales se realizó con el programa Image Studio™ 5.2 Lite (LI-COR Biosciences). Como control de carga para todas las inmunodetecciones se utilizaron las membranas de las transferencias teñidas con Rojo de Ponceau S, debido a las diferencias bioenergéticas y cambios estructurales en el citoesqueleto en las líneas celulares [46]. Las membrana fueron teñidas con Rojo de Ponceau S al 1% por 2 min [47]. El exceso de rojo de Ponceau S se eliminó con TBS hasta que las bandas fueron visibles, después, las membranas se colocaron entre dos acetatos transparentes y se escanearon a 300 dpi como un archivo JPG (HP Scanjet G4050). El análisis de densitometría de los WB y de las membranas de Rojo de Ponceau S se realizó con el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA, <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>). La normalización de los datos de densitometría se realizó mediante la división del valor obtenido en la proteína blanco sobre el valor del control de carga [48].

5.5. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

El $\Delta\Psi_m$ se estimó utilizando la sonda JC-1. Primero se sembraron alrededor de 10.000 células en una placa de 96 pozos negros con fondo transparente. Después de 24 h, las células se incubaron con la sonda JC-1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en medio sin suplementar a 37°C durante 30 min. Después, las células se lavaron dos veces con PBS y luego se reemplazaron con medio de cultivo nuevo para eliminar el exceso de sonda. La fluorescencia relacionada con la despolarización (verde) se midió a 525 nm, y la señal relacionada con la polarización (roja) se leyó a 590 nm; ambas emisiones se obtuvieron a 488 nm de excitación. Los datos y las imágenes representativas se obtuvieron con un lector de imágenes celulares Cytation 5 (Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA.), con filtros GFP y RFP. La fluorescencia de JC-1 se cuantificó como la proporción de fluorescencia roja/fluorescencia verde. Los datos fueron obtenidos a partir de tres réplicas biológicas, para cada replica biológica se sembraron 12 pozos.

5.6. Estimación de masa mitocondrial

Para realizar la estimación de la masa mitocondrial se utilizó el marcador fluorescente mitocondrial MitoTracker Green™. Primero se sembraron alrededor de 10,000 células por pozo en una placa de 96 pozos negros con fondo transparente. Después de 24 h, las mitocondrias fueron marcadas con la sonda MitoTracker Green (500 nM) y los núcleos de las células con la sonda Hoechst (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en medio de cultivo sin suplementar por 30 min a 37°C [49]. Para eliminar el exceso de las sondas de las células se lavaron tres veces con PBS y luego se reemplazaron con medio de cultivo nuevo. La fluorescencia de Hoechst se midió con una excitación de 360 nm y una emisión de 460 nm, mientras que la fluorescencia verde de MitoTracker Green se midió con una excitación de 480 nm y una emisión de 521 nm. Las imágenes representativas fueron tomadas con el equipo Cytation 5 imaging con los filtros GFP y Hoesch y el programa Gen5™ 3.0 (Biotek) para la adquisición y de los datos. Los niveles de masa mitocondrial se estimaron como la relación de la intensidad de fluorescencia verde del MitoTracker Green sobre el número de células (intensidad de fluorescencia de MitoTracker Green/número de células). El

número de células se cuantifico con el software ImageJ (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Maryland, EUA., <https://imagej.nih.gov/ij/index.htm>). Los datos fueron obtenidos a partir de tres réplicas biológicas, para cada replica biológica se sembraron 12 pozos.

5.7. Determinación de la producción mitocondrial ROS

La producción mitocondrial de ROS fue medida con el marcador fluorescente MitoSOX™ Red. Se sembraron alrededor de 10,000 células por pozo en una placa de 96 pozos negros con fondo transparente. Después de 24 h, las células se incubaron con las sondas Hoesch (1 µg/mL) y MitoSOX Red (5 µM) en medio de cultivo sin suplementar por 30 min a 37°C, para eliminar el exceso de las sondas las células se lavaron tres veces con PBS, y luego se remplazaron con medio de cultivo nuevo [50]. La fluorescencia de Hoechst se midió con una excitación de 360 nm y una emisión de 460 nm, mientras que la fluorescencia de MitoSOX Red se midió con una excitación de 510 nm y una emisión de 580 nm. La producción de ROS se estimó como la relación de la intensidad de fluorescencia de células rojas sobre el número de células (intensidad de fluorescencia de MitoSOX Red/número de células). El número de células se cuantifico con el software ImageJ (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Maryland, EUA., <https://imagej.nih.gov/ij/index.htm>). Los datos fueron obtenidos a partir de tres réplicas biológicas, para cada replica biológica se sembraron 12 pozos.

5.8. Control respiratorio celular

Las evaluaciones del consumo de O₂ se realizó en células intactas utilizando un equipo de respirometría de alta resolución (Oxygraph O2k, OROBOROS, Innsbruck, Austria). Previamente, antes de comenzar con las mediciones de los parámetros respiratorios, las células se lavaron con PBS 1X y se cosecharon con tripsina. Las determinaciones fueron realizadas en aproximadamente 1 millón de células en 2 mL de medio de cultivo suplementado con SFB 10% a 37°C [51]. Los parámetros respiratorios evaluados fueron: 1) respiración de rutina (basal), que corresponde al consumo de oxígeno de las células; 2) leak o respiración de fuga, que corresponde

al consumo de oxígeno en presencia de oligomicina (5 μM); 3) control respiratorio (CR), que corresponde a la relación entre la respiración basal/fuga de protones (basal/leak); y 4) respiración asociada a la OXPHOS (P), calculada como la diferencia entre la respiración basal menos leak (basal-leak). Todos los parámetros respiratorios evaluados fueron corregidos restando la respiración no mitocondrial, obtenida mediante la adición de rotenona 1 μM , antimicina A 5 μM y azida de sodio 100 μM y normalizados por el número de células.

5.9. Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos de las líneas celulares se analizaron con el paquete R Rapport [52] para eliminar los valores atípicos. Se probó la normalidad de los datos y se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Los datos se graficaron con tres o más experimentos independientes, y cada figura muestra la media \pm desviación estándar. Todos los datos se analizaron utilizando el software R (versión 4.1.0, Foundation for Statistical Computing).

5.10. Análisis del proteoma mitocondrial en tumores con cáncer de mama

Para complementar y validar los cambios encontrados en la dinámica mitocondrial y la bioenergética mitocondrial en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, se reanalizaron los datos de abundancia de proteoma global de 43 tumores clasificados molecularmente por el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA, por sus siglas en inglés), de los cuales 18 fueron clasificados como basal-like, 22 como luminal A y 3 no cancerosos como controles) obtenidos del trabajo de Mertins et al. [53].

En la primera parte de nuestro análisis, todas las proteínas identificadas y cuantificadas por Mertins et al. [53] se cotejaron con una lista de proteínas mitocondriales o de tráfico mitocondrial descritas en MitoMiner [54]. De estas proteínas mitocondriales, solo se seleccionaron aquellas con valores de abundancia en al menos el 50% de las muestras.

A continuación, se realizó un análisis exploratorio de los datos de abundancia con el paquete R Rapport [52] para eliminar del análisis, las muestras y las proteínas con comportamiento extremo.

Después de eliminar los datos extremos, se realizó un análisis de agrupamientos jerárquicos de los tumores por el método de Ward basado en la matriz de distancia euclidiana de las muestras para encontrar grupos homogéneos entre subtipos. Se eliminaron quince muestras de tumores debido a que no coincidían con su clasificación molecular.

En total se conservaron 28 muestras finales (14 basales, 11 luminales A y 3 controles), los valores faltantes se imputaron con el método Random Forest (missForest, paquete R) [55]. A continuación, se aplicó un PCA en la matriz de correlación de abundancia de proteínas [56] para obtener un paisaje de abundancia de proteínas mitocondriales para los subtipos y el grupo de control [14].

Finalmente, solo las proteínas con un valor absoluto de asociación igual o superior a 0.5 con los dos primeros componentes [57] fueron seleccionadas para el análisis comparativo de sobrerrepresentación basado en Gene Ontology [58]. La sobrerrepresentación se realizó en línea empleando la herramienta de análisis de lista de genes en el sitio del sistema de clasificación PANTHER. Como entradas, cargamos los símbolos genéticos oficiales como identificadores. Seleccionamos aquellos involucrados en los procesos dinámicos, biogénesis mitocondrial, mitofagia, ROS mitocondrial, potencial de membrana mitocondrial y metabolismo mitocondrial para ajustarse a la firma mitocondrial de los subtipos luminal A y basal. En la Figura 4 se puede ver un diagrama de flujo del procesamiento y análisis de estos datos.

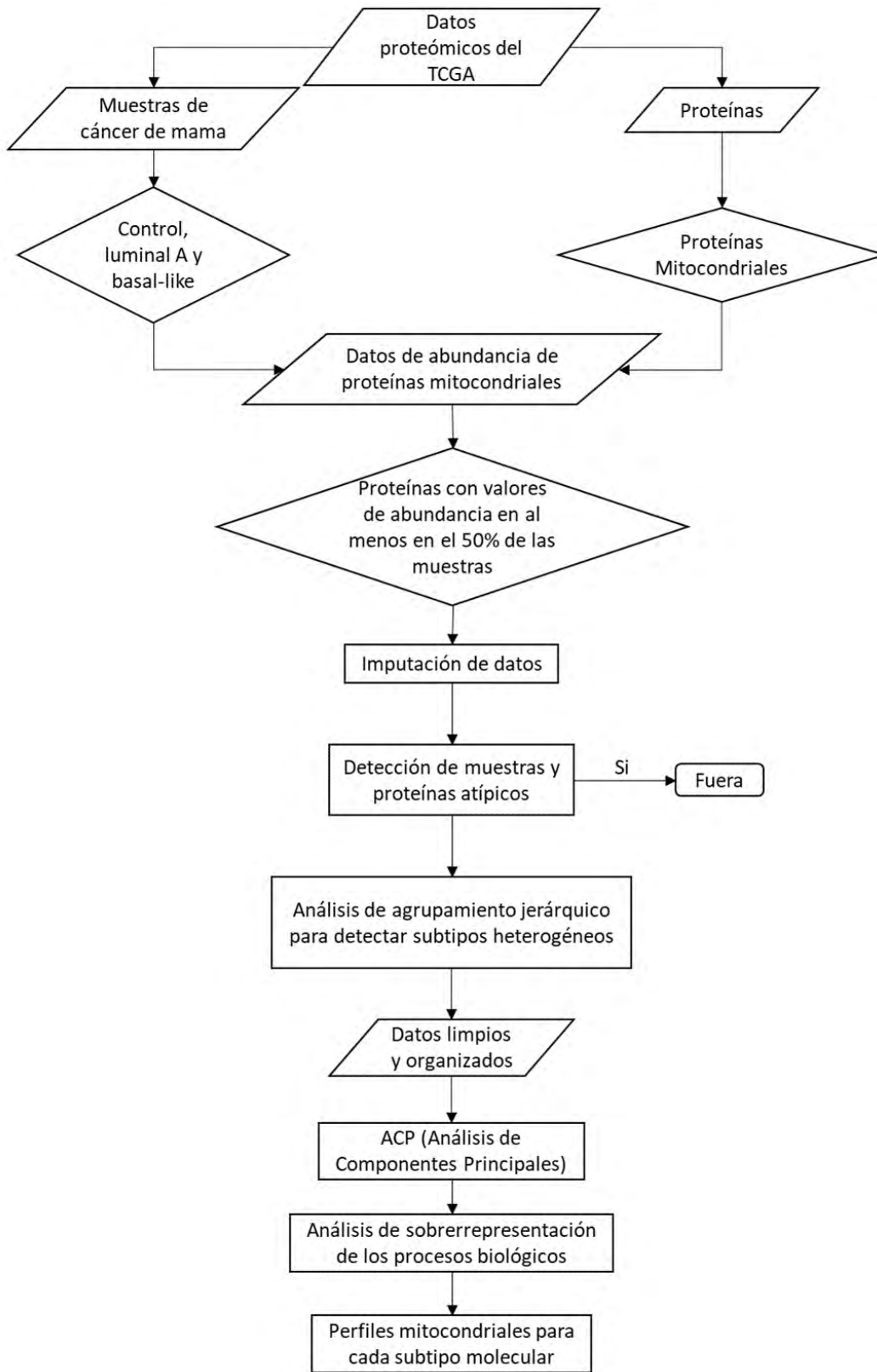


Figura 4. Flujo del proceso de análisis estadístico y bioinformático de los datos proteómicos de las muestras de cáncer de mama.

6. Resultados

6.1. Reducción de la fisión mitocondrial en la línea celular MDA-MB-231 y aumento de la fusión mitocondrial en la línea celular MCF7

La alteración en la dinámica mitocondrial en las células cancerosas está estrechamente asociada con la morfología mitocondrial, con alteraciones en la masa mitocondrial, la biogénesis mitocondrial, la desregulación de la bioenergética y las funciones redox [59,60]. En primer lugar, evaluamos la expresión de Mfn1, Mfn2 y Opa1 como marcadores de fusión mitocondrial, y como marcador de fisión mitocondrial a la proteína Drp1, en líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, representativas de los subtipos luminal A y basal-like de cáncer de mama respectivamente, y en la línea MCF10A como control (Figura 5A) [61]. Encontramos un aumento significativo en Opa1 en la línea celular MDA-MB-231 en comparación con la línea celular MCF10A; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las líneas celulares de cáncer de mama, pero se observó una tendencia al aumento de esta proteína en la línea celular MDA-MB-231 en comparación con la línea celular MCF7 (Figura 5B). En la proteína Mfn1 no se encontraron cambios de expresión entre líneas celulares (Figura 5C). Sin embargo, en la proteína Mfn2, se encontró una disminución significativa en la línea celular MCF7 en comparación con la línea celular MCF10A y una expresión significativamente mayor en la línea celular MDA-MB-231 (Figura 5D). Además, observamos que la expresión de la proteína Drp1 disminuyó en ambas líneas celulares de cáncer de mama en comparación con la línea celular MCF10A, aunque esta disminución solo fue significativa en la línea celular MDA-MB-231 (Figura 5E). Para nuestra sorpresa, se encontró que la disminución en la expresión de la proteína Drp1 estaba marcada principalmente en la línea celular MDA-MB-231 que es representativa del subtipo de basal-like. Por el contrario, en estudios previos se ha informado que la fisión mitocondrial tiende a aumentar en las células cancerosas y que este aumento puede estar asociado con la agresividad de esta enfermedad [62]. Estos datos sugieren cambios en el control y la calidad mitocondrial y diferencias importantes en la biología mitocondrial entre los subtipos luminal A y basal-like y

que la fisión mitocondrial en el subtipo basal-like puede estar mediada por otras proteínas independientes de Drp1.

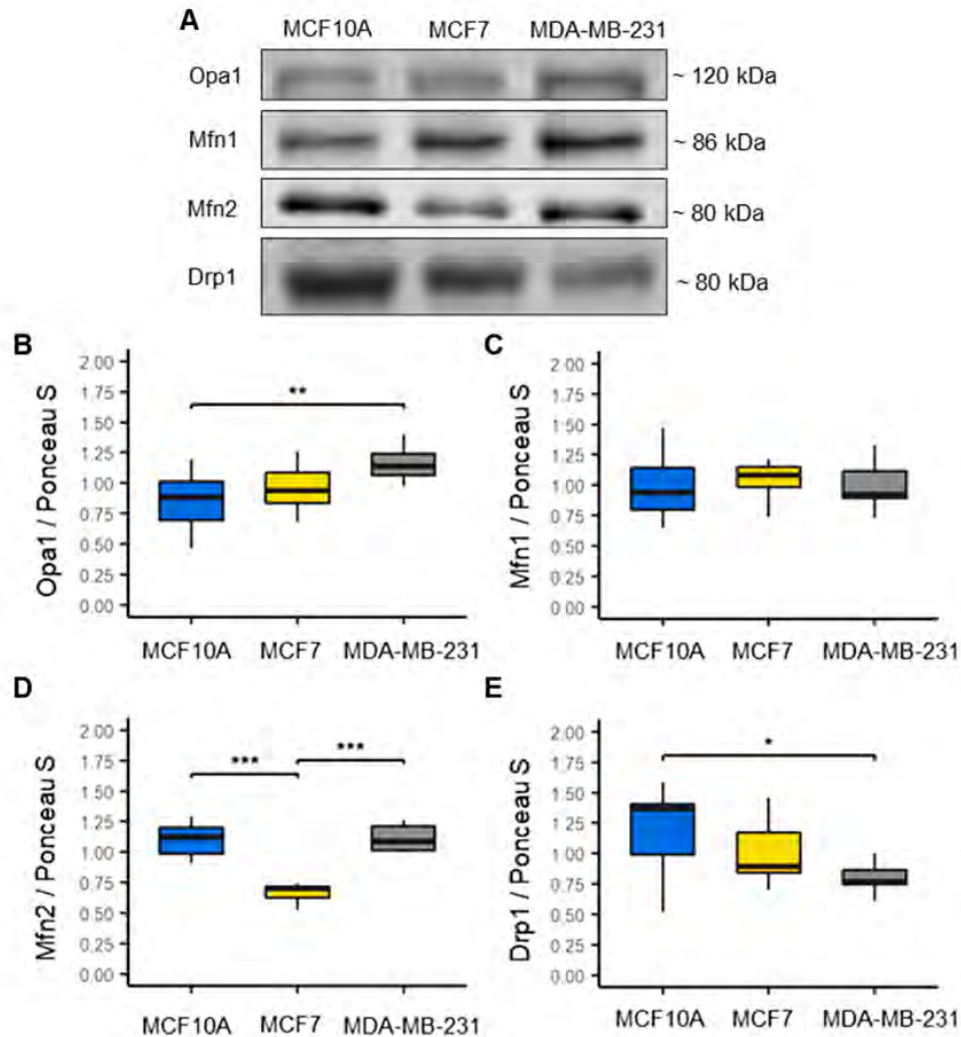


Figura 5. Dinámica mitocondrial en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama. (A) Western blots representativos. (B-D) Expresión de marcadores de fusión, atrofia óptica 1 (Opa1), $n=9$; mitofusina 1 (Mfn1), $n=6$; mitofusina 2 (Mfn2), $n=6$. (E) Expresión del marcador de fisión, proteína similar a la dinamina 1 (Drp1), $n=9$. Los valores de densitometría se normalizaron mediante la tinción con rojo Ponceau S. Los datos se presentan como media \pm DE. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

6.2. Biogénesis mitocondrial y mitofagia en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama

La homeostasis mitocondrial se conserva mediante la coordinación entre la biogénesis mitocondrial y la mitofagia [63]. Para evaluar el efecto de las diferencias en la dinámica mitocondrial sobre la masa mitocondrial y la biogénesis en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, estimamos la masa mitocondrial con la sonda MitoTracker Green (Figura 6A). Encontramos un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia de MitoTracker Green en la línea celular MDA-MB-231 en comparación con las líneas celulares de control y MCF7, lo que sugiere un mayor contenido de masa mitocondrial en la línea celular representativa del subtipo molecular de tipo basal-like. Por el contrario, los valores de intensidad de MitoTracker Green obtenidos en la línea celular MCF7 sugieren un contenido de masa mitocondrial más bajo que en la línea MCF10A y MDA-MB-231 (Figura 6B). Para validar los resultados de la masa mitocondrial, evaluamos la expresión de PGC1 α y de NRF2 que están involucradas en la biogénesis mitocondrial (Figura 6C) [63]. Se encontró una correlación con los datos obtenidos por MitoTracker Green; se encontró un aumento significativo en la expresión de la proteína PGC1 α en la línea celular MDA-MB-231 en comparación con las líneas celulares MCF10A y MCF7 (Figura 6D). Aunque no encontramos cambios significativos en la expresión de la proteína NRF2, observamos una tendencia al incremento en la expresión de esta proteína en la línea celular MDA-MB-231 (Figura 6E).

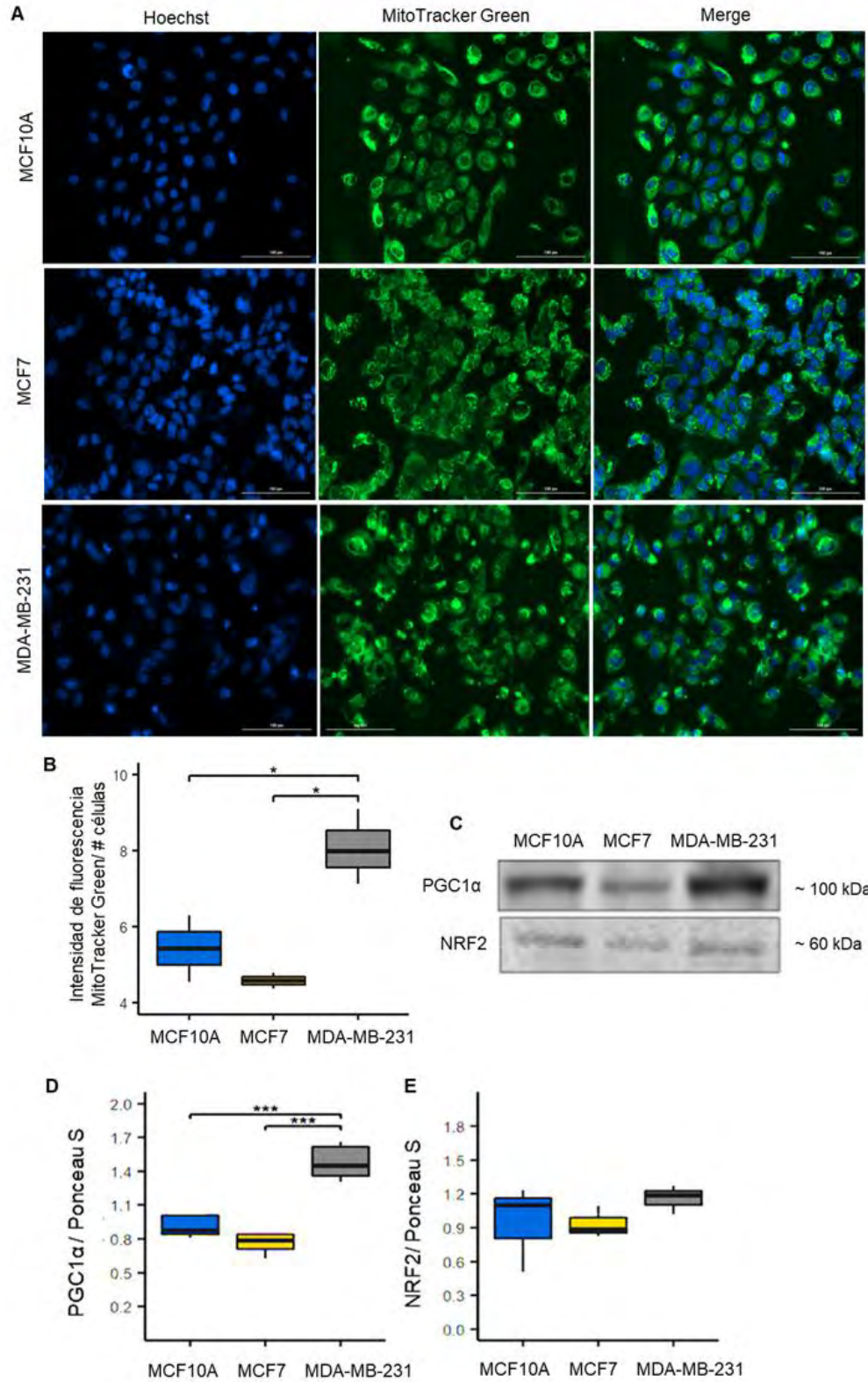


Figura 6. Aumento de la masa mitocondrial en la línea celular MDA-MB-231 y reducción de la masa mitocondrial en la línea celular MCF7. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de MitoTracker Green para estimar la

masa mitocondrial en las células MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231, los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst (azul). (B) Los niveles de masa mitocondrial se cuantificaron como intensidad de fluorescencia MitoTracker Green/relación de células. Los datos se obtuvieron a partir de tres réplicas biológicas. Los datos se presentan como media±DE de las células ($n=151-251$). * $p<0.05$. (C) Western blots representativos. (D, E) Expresión de marcadores de biogénesis mitocondrial: receptor coactivador gamma activado por el peroxisoma (PGC-1 α), $n=6$ y factor nuclear respiratorio 2 (NRF2), $n=3$. Los valores de la densitometría se normalizaron mediante la tinción con rojo Ponceau S. Los datos se presentan como media±DE. *** $p < 0.001$.

Además, evaluamos la expresión de marcadores de mitofagia ya que es un proceso de control de calidad mitocondrial y un mecanismo de regulación de la masa mitocondrial mediante el cual se eliminan las mitocondrias disfuncionales [64,65]. Por lo tanto, evaluamos la expresión de las proteínas relacionadas con la mitofagia, PINK1 y Parkin, y las proteínas autofágicas, la proteína de unión a ubiquitina p62 (p62) y las proteínas asociadas a microtúbulos 1A/1B cadena ligera 3B (LC3- II) (Figura 7A). Encontramos que PINK1 y p62 presentaron un aumento significativo en la línea celular MDA-MB-231 en comparación con la línea celular MCF10A (Figura 7B, C). Además, encontramos un aumento significativo en la expresión de p62 en la línea celular MDA-MB-231 en comparación con la línea celular MCF7 (Figura 7C). Sin embargo, no encontramos cambios significativos en la expresión de proteínas Parkin y LC3-II entre las líneas celulares (Figura 7D, E). Aunque no encontramos cambios significativos en LC3-II, observamos una tendencia al incremento en la expresión de esta proteína en la línea celular MDA-MB-231 (Figura 7E). En general, los resultados tanto de la biogénesis mitocondrial como de la mitofagia se correlacionan con los resultados obtenidos previamente con los marcadores de dinámica mitocondrial. Esto se debe a que el aumento de los procesos de fusión mitocondrial está relacionado con el aumento de la masa mitocondrial, como se observa en la línea MDA-MB-231 [66].

Además, estos resultados sugieren alteraciones en el control de calidad mitocondrial y revelan diferencias en la biología mitocondrial entre los subtipos luminal A y basal-like.

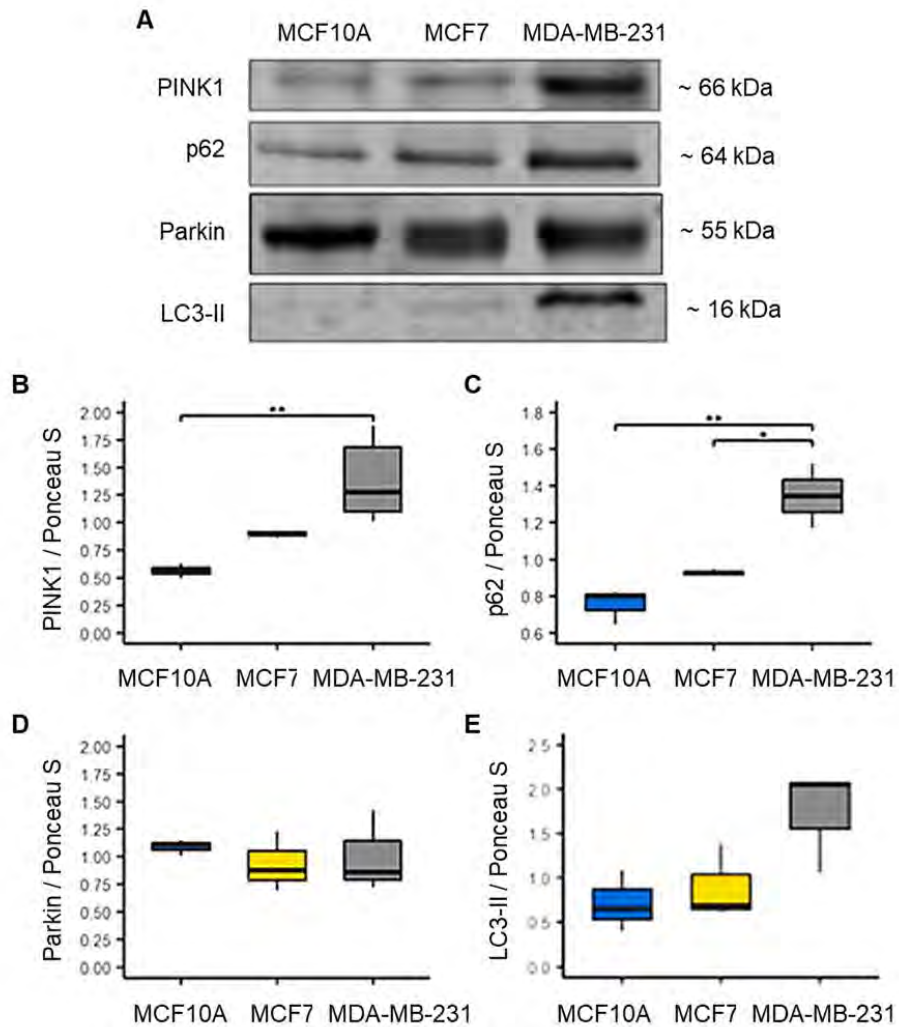


Figura 7. Aumento de los marcadores de mitofagia en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama. (A) Western Blots representativos. (B-E) Expresión de marcadores de mitofagia, cinasa 1 inducida por PTEN (PINK1), $n=6$; proteína de unión a ubiquitina p62 (p62), $n=3$; Parkin, $n=3$; y proteínas asociadas a microtúbulos 1A/1B cadena ligera 3B (LC3-II), $n=3$. Los valores de la densitometría se normalizaron mediante la tinción con rojo Ponceau S. Los datos se presentan como media \pm DE. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

6.3. Desacoplamiento mitocondrial en las líneas MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama

Para evaluar el estado funcional e investigar la capacidad de generación de adenosín trifosfato (ATP) de las mitocondrias, evaluamos el potencial de membrana mitocondrial como impulsor de la generación de ATP (Figura 8A) [67]. Como era de

esperar, el $\Delta\Psi_m$ disminuyó en ambas líneas celulares de cáncer de mama (Figura 8A, B); sin embargo, aunque no se encontraron diferencias significativas entre las líneas celulares, se observó que el $\Delta\Psi_m$ fue un poco más alto en la línea celular MCF7 que en la línea celular MDA-MB-231, como lo reflejo una mayor proporción de JC-1 de fluorescencia roja en comparación a la fluorescencia verde usando la sonda JC-1 (Figura 8B). Estos resultados correlacionaron con los resultados encontrados en mitofagia, lo que sugiere que la reducción de $\Delta\Psi_m$ favorece la reducción de masa mitocondrial por inducción de mitofagia y que la membrana interna mitocondrial se encuentra mejor conservada en la línea celular MCF7 que en la línea celular MDA-MB-231.

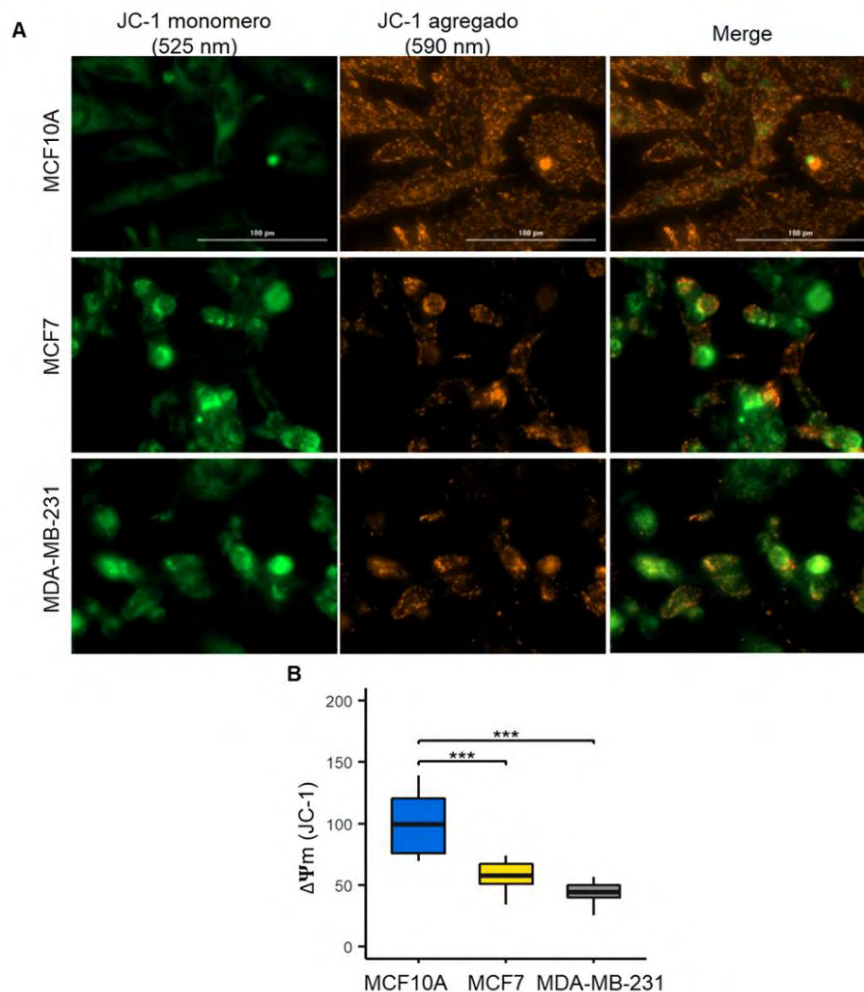


Figura 8. Disminución del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama. (A) Los niveles de $\Delta\Psi_m$ se evaluaron mediante la sonda JC-1; las células MCF10A con mitocondrias altamente

polarizadas acumulan el colorante JC-1 en la matriz mitocondrial, formando agregados J fluorescentes de color rojo. El aumento de la fluorescencia verde indica una disminución del potencial mitocondrial. (B) La fluorescencia JC-1 se cuantificó como la relación fluorescencia roja/fluorescencia verde en las líneas celulares MCF10A ($n=7$), MCF7 ($n=12$) y MDA-MB-231 ($n=11$). Los datos se obtuvieron a partir de tres réplicas biológicas. Los datos se normalizaron con los valores de las células MCF10A y se presentan como media \pm DE. *** $p<0.001$.

6.4. Sobreexpresión de HIF-1 α asociada a la reprogramación metabólica en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama

Aunque la glicólisis es un metabolismo dominante en las células cancerosas, existe evidencia de que las células cancerosas también utilizan OXPHOS mitocondrial [68–70]. Además, dado que las líneas celulares de cáncer de mama aquí estudiadas presentaron una función mitocondrial diferente, analizamos la expresión de la proteína cinasa activada por monofosfato de adenina (AMPK) y el factor 1 α inducible por hipoxia (HIF1 α) (Figura 9A) [71], para evaluar la contribución relativa del metabolismo oxidativo y glicolítico, respectivamente, en las líneas MCF7 y MDA-MB-231. Primero observamos una disminución significativa en la expresión de AMPK en ambas líneas celulares de cáncer de mama en comparación con la línea celular MCF10A, lo que sugiere que en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 hay una disminución del metabolismo oxidativo (Figura 9B). Por el contrario, se encontró que la expresión de HIF1 α aumentó significativamente en ambas líneas celulares de cáncer de mama en comparación con la línea celular MCF10A (Figura 9C), lo que sugiere que las líneas MCF7 y MDA-MB-231 tiene una preferencia por el metabolismo glicolítico. Este cambio de metabolismo energético se confirmó a través de la relación AMPK/HIF1 α . Se encontró que esta fue menor de uno en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 (Figura 9D), lo que reafirma que ambas líneas celulares tienen un metabolismo predominantemente glicolítico en comparación con la línea celular MCF10A.

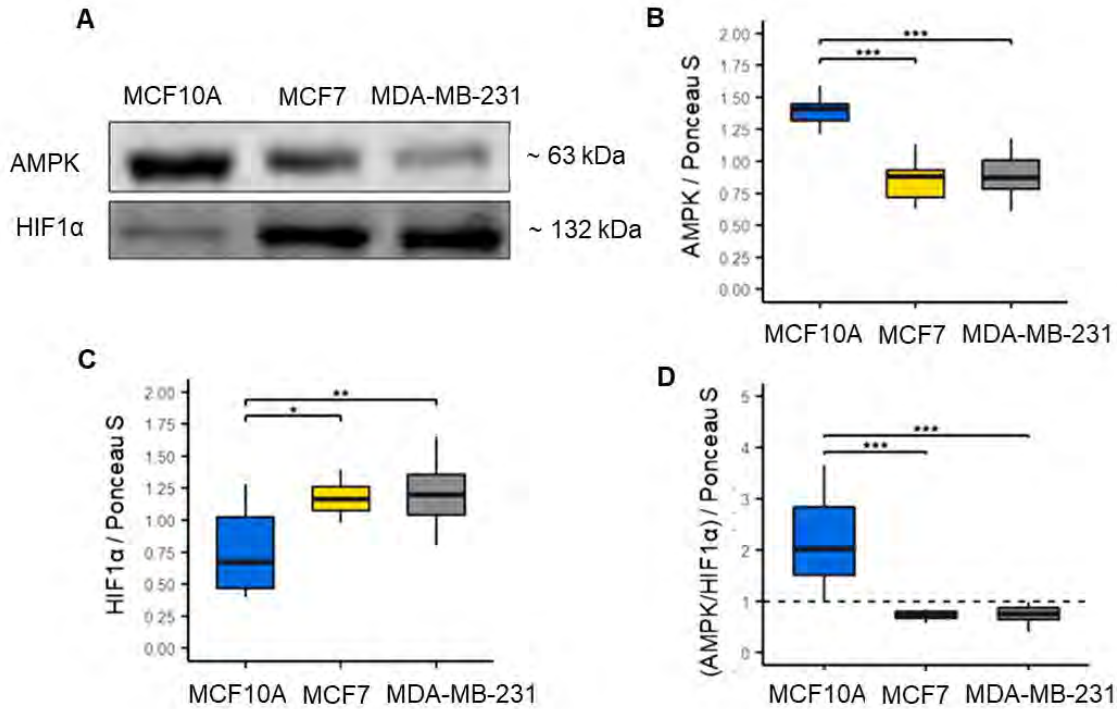


Figura 9. Reprogramación metabólica en líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama. (A) Western Blots representativos. (B) Expresión del marcador del metabolismo oxidativo, proteína cinasa activada por adenina monofosfato (AMPK), $n=12$. (C) Expresión del marcador del metabolismo glicolítico, factor inducible por hipoxia 1α (HIF1α), $n=12$. (D) Relación AMPK/HIF1α en las líneas celulares MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231; una relación inferior a uno (línea negra) refleja un metabolismo preferente glucolítico. Los valores de densitometría se normalizaron mediante la tinción con rojo Ponceau S. Los datos se presentan como media±DE. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

6.5. Estado funcional mitocondrial en líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama

Para evaluar la función comprometida de las mitocondrias y confirmar el hallazgo de una disminución de OXPHOS en líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, se evaluó la eficiencia respiratoria mitocondrial en las células intactas (Figura 10A), para evaluar el consumo de oxígeno celular (Rutina) (Figura 10B), la respiración asociada con la fosforilación oxidativa (P) (Figura 10C) y el control respiratorio (CR) (Figura 10D). Encontramos una disminución significativa en los parámetros de Rutina y P en las líneas celulares de cáncer de mama, notablemente más marcada en la línea MDA-MB-231 que en MCF7. Estos resultados reflejan que hay una

reducción de la actividad bioenergética mitocondrial, específicamente de la OXPHOS, en líneas celulares aquí estudiadas, lo que concuerda con la reducción de la masa mitocondrial. Además, estos resultados también sugieren un mayor desacoplamiento mitocondrial en la línea celular MDA-MB-231, como lo revela la disminución del CR.

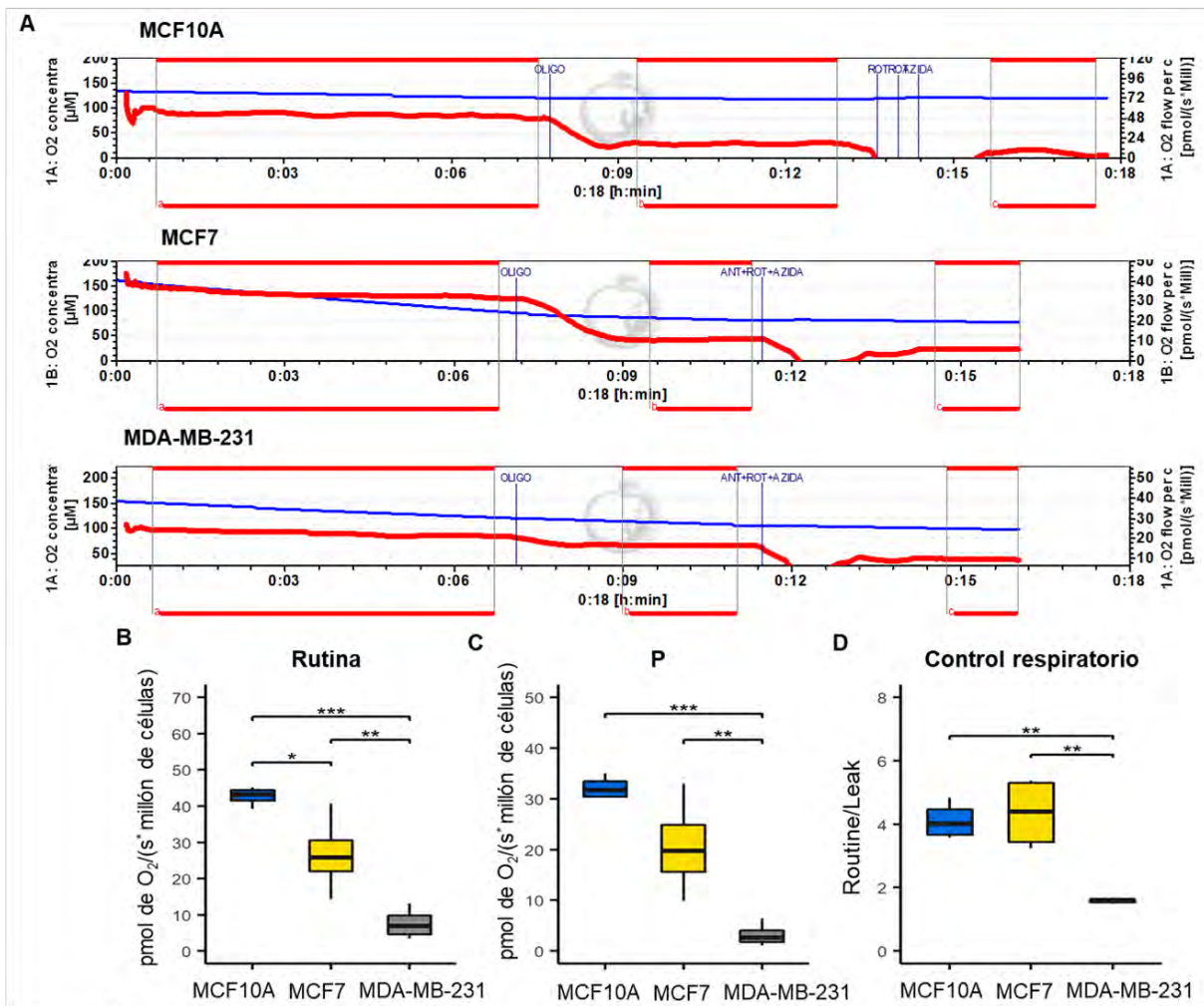


Figura 10. Eficiencia respiratoria mitocondrial de las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama. (A) Representación esquemática de la tasa de consumo de O₂ mediante la adición en orden de los inhibidores OLIGO (oligomicina) y ANT+ROT+AZIDA (antimicina A más rotenona más azida sódica) para determinar los parámetros respiratorios en las líneas celulares MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231. La línea azul muestra la concentración de oxígeno en la cámara, mientras que la línea roja indica la tasa de consumo de oxígeno. (B) Respiración celular de rutina (Rutina), que corresponde al consumo de oxígeno de las células. (C) Respiración asociada a la fosforilación oxidativa (P); (D) control respiratorio (CR) calculado como ratio rutina/fuga. Todos los parámetros se corrigieron restando la respiración no

mitocondrial, obtenida por la adición de ANT+ROT+AZIDA. Los datos se presentan como media±DE, $n=3-4$. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

6.6. Aumento de la producción de ROS en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama

El aumento de la producción de ROS es una característica asociada con la disfunción mitocondrial [72,73]. Además, la evidencia asocia el aumento de la producción de ROS con la malignidad de las células cancerosas [74,75]. El marcador MitoSOX Red se ha utilizado para medir la producción de ROS mitocondrial, ya que este se acumula preferentemente dentro de la matriz mitocondrial [74–76]. Para evaluar las diferencias en la generación de ROS, utilizamos la sonda MitoSOX Red en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 y en la línea celular MCF10A (Figura 11A). Detectamos un aumento significativo de ROS en ambas líneas celulares de cáncer de mama en comparación con la línea celular de control. Además, encontramos que la producción de ROS fue mayor en la línea celular MDA-MB-231 que en la línea celular MCF7 (Figura 11B); estos resultados fueron congruentes con los resultados de desacoplamiento mitocondrial observado en esta línea celular. Estos resultados indican una alteración mitocondrial más notable en la línea celular MDA-MB-231, que puede estar relacionada con alteraciones en la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

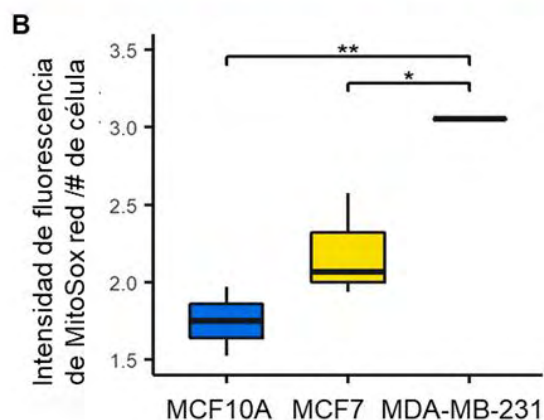
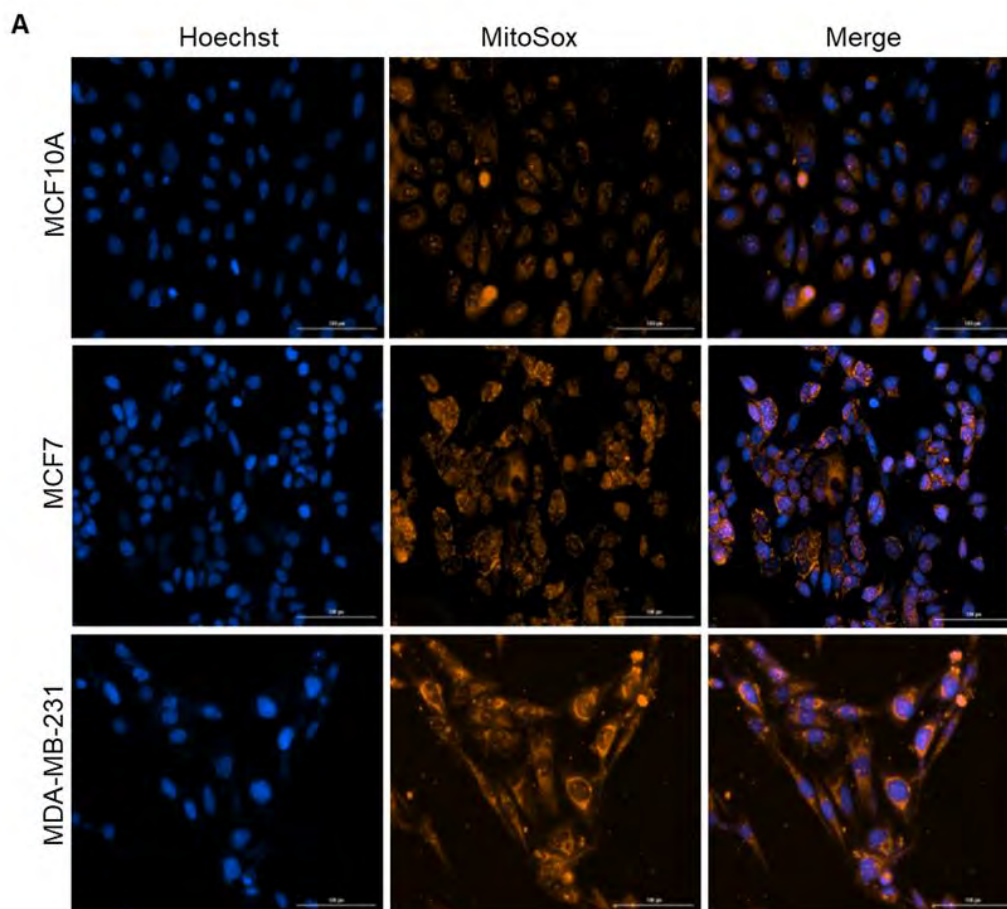


Figura 11. Aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231. (A) Las imágenes de microscopía confocal de las ROS mitocondriales se tiñeron con MitoSOX Red (rojo) en las células MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231 y los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul). (B) La producción de ROS mitocondrial se cuantificó mediante la relación de la intensidad de fluorescencia de MitoSOX Red/número de células. Los datos se obtuvieron a partir de tres réplicas biológicas. Los datos se presentan como media \pm DE de las células ($n=153-200$). * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

6.7. Proteoma mitocondrial de los subtipos moleculares luminal A y basal-like de cáncer de mama

Para realizar el análisis proteómico mitocondrial de los subtipos moleculares luminal A y basal-like de cáncer de mama, fueron reanalizados los datos proteómicos generados por Mertins et al [53]. Brevemente, el trabajo de Mertins et al. consistió en un análisis global del proteoma y del genoma de muestras de cáncer de mama clasificadas histológicamente y molecularmente [53]. Tras cotejar las 12,553 proteínas identificadas por Mertins et al.[53] contra la base de datos Mitominer [54], fueron identificadas 1,152 proteínas mitocondriales o de tránsito mitocondrial (consultar en la Tabla S2 en <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom12030379/s1>). De estas, 51 proteínas mitocondriales fueron eliminadas porque no tenían valores de abundancia en al menos el 50% de las muestras o presentaron valores de abundancia atípicos. Diecinueve muestras también fueron eliminadas del análisis, dos de estas debido a que presentaron patrones de abundancia atípicos y 17 confundidos en el análisis jerárquico de conglomerados (Figura 12A, B). Finalmente, el análisis se realizó con 1,103 proteínas, 42 expresadas exclusivamente en cáncer (consultar en la Tabla S3 en <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom12030379/s1>) y 1,061 con valores de abundancia en al menos el 50% de todas las muestras (consultar en la Tabla S4 en <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom12030379/s1>) y 28 muestras.

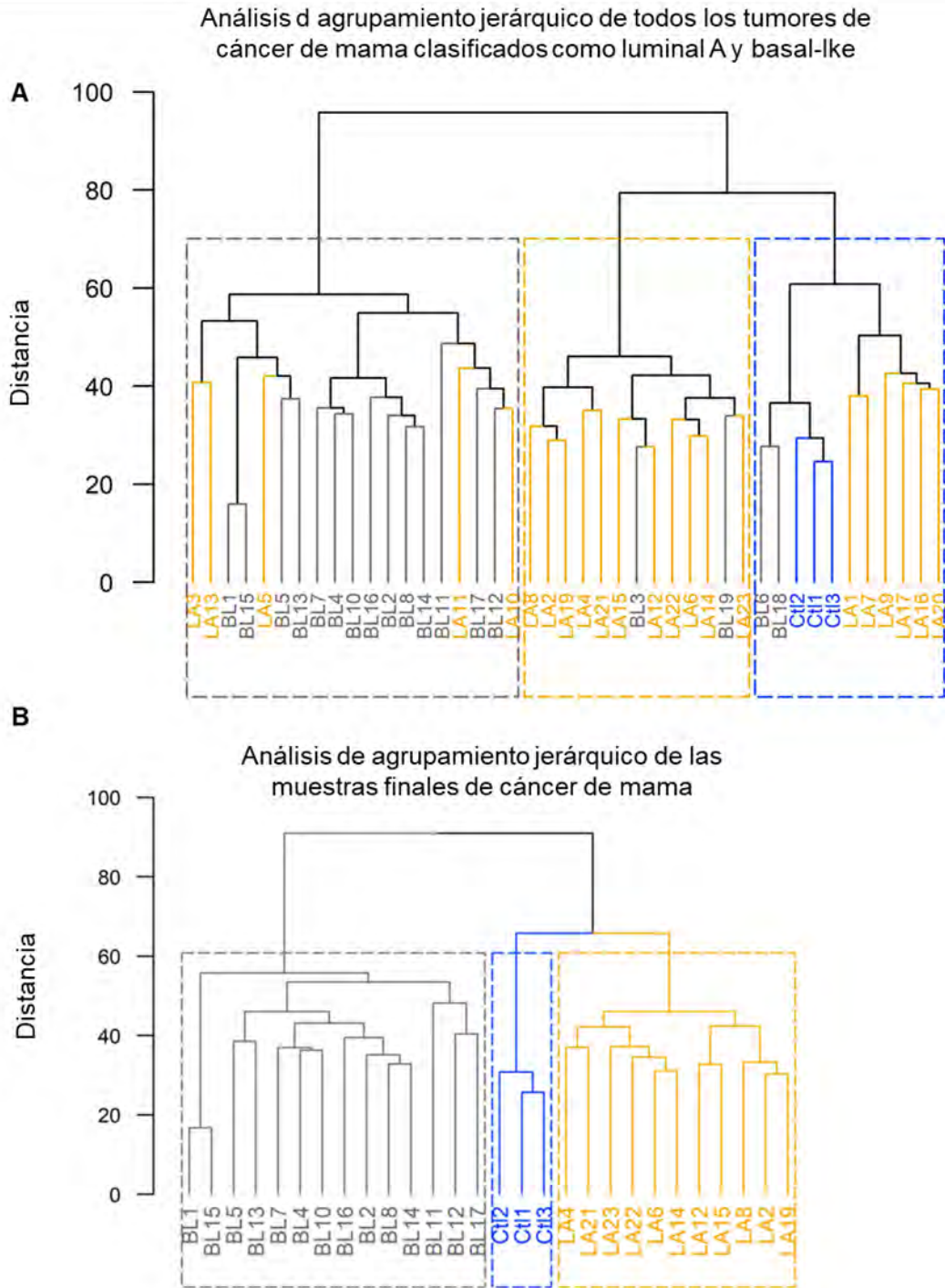


Figura 12. Análisis de agrupamiento jerárquico. (A) Análisis jerárquico con 3 muestras control (Ctl), 22 muestras de cáncer de mama luminal A (LA) y 18 muestras de cáncer de mama basal-like (BL), en el que se observa que, a pesar de la clasificación molecular de las pacientes con cáncer de mama, hay 10 muestras luminal A y 4 basal-like que se confunden con otros subtipos moleculares. (B) Eliminación de los 14 tumores de cáncer de mama, obteniendo grupos homogéneos para los subtipos luminal A y basal-like de cáncer de mama.

El PCA reveló que la variación de la abundancia de proteína total entre las muestras se explica por 27 componentes principales (PC); las dos primeras PC abarcan el 31% de la variabilidad de la abundancia total (consultar en la Tabla S5 en <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom12030379/s1>) y pueden diferenciar entre los subtipos luminal A, basal-like y del grupo de control (Figura 13A).

El mapa de calor revela que 477 proteínas cuya correlación con componente principal 1 o 2 (CP1 o CP 2) es inferior a -0.5 o superior a 0.5 (consultar en la Tabla S6 en <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom12030379/s1>) presentan un patrón de abundancia diferente entre las muestras pertenecientes a cada uno de los subtipos moleculares y el grupo control (Figura 13B). Se pueden distinguir cuatro patrones de expresión en el mapa de calor, uno en el que un conjunto de proteínas está sobre regulado en el luminal A y las muestras control y se regula a la baja en basal-like, un segundo patrón en el que las proteínas se regulan a la baja en los controles y se expresan moderadamente en los subtipos moleculares, en el tercer patrón un conjunto de proteínas están regulados a la baja en tumores luminales A y control y sobre expresadas en tumores basal-like y en el cuarto patrón se observa un conjunto de proteínas con expresión heterogénea entre subtipos moleculares y muestras control.

Además, un análisis de agrupamiento jerárquico aplicado a los datos de abundancia en el mapa de calor reveló la formación de tres grupos. El primer grupo (líneas amarillas) estaba enriquecido con los tumores luminales A, las muestras control enriquecían el segundo grupo (líneas azules) y el tercer grupo (línea gris) estaba enriquecido con los tumores basal-like, lo que reflejó las diferencias entre los patrones de abundancia del proteoma mitocondrial entre estos subtipos moleculares de cáncer de mama (Figura 13B).

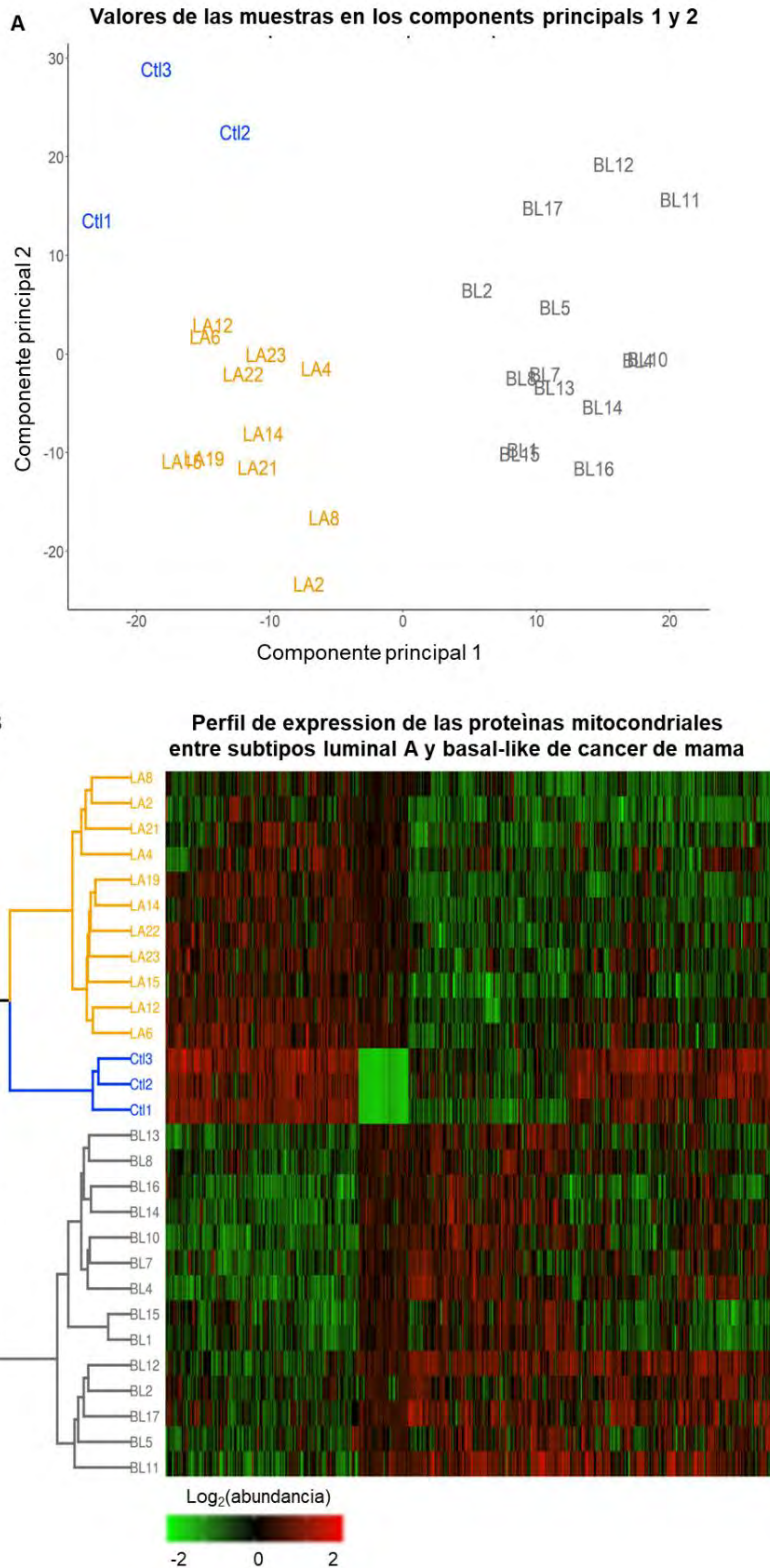


Figura 13. Análisis del proteoma mitocondrial de los tumores luminal A y basal-like. (A) Análisis de componentes principales del proteoma mitocondrial en muestras control (Cti) y en tumores de cáncer de mama luminal A (LA) y basal (BL). (B) Mapa

de calor y análisis de conglomerados jerárquicos de la abundancia de proteínas mitocondriales identificadas en las muestras de control, y en tumores de cáncer de mama luminal A y basal-like.

6.8. Alteraciones mitocondriales características en el cáncer de mama de tipo A luminal y basal-like

Para validar y profundizar los resultados encontrados en líneas celulares sobre los procesos mitocondriales de fusión (FUS), fisión (FIS), mitofagia (MIT), ROS, $\Delta\Psi_m$ (PMM) y procesos de organización de la membrana mitocondrial (MMO), el análisis de sobrerrepresentación de estos procesos fue realizado con las proteínas que tuvieron un valor absoluto de asociación con los dos primeros componentes igual o mayor a 0.5, para distinguir entre subtipos moleculares. Al realizar el análisis de sobrerrepresentación de los procesos biológicos con las proteínas mitocondriales, no se localizó el proceso de biogénesis mitocondrial, posiblemente debido a que la biogénesis mitocondrial es un proceso que requiere la intervención del núcleo celular. Para proporcionar información sobre la biogénesis mitocondrial, se eligió el proceso MMO. De las 519 proteínas mitocondriales utilizadas para el análisis de sobrerrepresentación (consultar en la Tabla S7 en <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom12030379/s1>), se encontraron 5,717 procesos biológicos sobrerrepresentados (consultar en Tabla S8 en <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom12030379/s1>), y se encontró que un total de 54 proteínas estaban involucradas en los procesos biológicos analizados en este trabajo.

Se obtuvo una firma mitocondrial con las 54 proteínas mitocondriales que nos presentan patrones de abundancia de proteínas involucradas en dinámica mitocondrial, biogénesis, mitofagia, potencial de membrana mitocondrial y ROS (Figura 14). Además, en la firma aquí propuesta se observa que las proteínas pueden estar involucradas en uno o varios procesos biológicos.

Además, se encontraron patrones de expresión de proteínas característicos para cada una de las muestras. En los tumores luminales A, encontramos la sobreexpresión de las proteínas GPX1, CCS, ENDOG, MAPK3 y RIPK3

involucradas en ROS; PRDX3 y SOD1 en los procesos ROS y PMM; TIMM10B, NDUFA13, APOOL, MICOS13 y TIMM10 del proceso MMO; BCL2 involucrado en los procesos MMO, PMM y ROS; PARK7 en procesos MIT, PMM y ROS; ATG2B en el MIT; FIS1 en FIS y MIT y MTFR1L en FIS en comparación con los tumores basal-like. Sin embargo, encontramos la subexpresión de las proteínas CDK1, TRAP1 y TXNRD2 relacionadas con ROS; SRC, ABCD1 y LRRK2 en PMM y ROS; ROMO1 en MMO y ROS; STOML2, TOMM22, SLC25A31, MTX1, TIMM50, LETM1, OXA1L y MAIP1 en MMO; TSPO, SLC25A4 y PHB2 en MIT; y MFN2 y MFN1 en FUS en comparación con tumores basal-like.

En los tumores basal-like, encontramos la sobreexpresión de EEF2, CDK1, TRAP1 y TXNRD2 involucrada en ROS; SRC, ABCD1 y LRRK2 en procesos ROS y PMM; ROMO1 en ROS y MMO; STOML2, MTX2, TOMM22, SLC25A31, MTX1, TIMM50, LETM1, OXA1L y MAIP1 en MMO; PHB2 en el MIT; TSPO en MIT y PMM; SLC25A4 en procesos MIT y MMO; MFN1 en FUS; MFN2 en procesos FUS y MMO; y MIEF1 en FIS en comparación con los tumores luminal A. Sin embargo, encontramos la subexpresión de las proteínas: PRDX2, GPX1, CCS, PRDX5, ENDOG, MAPK3, AIFM1 y RIPK3 involucradas en ROS; TUSC2 en PMM; PRDX3 y SOD1 en procesos PMM y ROS; TIMM22, TIMM10B, NDUFA13, APOOL, MICOS13, TIMM10, ALKBH7, RHOT1 en MMO; BCL2 en procesos MMO, PMM y ROS; PARK7 en procesos MIT, PMM y ROS; ATG2B y FUNDC2 en MIT; MTFR1L en FIS; y FIS1 en procesos FIS y MIT en comparación con tumores luminal A.

Además, en el caso de las muestras control, encontramos la sobreexpresión de las proteínas: PRDX2, PRDX5 y AIFM1 implicadas en ROS; TUSC2 en PMM; ALKBH7, RHOT1, SAMM50, IMMT y HSPA9 en el MMO; y FUNDC2 en MIT en comparación con los tumores luminal A y basal-like. Sin embargo, encontramos la subexpresión de las proteínas EEF2 y GLRX2 involucradas en ROS; MTX2 en MMO; USP30 en el MIT; TSPO en procesos MIT y PPM; BAX en FUS; y MTFR1L y MIEF1 en FIS en comparación con los tumores de cáncer de mama luminal A y basal-like.

En general, estos perfiles de expresión de proteínas descritos anteriormente nos permiten distinguir entre tumores luminales A y de tipo basal y distinguir entre mujeres con y sin cáncer. También vale la pena mencionar que estos resultados obtenidos en mujeres con cáncer de mama luminal A y basal-like se correlacionan con los datos encontrados en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231.

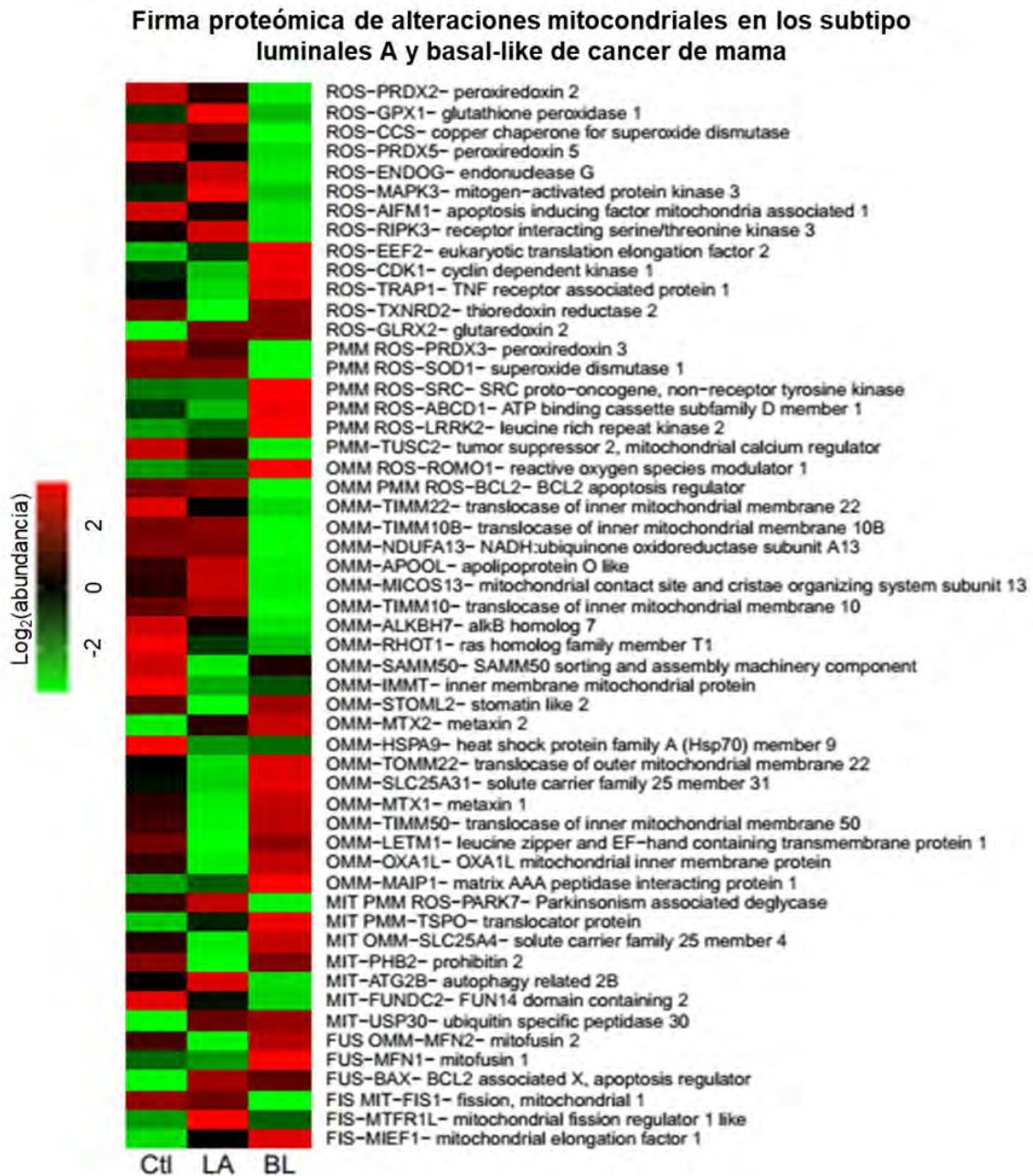


Figura 14. Alteraciones mitocondriales características en el cáncer de mama de tipo luminal A y basal-like. Perfiles de expresión de proteínas implicadas en la regulación

y formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), potencial de membrana mitocondrial (MMP), organización de la membrana mitocondrial (MMO), mitofagia (MIT), fusión mitocondrial (FUS) y fisión mitocondrial (FIS), en muestras de control (Ctl), luminal A (LA) y tumores de cáncer de mama tipo basal (BL).

6.9. Firma proteómica de la OXPHOS en cáncer de mama luminal A y basal-like

Además, generamos una firma que presenta exclusivamente los patrones de abundancia de las proteínas de la OXPHOS entre los subtipos moleculares luminal A y basal-like de cáncer de mama y las muestras de control para profundizar en el estado funcional de las mitocondrias y el potencial que puede tener para la detección de objetivos terapéuticos de OXPHOS en el cáncer de mama [77,78].

Primero evaluamos la expresión de los complejos mitocondriales en las líneas celulares por Wb, utilizando un cóctel que contenía anticuerpos contra una subunidad lábil para que cuando el complejo no está ensamblado. Se inmunodetectaron las siguientes subunidades de los complejos OXPHOS: NADH: Subunidad B8 de ubiquinona oxidorreductasa (CI-NDUFB8), subunidad B del complejo hierro-azufre succinato deshidrogenasa (CII-SDHB), proteína del núcleo de la ubiquinol-citocromo c reductasa 2 (CIII-UQCRC2), subunidad catalítica de citocromo c oxidasa mitocondrial (CIV-MTCO1) y subunidad alfa de ATP sintasa F (CV-ATP5A) (Figura 15A). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas, pero observamos una tendencia a disminuir la expresión de CIII-UQCR2, CIV-MTCOI y CV-ATP5A en la línea MDA-MB-231 (Figura 15B).

Además, realizamos un análisis de sobrerrepresentación de la OXPHOS con proteínas del ACP para generar perfiles de expresión con proteínas de la OXPHOS (Figura 15C). Encontramos en los tumores luminales A, la sobreexpresión de las proteínas NDUFS3, NDUFV2, NDUFV3, NDUFA2, NDUFV1 y NDUFA10, y la subexpresión de las proteínas NDUFB9, NDUFA4, NDUFB10, NDUFS2 y NDUFB5 del CI; y la subexpresión de las proteínas COX5A, COX5B, COX7A2, COX7C y COX4I1 del CIV. En los tumores basal-like encontramos la sobreexpresión de las

proteínas NDUFB9, NDUF4A, NDUF52 y NDUF55 del CI; la sobreexpresión de la proteína SDHA del CII; la sobreexpresión de las proteínas CYCS y CYC1 del CIII y la sobreexpresión de la proteína UQCRC2 del CIII, confirmando los hallazgos en líneas celulares por western blot. Además, en este mismo tipo de tumor observamos una sobreexpresión de las proteínas COX5A, COX5B, COX7A2, COX7C y COX4I1 del CIV; y subexpresión de las proteínas ATP5F1D, ATP5L, ATP5H, ATP5F1A, ATP5I, ATP5O, ATP5F1B y ATP5F1 del CV. También observamos expresión heterogénea de proteínas CI y CIII entre los dos subtipos moleculares de cáncer de mama aquí estudiados.

Estos hallazgos revelan que los defectos en los complejos OXPHOS afectaron la función mitocondrial, como se encontró en los experimentos anteriores. Creemos que estas marcadas diferencias de expresión entre las proteínas de los complejos de la OXPHOS podrían ser de valor diagnóstico, ya que presentan una correlación con la agresividad del tipo de cáncer de mama.

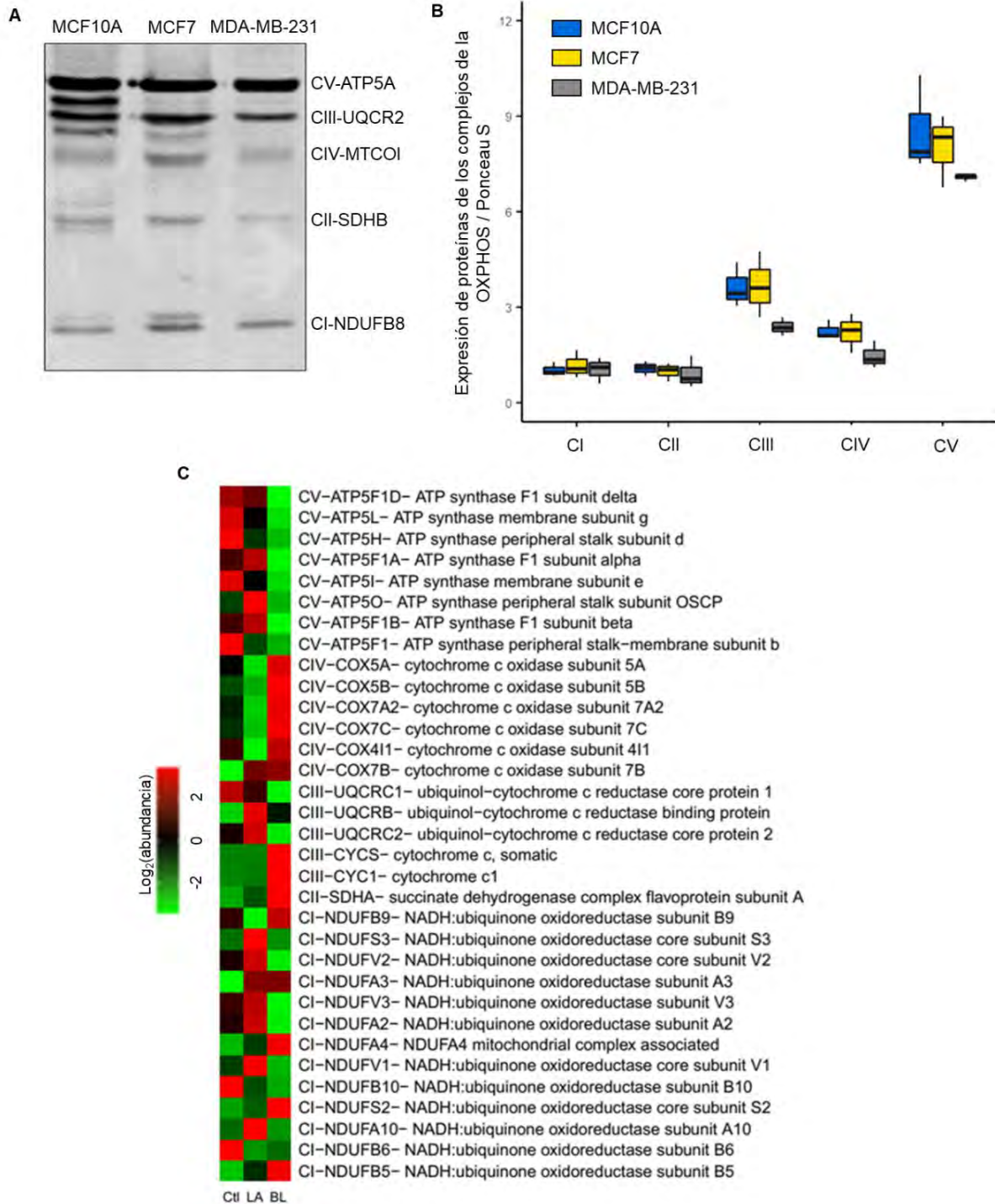


Figura 15. Perfiles de expresión de proteínas de la OXPHOS en los subtipos luminal A y basal-like del cáncer de mama. (A, B) Western blot y expresión de proteínas de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) en las líneas celulares MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231. Los valores de densitometría se normalizaron mediante la tinción con rojo Ponceau. Los datos se presentan como media \pm DE, $n=3$. (C) Perfiles de expresión de proteínas de los complejos OXPHOS en muestras de control, luminal A, tumores de cáncer de mama de tipo basal.

7. Discusión

A pesar de todas las evidencias del papel crítico de las mitocondrias en el cáncer, pocos estudios hasta la fecha se han centrado en hacer evidente las diferencias mitocondriales entre los subtipos moleculares de cáncer de mama, y las alteraciones en la dinámica mitocondrial y su relación con los diferentes procesos mitocondriales y celulares.

El equilibrio entre la fusión y la fisión mitocondrial es crucial para la conservación de la función mitocondrial. Los cambios en la dinámica mitocondrial se han asociado con la alteración del contenido mitocondrial, la función bioenergética y la malignidad en las células cancerosas [22–24,79].

En diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama, se ha reportado que el aumento de la fisión mitocondrial se asocia principalmente a las proteínas Drp1 y Fis1, y la disminución de la fusión mitocondrial, estas alteraciones son asociadas con un mal pronóstico y la agresividad del cáncer [20,66]. Este trabajo demuestra la expresión diferencial de las proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial entre los subtipos luminal A y el basal-like de cáncer de mama. Tanto en los análisis realizados en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 como en el análisis del proteoma mitocondrial en mujeres con cáncer de mama, encontramos una expresión disminuida de las proteínas de fisión mitocondrial Drp1 en la línea celular MDA-MB-231 (Figura 5E) y Fis1 en los tumores basal-like (Figura 14). Por el contrario, se observó la sobreexpresión de las proteínas Mfn 1 y 2 en los tumores de tipo basal (Figura 5C, D) y la sobreexpresión de Opa1 en la línea celular MDA-MB-231 (Figura 5B). Estos resultados sugieren un aumento de la fusión mitocondrial en los tumores basal-like y una disminución de la fusión mitocondrial en los tumores del subtipo luminal A. Se han encontrado resultados similares en cáncer gástrico y de pulmón, en los que también han descrito una sobreexpresión de Mfn2 [23,26]. Además, en el estudio de Y. Lou et al., también se observó que el silenciamiento de Mfn2 en el cáncer de pulmón da lugar a la inhibición de la proliferación celular sin afectar a la apoptosis de las células [80]. Asimismo, en un estudio en pacientes con cáncer de mama encontraron que la fisión mitocondrial puede inhibir la metástasis

en cáncer de mama triple negativo y que los genes asociados a la fisión mitocondrial se correlacionan con una mejor supervivencia. En comparación, los genes de fusión se correlacionan con una peor supervivencia [62]. Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que la dinámica mitocondrial tiene un efecto más complejo en las células de cáncer de mama de lo que se ha considerado, la cual no ha sido completamente dilucidada.

Además, de acuerdo con el análisis del proteoma mitocondrial (Figura 14), se sugiere que el factor de elongación mitocondrial 1 (MIEF1) puede ser un regulador central de la fisión mitocondrial en los tumores basal-like. Las investigaciones en cáncer colorrectal han informado que la división mitocondrial se ve afectada por MIEF1 [80]. Sin embargo, pocos estudios han explorado la influencia del MIEF en el cáncer de mama.

Por otro lado, este controvertido hallazgo puede estar relacionado con el aumento de la masa mitocondrial observado en las células basal-like (Figura 6A, B). Está bien establecido que tanto la biogénesis mitocondrial como la mitofagia son esenciales para preservar el control de la calidad mitocondrial [81,82]. Como se ha mencionado, sorprendentemente encontramos un aumento de la proteína PGC1 α en la línea celular MDA-MB-231 (basal-like) en comparación con las líneas celulares MCF7 (luminal A) y MCF10A (control) (Figura 6D). Este aumento de los niveles de PGC1 α puede ser el resultado de un mecanismo compensatorio inducido por la disminución de la respiración mitocondrial y el desacoplamiento en la OXPHOS (Figura 10B, C), ya que la biogénesis mitocondrial mediada por PGC-1 α aumenta el número de mitocondrias y sustituye a las mitocondrias dañadas. En concordancia con nuestros resultados, estudios proteómicos en cáncer también han encontrado la sobreexpresión de proteínas involucradas en la biogénesis mitocondrial. Adicionalmente, estudios previos han encontrado la relación que existe entre la activación de AMPK y HIF1 con la biogénesis mitocondrial, en los que observan que el ambiente hipóxico de los tumores puede inducir la activación de AMPK en respuesta al estrés energético causado. Por lo tanto, la inducción de AMPK estimula la biogénesis mitocondrial, adicionalmente, estas condiciones de estrés causadas

por deficiencia de oxígeno inducen la activación de HIF1 α lo que provoca la disminución de la masa mitocondrial [27]. Esta relación entre HIF1 α y biogénesis mitocondrial podría explicar la disminución de expresión de PGC1 α encontrada en la línea celular MCF7, lo que sugiere que la activación de HIF1 α , además de tener un papel clave en el desarrollo del fenotipo Warburg, también regula la masa mitocondrial. A pesar de que son pocos los estudios que han estudiado la relación entre HIF1 α y biogénesis mitocondrial, resultados similares a los encontrados en la línea celular MCF7 han sido observados en cáncer renal [15,27]. Con base a lo anterior, es claro que la regulación de la biogénesis mitocondrial se encuentra relacionada por el estado metabólico, el tipo celular, el ambiente celular y el estado tumoral [83].

Además, la fusión mediada por la Mfn 2 disminuye el daño que se acumula en las mitocondrias [66]. Por lo tanto, estos datos sugieren una función mitocondrial significativamente alterada en la línea celular MDA-MB-231 que en la línea celular MCF7. Además, encontramos un aumento significativo en la expresión de las proteínas PINK1 y p62 de mitofagia que contribuyen a eliminar el daño mitocondrial (Figura 7B, C). Además, aunque no se observaron diferencias significativas en la expresión de LC3-II entre las líneas celulares de cáncer de mama, se observó una tendencia al aumento, especialmente en la línea celular MDA-MB-231 (Figura 7E). Este aumento de la expresión de las proteínas asociadas a la mitofagia puede estar relacionado con la disminución de la OXPHOS en ambas líneas celulares de cáncer de mama. Además de la disminución de la función mitocondrial, encontramos que la activación de la mitofagia es una respuesta a la disminución del potencial de membrana mitocondrial (Figura 8A, B). En consonancia con nuestros resultados, estudios previos han informado de que los niveles elevados de proteínas LC3, PINK1 y p62 se asocian a pacientes con cáncer de mama triple negativo y a una mala respuesta a la quimioterapia; también se han encontrado resultados similares en cáncer colorrectal, gástrico, melanoma maligno y cáncer de esófago [82,84–87]. Esto demuestra que la deficiencia de la actividad mitocondrial se correlaciona con la capacidad invasiva y metastásica del subtipo basal-like [82].

Además, se ha descrito que la proteína FUNDC1, un receptor de mitofagia en mamíferos, puede regular la fusión, fisión mitocondrial y la mitofagia mediante la interacción con DNM1L/Drp1 y Opa1. Adicionalmente, se ha encontrado que FUNDC1 puede inducir la mitofagia mediante el reclutamiento de LC3 [82]. Sin embargo, en este trabajo no se logró la identificación de la proteína FUNDC1, pero sí de la proteína FUNDC2 (Figura 14), que también está asociada a la autofagia de las mitocondrias [88]. En un estudio previo, se ha asociado la sobreexpresión del gen FUNDC2 en casos de metástasis cerebral de cáncer de mama [89]; desafortunadamente, hasta ahora, hay pocos estudios sobre esta proteína en el cáncer.

Las células cancerosas tienen exigencias metabólicas particulares para su proliferación y supervivencia. Aunque el papel de la dinámica mitocondrial en la regulación del metabolismo aún no está bien dilucidado, se ha demostrado que la fusión mitocondrial puede promover la capacidad de OXPHOS; por lo tanto, la fisión mitocondrial puede estar relacionada principalmente con un fenotipo glucolítico [90]. Se ha demostrado que la plasticidad metabólica en el cáncer de mama tiene la capacidad de promover la supervivencia de las células tumorales en las últimas etapas y la formación de tumores recidivantes y metástasis en los pacientes. Para investigar la actividad energética mitocondrial en las líneas celulares de cáncer de mama, evaluamos los parámetros respiratorios P y CR que reflejan la respiración asociada a la mitocondrial y la capacidad de generar ATP a través de la OXPHOS, respectivamente (Figura 10C, D) y adicionalmente evaluamos la expresión de AMPK y HIF1 α , que se han considerado moduladores del metabolismo oxidativo y glucolítico, respectivamente [91,92]. En conjunto, estos datos confirmaron que tanto las líneas celulares MCF7 como MDA-MB-231 muestran una preferencia por el metabolismo glucolítico sobre el oxidativo (Figura 9D). Esta preferencia por el metabolismo glucolítico en ambas líneas celulares de cáncer de mama puede deberse a una disminución de la capacidad respiratoria mitocondrial, que fue más evidente en la línea celular basal-like por una marcada disminución de la respiración mitocondrial y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en comparación con la línea celular luminal A. Con respecto a estas alteraciones mitocondriales, a través

del análisis proteómico, presentamos una firma única de la OXPHOS que captura la expresión diferencial de las proteínas de los complejos entre los tumores luminales A y los basales (Figura 15C), que podría ser de gran utilidad en la exploración de nuevas dianas terapéuticas para el cáncer de mama [93]. Esta firma demuestra una menor expresión principalmente de los complejos I y V en los tumores basal-like que en los tumores luminal A. Nuestros resultados coinciden con un estudio anterior de Lunetti et al. [94] en el que se sugirió que la deficiencia del complejo I puede ser compensada por una mayor actividad del complejo IV [94]. También, en concordancia con nuestros resultados, esta desregulación de la OXPHOS ha sido descrita en diferentes tipos de cáncer, incluidos el cáncer de mama, gástrico, carcinoma hepatocelular y cáncer de pulmón de células no pequeñas. Esta reducción de la actividad de la OXPHOS puede estar asociada a mutaciones en el DNA mitocondrial que afecten a la OXPHOS [13,35,95]. Apoyando la idea de la aplicación terapéutica de los inhibidores dirigidos a la OXPHOS, nuestros datos muestran concordancia con este enfoque, que también podría ayudar a sensibilizar al cáncer de mama avanzado. Por ejemplo, Raninga et al. [96] demostraron que marizomib (Mzb), un inhibidor del proteosoma, inhibe el complejo II, lo que conduce a una reducción de la OXPHOS, induce la apoptosis dependiente de la caspasa-3 y reduce el crecimiento del tumor en el cáncer de mama triple negativo, y reduce las metástasis en los cánceres de pulmón y cerebro [96]. Otro enfoque es el uso de la metformina como terapia anticancerígena, ya que se ha demostrado que la metformina reduce los niveles de metabolitos mitocondriales e inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo, el mecanismo de acción de la metformina aún no está claro; los estudios sugieren que puede activar la AMPK o reducir la proteína cinasa B fosforilada (pAKT) [78,97].

Está bien establecido que las alteraciones en la cadena respiratoria y el aumento de HIF1 α , pueden aumentar la producción de ROS, y podrían estar implicados como iniciadores, promotores, y la transformación neoplásica, ya que pueden actuar como agentes impulsores de mutaciones e interactuar con las vías de señalización [98,99]. También se ha sugerido que el aumento de la generación de ROS puede desempeñar un papel importante en la autofagia mediante la activación de las vías

de señalización [100]. Hemos demostrado que la línea celular MDA-MB-231 produce niveles de ROS más significativos que la línea celular MCF7 (Figura 11B). Este aumento de la producción de ROS puede estar asociado a la alteración del CI mitocondrial [94]. Estas diferencias en la producción de ROS entre las líneas de cáncer de mama se correlacionan con estudios anteriores que demuestran que el aumento de la producción de ROS en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo tiene un papel pro tumorigénica en la señalización oncogénica necesaria para su proliferación y supervivencia y quizás para promover el potencial metastásico [73,94].

Por otro lado, a pesar de las limitaciones que tiene el uso de líneas celulares como lo es la deriva génica, fenotípica y la falta de capacidad para reflejar la heterogeneidad intertumoral [101], en este trabajo, demostramos que la explotación de datos proteómicos de repositorios puede ser una valiosa estrategia/alternativa que nos permitió integrar y profundizar sobre los procesos de dinámica y bioenergética mitocondrial. Esta estrategia nos permitió obtener perfiles de expresión del proteoma mitocondrial que distingue entre tumores luminal A y basal-like de cáncer de mama, también nos permitió poder discriminar entre cáncer de mama de las muestras no tumorigénicas (Figura 14). En general, el análisis del proteoma mitocondrial nos permitió reflejar que (1) las mitocondrias desempeñan un papel esencial en el desarrollo del cáncer de mama; (2) las alteraciones mitocondriales se asocian a una mayor agresividad y potencial metastásico de esta enfermedad; (3) las mitocondrias pueden reflejar diferencias funcionales entre los subtipos luminal A y basal-like; y (4) que el proteoma mitocondrial puede ser complementario a la clasificación molecular del cáncer de mama, y de gran utilidad para la estratificación de pacientes y para la búsqueda de nuevos marcadores de valor diagnóstico y terapéutico.

Por otra parte, creemos que debería considerarse la inclusión de biomarcadores mitocondriales en las firmas moleculares de cáncer de mama, como el PAM50, Oncotype DX, MammaPrint e IHC4 [102], para lograr un mejor reflejo de las diferencias biológicas intrínsecas entre subtipos moleculares, lo que repercutiría en

el diagnóstico e incluso en el tratamiento de las pacientes. Esto se debe a que estas firmas aún no son suficientes para distinguir entre los subtipos moleculares de cáncer de mama, como se muestra en la Figura 12A, donde se puede ver que algunos tumores luminal A se confunden con tumores basal-like.

Por lo tanto, en este trabajo proponemos dos firmas mitocondriales que permiten distinguir entre tumores de cáncer de mama de tipo luminal A de los basal-like, a partir de las cuales se podrían identificar potenciales biomarcadores de uso diagnóstico y/o terapéutico.

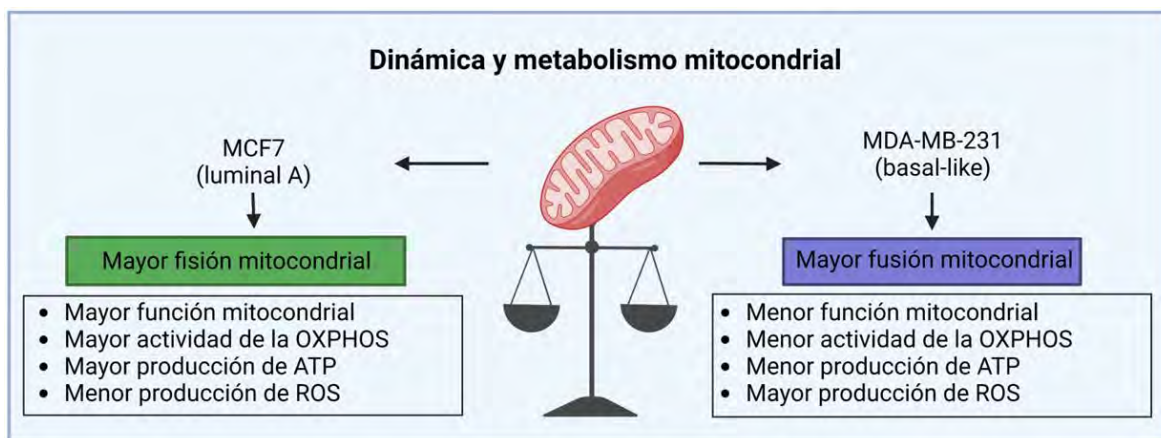


Figura 16. Esquema integrativo de las alteraciones en la dinámica y bioenergética mitocondrial en los subtipos moleculares luminal A y basal-like. De acuerdo con los resultados obtenidos de dinámica y bioenergética mitocondrial en las líneas celulares de cáncer de mama y del análisis del proteoma mitocondrial en los subtipos moleculares luminal A y basal-like de cáncer de mama se encontró que para la línea celular MCF7 y los tumores de tipo luminal A tienen aumentada la fisión mitocondrial, la cual puede estar asociada a una función mitocondrial y actividad de la OXPHOS más conservadas, con una mejor capacidad de producción de ATP y a una menor producción de ROS; mientras que la línea celular MDA-MB-231 y los tumores basal-like tienen aumentada la fusión mitocondrial, la cual puede estar relacionada con una mayor deterioro de la función mitocondrial, la cual se ve reflejada por una menor actividad de la OXPHOS, menor capacidad de reducción de ATP y mayor producción de ROS. Figura creada con Biorender.

8. Conclusiones

Los avances en las técnicas de alto rendimiento como la proteómica y la explotación de los datos generados por estas técnicas han sido de gran contribución en el conocimiento de la biología molecular del cáncer, permitiendo dilucidar

características moleculares de esta enfermedad, así como también, han sido de gran impacto en la detección de biomarcadores de diagnóstico y/o terapéuticos.

A pesar de las limitaciones de utilizar líneas celulares, aquí demostramos que, a través de una selección adecuada de las líneas, fue posible reflejar las diferencias entre el luminal A y el basal-like y la alta heterogeneidad que caracteriza al cáncer de mama. Además, demostramos que a través de la complementariedad de los estudios funcionales realizados en las líneas celulares de cáncer de mama y la explotación de los datos proteómicos de Mertins et al. [53] obtenidos de muestras de cáncer de mama, más un adecuado análisis estadístico, se generó una firma proteómica mitocondrial funcional que permite distinguir entre los subtipos luminal A y basal-like de cáncer de mama.

Además, demostramos que el desequilibrio de la dinámica mitocondrial puede estar asociado con la pérdida del control de calidad mitocondrial y con alteraciones en la bioenergética mitocondrial en los subtipos luminal A y basal-like de cáncer de mama. También demostramos la existencia de diferencias en el metabolismo energético mitocondrial entre las dos líneas celulares de cáncer de mama. A pesar de que ambas líneas celulares presentaron un fenotipo Warburg, la línea celular MCF7, representante del subtipo luminal A, se caracterizó por una eficiencia bioenergética más conservada, incluso con capacidad de generar ATP vía OXPHOS, mientras que, la línea celular MDA-MB-231, representante del subtipo basal-like presentó una disminución significativa de la respiración mitocondrial y un marcado desacoplamiento de la OXPHOS. También se demostró que ambas líneas celulares se caracterizaban por un aumento significativo de ROS, que puede deberse a alteraciones en los complejos de la OXPHOS, principalmente de los CIII, CIV y CV.

9. Perspectivas

Ya que consideramos que es de gran importancia continuar trabajando en el enriquecimiento de la clasificación molecular de cáncer de mama para poder proveer un mejor diagnóstico o para dirigir tratamientos alternativos, planteamos

como perspectiva de este trabajo la selección proteínas de la firma propuesta que puedan ser identificadas en la clínica ya sea por inmunohistoquímica o en suero.

10. Bibliografía

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424, doi:10.3322/caac.21492.
2. Globocan 2020 Available online: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=1.
3. Nagini, S. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2017**, *17*, 152–163, doi:10.2174/1871520616666160502122724.
4. Prat, A.; Perou, C.M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* **2011**, *5*, 5–23, doi:10.1016/j.molonc.2010.11.003.
5. Perou, C.M.; Sørlie, T.; Eisen, M.B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; Rees, C.A.; Pollack, J.R.; Ross, D.T.; Johnsen, H.; Akslen, L.A.; et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **2000**, *406*, 747–752, doi:10.1038/35021093.
6. Yersal, O. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J. Clin. Oncol.* **2014**, *5*, 412, doi:10.5306/wjco.v5.i3.412.
7. Harbeck, N.; Penault-Llorca, F.; Cortes, J.; Gnant, M.; Houssami, N.; Poortmans, P.; Ruddy, K.; Tsang, J.; Cardoso, F. Breast cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2019**, *5*, 66, doi:10.1038/s41572-019-0111-2.
8. Gao, J.J.; Swain, S.M. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. *Oncologist* **2018**, *23*, 556–565, doi:10.1634/theoncologist.2017-0535.
9. Ignatiadis, M.; Sotiriou, C. Luminal breast cancer: from biology to treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2013**, *10*, 494–506, doi:10.1038/nrclinonc.2013.124.
10. Tayyari, F.; Gowda, G.A.N.; Olopade, O.F.; Berg, R.; Yang, H.H.; Lee, M.P.; Ngwa, W.F.; Mittal, S.K.; Raftery, D.; Mohammed, S.I. Metabolic profiles of triple-negative and luminal A breast cancer subtypes in African-American identify key metabolic differences. *Oncotarget* **2018**, *9*, 11677–11690, doi:10.18632/oncotarget.24433.

11. Duffy, M.J.; McGowan, P.M.; Crown, J. Targeted therapy for triple-negative breast cancer: Where are we? *Int. J. Cancer* **2012**, *131*, 2471–2477, doi:10.1002/ijc.27632.
12. Hesketh, R. BRCA1, BRCA2. In *The Oncogene & Tumour Suppressor Gene Factsbook*; Elsevier, 1997; pp. 412–418.
13. Jiménez-Morales, S.; Pérez-Amado, C.; Langley, E.; Hidalgo-Miranda, A. Overview of mitochondrial germline variants and mutations in human disease: Focus on breast cancer (Review). *Int. J. Oncol.* **2018**, doi:10.3892/ijo.2018.4468.
14. Vyas, S.; Zaganjor, E.; Haigis, M.C. Mitochondria and Cancer. *Cell* **2016**, *166*, 555–566, doi:10.1016/j.cell.2016.07.002.
15. Ježek, P.; Plecítá-Hlavatá, L.; Smolková, K.; Rossignol, R. Distinctions and similarities of cell bioenergetics and the role of mitochondria in hypoxia, cancer, and embryonic development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42*, 604–622, doi:10.1016/j.biocel.2009.11.008.
16. Boland, M.L.; Chourasia, A.H.; Macleod, K.F. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 292, doi:10.3389/fonc.2013.00292.
17. Qattan, A.T.; Radulovic, M.; Crawford, M.; Godovac-Zimmermann, J. Spatial Distribution of Cellular Function: The Partitioning of Proteins between Mitochondria and the Nucleus in MCF7 Breast Cancer Cells. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 6080–6101, doi:10.1021/pr300736v.
18. Seyfried, T.N.; Flores, R.E.; Poff, A.M.; D'Agostino, D.P. Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis* **2014**, *35*, 515–527, doi:10.1093/carcin/bgt480.
19. Zong, W.-X.; Rabinowitz, J.D.; White, E. Mitochondria and Cancer. *Mol. Cell* **2016**, *61*, 667–676, doi:10.1016/j.molcel.2016.02.011.
20. Yu, R.; Lendahl, U.; Nistér, M.; Zhao, J. Regulation of Mammalian Mitochondrial Dynamics: Opportunities and Challenges. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2020**, *11*, 1–21, doi:10.3389/fendo.2020.00374.
21. Rodrigues, T.; Ferraz, L.S. Therapeutic potential of targeting mitochondrial dynamics in cancer. *Biochem. Pharmacol.* **2020**, *182*, 114282, doi:10.1016/j.bcp.2020.114282.
22. Kumar, S.; Ashraf, R.; C.K, A. Mitochondrial dynamics regulators: implications for therapeutic intervention in cancer. *Cell Biol. Toxicol.* **2021**, doi:10.1007/s10565-021-09662-5.

23. Guido, C.; Whitaker-Menezes, D.; Lin, Z.; Pestell, R.G.; Howell, A.; Zimmers, T.A.; Casimiro, M.C.; Aquila, S.; Ando, S.; Martinez-Outschoorn, U.E.; et al. Mitochondrial fission induces glycolytic reprogramming in cancer-associated myofibroblasts, driving stromal lactate production, and early tumor growth. *Oncotarget* **2012**, *3*, 798–810, doi:10.18632/oncotarget.574.
24. Boland, M.L.; Chourasia, A.H.; Macleod, K.F. Mitochondrial Dysfunction in Cancer. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, doi:10.3389/fonc.2013.00292.
25. Tan, Z.; Luo, X.; Xiao, L.; Tang, M.; Bode, A.M.; Dong, Z.; Cao, Y. The Role of PGC1 α in Cancer Metabolism and its Therapeutic Implications. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15*, 774–782, doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0621.
26. Fu, W.; Liu, Y.; Yin, H. Mitochondrial Dynamics: Biogenesis, Fission, Fusion, and Mitophagy in the Regulation of Stem Cell Behaviors. *Stem Cells Int.* **2019**, *2019*, 1–15, doi:10.1155/2019/9757201.
27. Thomas, L.W.; Ashcroft, M. Exploring the molecular interface between hypoxia-inducible factor signalling and mitochondria. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 1759–1777, doi:10.1007/s00018-019-03039-y.
28. Zong, W.-X.; Rabinowitz, J.D.; White, E. Mitochondria and Cancer. *Mol. Cell* **2016**, *61*, 667–676, doi:10.1016/j.molcel.2016.02.011.
29. Vara-Perez, M.; Felipe-Abrio, B.; Agostinis, P. Mitophagy in Cancer: A Tale of Adaptation. *Cells* **2019**, *8*, 493, doi:10.3390/cells8050493.
30. Rovini, A.; Heslop, K.; Hunt, E.G.; Morris, M.E.; Fang, D.; Gooz, M.; Gerencser, A.A.; Maldonado, E.N. Quantitative analysis of mitochondrial membrane potential heterogeneity in unsynchronized and synchronized cancer cells. *FASEB J.* **2021**, *35*, doi:10.1096/fj.202001693R.
31. Zorova, L.D.; Popkov, V.A.; Plotnikov, E.Y.; Silachev, D.N.; Pevzner, I.B.; Jankauskas, S.S.; Babenko, V.A.; Zorov, S.D.; Balakireva, A. V.; Juhaszova, M.; et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.* **2018**, *552*, 50–59, doi:10.1016/j.ab.2017.07.009.
32. Zhang, B.; Wang, D.; Guo, F.; Xuan, C. Mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in cancer stem cells. *Fam. Cancer* **2015**, *14*, 19–23, doi:10.1007/s10689-014-9757-9.
33. ZHENG, J. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncol. Lett.* **2012**, *4*, 1151–1157, doi:10.3892/ol.2012.928.
34. Isidoro, A.; Casado, E.; Redondo, A.; Acebo, P.; Espinosa, E.; Alonso, A.M.;

- Cejas, P.; Hardisson, D.; Fresno Vara, J.A.; Belda-Iniesta, C.; et al. Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* **2005**, *26*, 2095–2104, doi:10.1093/carcin/bgi188.
35. Ashton, T.M.; McKenna, W.G.; Kunz-Schughart, L.A.; Higgins, G.S. Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 2482–2490, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3070.
 36. Owens, K.M.; Kulawiec, M.; Desouki, M.M.; Vanniarajan, A.; Singh, K.K. Impaired OXPHOS Complex III in Breast Cancer. *PLoS One* **2011**, *6*, e23846, doi:10.1371/journal.pone.0023846.
 37. Solaini, G.; Sgarbi, G.; Baracca, A. Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2011**, *1807*, 534–542, doi:10.1016/j.bbabi.2010.09.003.
 38. Hammoudi, N.; Riaz Ahmed, K.B.; Garcia-Prieto, C.; Huang, P. Metabolic alterations in cancer cells and therapeutic implications. *Chin. J. Cancer* **2011**, *30*, 508–525, doi:10.5732/cjc.011.10267.
 39. Chandra, D.; Singh, K.K. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2011**, *1807*, 620–625, doi:10.1016/j.bbabi.2010.10.023.
 40. Hu, Y.; Xu, W.; Zeng, H.; He, Z.; Lu, X.; Zuo, D.; Qin, G.; Chen, W. OXPHOS-dependent metabolic reprogramming prompts metastatic potential of breast cancer cells under osteogenic differentiation. *Br. J. Cancer* **2020**, *123*, 1644–1655, doi:10.1038/s41416-020-01040-y.
 41. CUSABIO Available online: <https://www.cusabio.com/pathway/Oxidative-Phosphorylation.html> (accessed on Jul 26, 2022).
 42. Yu, L.; Lu, M.; Jia, D.; Ma, J.; Ben-Jacob, E.; Levine, H.; Kaiparettu, B.A.; Onuchic, J.N. Modeling the Genetic Regulation of Cancer Metabolism: Interplay between Glycolysis and Oxidative Phosphorylation. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 1564–1574, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2074.
 43. Mani, D.R.; Krug, K.; Zhang, B.; Satpathy, S.; Clauser, K.R.; Ding, L.; Ellis, M.; Gillette, M.A.; Carr, S.A. Cancer proteogenomics: current impact and future prospects. *Nat. Rev. Cancer* **2022**, doi:10.1038/s41568-022-00446-5.
 44. Willmann, L.; Schlimpert, M.; Halbach, S.; Erbes, T.; Stickeler, E.; Kammerer, B. Metabolic profiling of breast cancer: Differences in central metabolism between subtypes of breast cancer cell lines. *J. Chromatogr. B* **2015**, *1000*, 95–104, doi:10.1016/j.jchromb.2015.07.021.

45. Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254, doi:10.1006/abio.1976.9999.
46. Ziegler, Y.S.; Moresco, J.J.; Tu, P.G.; Yates, J.R.; Nardulli, A.M. Plasma Membrane Proteomics of Human Breast Cancer Cell Lines Identifies Potential Targets for Breast Cancer Diagnosis and Treatment. *PLoS One* **2014**, *9*, e102341, doi:10.1371/journal.pone.0102341.
47. Romero-Calvo, I.; Ocón, B.; Martínez-Moya, P.; Suárez, M.D.; Zarzuelo, A.; Martínez-Augustin, O.; de Medina, F.S. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal. Biochem.* **2010**, *401*, 318–320, doi:10.1016/j.ab.2010.02.036.
48. Butler, T.A.J.; Paul, J.W.; Chan, E.-C.; Smith, R.; Tolosa, J.M. Misleading Westerns: Common Quantification Mistakes in Western Blot Densitometry and Proposed Corrective Measures. *Biomed Res. Int.* **2019**, *2019*, 1–15, doi:10.1155/2019/5214821.
49. Briones-Herrera, A.; Ramírez-Camacho, I.; Zazueta, C.; Tapia, E.; Pedraza-Chaverri, J. Altered proximal tubule fatty acid utilization, mitophagy, fission and supercomplexes arrangement in experimental Fanconi syndrome are ameliorated by sulforaphane-induced mitochondrial biogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, *153*, 54–70, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.010.
50. Marín Franco, J.L.; Genoula, M.; Corral, D.; Duette, G.; Ferreyra, M.; Maio, M.; Dolotowicz, M.B.; Aparicio-Trejo, O.E.; Patiño-Martínez, E.; Charton, A.; et al. Host-Derived Lipids from Tuberculous Pleurisy Impair Macrophage Microbicidal-Associated Metabolic Activity. *Cell Rep.* **2020**, *33*, 108547, doi:10.1016/j.celrep.2020.108547.
51. Reyes-Fermín, L.M.; Avila-Rojas, S.H.; Aparicio-Trejo, O.E.; Tapia, E.; Rivero, I.; Pedraza-Chaverri, J. The Protective Effect of Alpha-Mangostin against Cisplatin-Induced Cell Death in LLC-PK1 Cells is Associated to Mitochondrial Function Preservation. *Antioxidants* **2019**, *8*, 133, doi:10.3390/antiox8050133.
52. Blagotić, A.; Daróczi, G. Rapport: a report templating system 2012.
53. Mertins, P.; Mani, D.R.; Ruggles, K. V.; Gillette, M.A.; Clauser, K.R.; Wang, P.; Wang, X.; Qiao, J.W.; Cao, S.; Petralia, F.; et al. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature* **2016**, *534*, 55–62, doi:10.1038/nature18003.
54. Smith, A.C.; Robinson, A.J. MitoMiner v3.1, an update on the mitochondrial proteomics database. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D1258–D1261, doi:10.1093/nar/gkv1001.

55. Stekhoven, D.J.; Buhlmann, P. MissForest--non-parametric missing value imputation for mixed-type data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 112–118, doi:10.1093/bioinformatics/btr597.
56. Gómez-Caudillo, L.; Ortega-Lozano, A.; Martínez-Batallar, Á.; Rosas-Vargas, H.; Minauro-Sanmiguel, F.; Encarnación-Guevara, S. Principal component analysis on LC-MS/MS and 2DE-MALDI-TOF in glioblastoma cell lines reveals that mitochondria act as organelle sensors of the metabolic state in glioblastoma. *Oncol. Rep.* **2020**, *44*, 661–673, doi:10.3892/or.2020.7625.
57. Abdi, H.; Williams, L.J. Principal component analysis. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* **2010**, *2*, 433–459, doi:10.1002/wics.101.
58. Ashburner, M.; Ball, C.A.; Blake, J.A.; Botstein, D.; Butler, H.; Cherry, J.M.; Davis, A.P.; Dolinski, K.; Dwight, S.S.; Eppig, J.T.; et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 25–29, doi:10.1038/75556.
59. Mishra, P.; Chan, D.C. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J. Cell Biol.* **2016**, *212*, 379–387, doi:10.1083/jcb.201511036.
60. Zhao, J.; Zhang, J.; Yu, M.; Xie, Y.; Huang, Y.; Wolff, D.W.; Abel, P.W.; Tu, Y. Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* **2013**, *32*, 4814–4824, doi:10.1038/onc.2012.494.
61. Dai, X.; Cheng, H.; Bai, Z.; Li, J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J. Cancer* **2017**, *8*, 3131–3141, doi:10.7150/jca.18457.
62. Humphries, B.A.; Cutter, A.C.; Buschhaus, J.M.; Chen, Y.-C.; Qyli, T.; Palagama, D.S.W.; Eckley, S.; Robison, T.H.; Bevoor, A.; Chiang, B.; et al. Enhanced mitochondrial fission suppresses signaling and metastasis in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2020**, *22*, 60, doi:10.1186/s13058-020-01301-x.
63. Popov, L. Mitochondrial biogenesis: An update. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 4892–4899, doi:10.1111/jcmm.15194.
64. Chourasia, A.H.; Boland, M.L.; Macleod, K.F. Mitophagy and cancer. *Cancer Metab.* **2015**, *3*, 4, doi:10.1186/s40170-015-0130-8.
65. Yoo, S.-M.; Jung, Y.-K. A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics. *Mol. Cells* **2018**, *41*, 18–26, doi:10.14348/molcells.2018.2277.
66. Archer, S.L. Mitochondrial Dynamics — Mitochondrial Fission and Fusion in Human Diseases. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 2236–2251, doi:10.1056/NEJMra1215233.

67. Ly, J.D.; Grubb, D.R.; Lawen, A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* **2003**, *8*, 115–28, doi:10.1023/a:1022945107762.
68. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
69. Gorelick, A.N.; Kim, M.; Chatila, W.K.; La, K.; Hakimi, A.A.; Berger, M.F.; Taylor, B.S.; Gammage, P.A.; Reznik, E. Respiratory complex and tissue lineage drive recurrent mutations in tumour mtDNA. *Nat. Metab.* **2021**, *3*, 558–570, doi:10.1038/s42255-021-00378-8.
70. Haq, R.; Shoag, J.; Andreu-Perez, P.; Yokoyama, S.; Edelman, H.; Rowe, G.C.; Frederick, D.T.; Hurley, A.D.; Nellore, A.; Kung, A.L.; et al. Oncogenic BRAF Regulates Oxidative Metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell* **2013**, *23*, 302–315, doi:10.1016/j.ccr.2013.02.003.
71. Yu, L.; Lu, M.; Jia, D.; Ma, J.; Ben-Jacob, E.; Levine, H.; Kaiparettu, B.A.; Onuchic, J.N. Modeling the Genetic Regulation of Cancer Metabolism: Interplay between Glycolysis and Oxidative Phosphorylation. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 1564–1574, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2074.
72. de Sá Junior, P.L.; Câmara, D.A.D.; Porcacchia, A.S.; Fonseca, P.M.M.; Jorge, S.D.; Araldi, R.P.; Ferreira, A.K. The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1–12, doi:10.1155/2017/2467940.
73. Sarmiento-Salinas, F.L.; Delgado-Magallón, A.; Montes-Alvarado, J.B.; Ramírez-Ramírez, D.; Flores-Alonso, J.C.; Cortés-Hernández, P.; Reyes-Leyva, J.; Herrera-Camacho, I.; Anaya-Ruiz, M.; Pelayo, R.; et al. Breast Cancer Subtypes Present a Differential Production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Susceptibility to Antioxidant Treatment. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, doi:10.3389/fonc.2019.00480.
74. Chan, L.S.A.; Gu, L.C.; Leitch, H.A.; Wells, R.A. Intracellular ROS profile in hematopoietic progenitors of MDS patients: association with blast count and iron overload. *Hematology* **2021**, *26*, 88–95, doi:10.1080/16078454.2020.1870373.
75. Nishikawa, M. Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer Lett.* **2008**, *266*, 53–59, doi:10.1016/j.canlet.2008.02.031.
76. Mori, K.; Uchida, T.; Yoshie, T.; Mizote, Y.; Ishikawa, F.; Katsuyama, M.; Shibamura, M. A mitochondrial ROS pathway controls matrix metalloproteinase 9 levels and invasive properties in RAS-activated cancer cells. *FEBS J.* **2019**, *286*, 459–478, doi:10.1111/febs.14671.

77. Sica, V.; Bravo-San Pedro, J.M.; Stoll, G.; Kroemer, G. Oxidative phosphorylation as a potential therapeutic target for cancer therapy. *Int. J. Cancer* **2020**, *146*, 10–17, doi:10.1002/ijc.32616.
78. Lord, S.R.; Cheng, W.-C.; Liu, D.; Gaude, E.; Haider, S.; Metcalf, T.; Patel, N.; Teoh, E.J.; Gleeson, F.; Bradley, K.; et al. Integrated Pharmacodynamic Analysis Identifies Two Metabolic Adaptation Pathways to Metformin in Breast Cancer. *Cell Metab.* **2018**, *28*, 679-688.e4, doi:10.1016/j.cmet.2018.08.021.
79. Badrinath, N.; Yoo, S.Y. Mitochondria in cancer: in the aspects of tumorigenesis and targeted therapy. *Carcinogenesis* **2018**, *39*, 1419–1430, doi:10.1093/carcin/bgy148.
80. Lou, Y.; Li, R.; Liu, J.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Jin, B.; Liu, Y.; Wang, Z.; Zhong, H.; Wen, S.; et al. Mitofusin-2 over-expresses and leads to dysregulation of cell cycle and cell invasion in lung adenocarcinoma. *Med. Oncol.* **2015**, *32*, 132, doi:10.1007/s12032-015-0515-0.
81. Palikaras, K.; Tavernarakis, N. Mitochondrial homeostasis: The interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp. Gerontol.* **2014**, *56*, 182–188, doi:10.1016/j.exger.2014.01.021.
82. Praharaaj, P.P.; Panigrahi, D.P.; Bhol, C.S.; Patra, S.; Mishra, S.R.; Mahapatra, K.K.; Behera, B.P.; Singh, A.; Patil, S.; Bhutia, S.K. Mitochondrial rewiring through mitophagy and mitochondrial biogenesis in cancer stem cells: A potential target for anti-CSC cancer therapy. *Cancer Lett.* **2021**, *498*, 217–228, doi:10.1016/j.canlet.2020.10.036.
83. De Luca, A.; Fiorillo, M.; Peiris-Pagès, M.; Ozsvari, B.; Smith, D.L.; Sanchez-Alvarez, R.; Martinez-Outschoorn, U.E.; Cappello, A.R.; Pezzi, V.; Lisanti, M.P.; et al. Mitochondrial biogenesis is required for the anchorage-independent survival and propagation of stem-like cancer cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 14777–14795, doi:10.18632/oncotarget.4401.
84. Namgoong, G.M.; Khanal, P.; Cho, H.-G.; Lim, S.-C.; Oh, Y.K.; Kang, B.S.; Shim, J.-H.; Yoo, J.-C.; Choi, H.S. The Prolyl Isomerase Pin1 Induces LC-3 Expression and Mediates Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 23829–23841, doi:10.1074/jbc.M109.092874.
85. Mustafa, M.F.; Saliluddin, S.M.; Fakurazi, S.; Tizen Laim, N.M.S.; Md Pauzi, S.H.; Nik Yahya, N.H.; S. Raja Gopal, N.; Abdullah, M.A.; Maniam, S. Expression of Autophagy and Mitophagy Markers in Breast Cancer Tissues. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, doi:10.3389/fonc.2021.612009.
86. Yamashita, K.; Miyata, H.; Makino, T.; Masuike, Y.; Furukawa, H.; Tanaka, K.; Miyazaki, Y.; Takahashi, T.; Kurokawa, Y.; Yamasaki, M.; et al. High


Expression of the Mitophagy-Related Protein Pink1 is Associated with a Poor Response to Chemotherapy and a Poor Prognosis for Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **2017**, *24*, 4025–4032, doi:10.1245/s10434-017-6096-8.

87. Quidville, V.; Alsafadi, S.; Goubar, A.; Commo, F.; Scott, V.; Pioche-Durieu, C.; Girault, I.; Baconnais, S.; Le Cam, E.; Lazar, V.; et al. Targeting the Deregulated Spliceosome Core Machinery in Cancer Cells Triggers mTOR Blockade and Autophagy. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 2247–2258, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2501.
88. Bateman, A.; Martin, M.-J.; Orchard, S.; Magrane, M.; Agivetova, R.; Ahmad, S.; Alpi, E.; Bowler-Barnett, E.H.; Britto, R.; Bursteinas, B.; et al. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D480–D489, doi:10.1093/nar/gkaa1100.
89. Schulten, H.-J.; Bangash, M.; Karim, S.; Dallol, A.; Hussein, D.; Merdad, A.; Al-Thoubaity, F.K.; Al-Maghrabi, J.; Jamal, A.; Al-Ghamdi, F.; et al. Comprehensive molecular biomarker identification in breast cancer brain metastases. *J. Transl. Med.* **2017**, *15*, 269, doi:10.1186/s12967-017-1370-x.
90. Weiner-Gorzal, K.; Murphy, M. Mitochondrial dynamics, a new therapeutic target for Triple Negative Breast Cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **2021**, *1875*, 188518, doi:10.1016/j.bbcan.2021.188518.
91. Chen, Y.; Liu, L.; Xia, L.; Wu, N.; Wang, Y.; Li, H.; Chen, X.; Zhang, X.; Liu, Z.; Zhu, M.; et al. TRPM7 silencing modulates glucose metabolic reprogramming to inhibit the growth of ovarian cancer by enhancing AMPK activation to promote HIF-1 α degradation. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2022**, *41*, 44, doi:10.1186/s13046-022-02252-1.
92. Ye, F.; Jia, D.; Lu, M.; Levine, H.; Deem, M.W. Modularity of the metabolic gene network as a prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **2018**, *9*, 15015–15026, doi:10.18632/oncotarget.24551.
93. Dankó, T.; Petővári, G.; Sztankovics, D.; Moldvai, D.; Raffay, R.; Lőrincz, P.; Visnovitz, T.; Zsiros, V.; Barna, G.; Márk, Á.; et al. Rapamycin Plus Doxycycline Combination Affects Growth Arrest and Selective Autophagy-Dependent Cell Death in Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8019, doi:10.3390/ijms22158019.
94. Lunetti, P.; Di Giacomo, M.; Vergara, D.; De Domenico, S.; Maffia, M.; Zara, V.; Capobianco, L.; Ferramosca, A. Metabolic reprogramming in breast cancer results in distinct mitochondrial bioenergetics between luminal and basal subtypes. *FEBS J.* **2019**, *286*, 688–709, doi:10.1111/febs.14756.

95. Whitaker-Menezes, D.; Martinez-Outschoorn, U.E.; Flomenberg, N.; Birbe, R.; Witkiewicz, A.K.; Howell, A.; Pavlides, S.; Tsirigos, A.; Ertel, A.; Pestell, R.G.; et al. Hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism in epithelial cancer cells in situ. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 4047–4064, doi:10.4161/cc.10.23.18151.
96. Raninga, P. V.; Lee, A.; Sinha, D.; Dong, L.; Datta, K.K.; Lu, X.; Kalita-de Croft, P.; Dutt, M.; Hill, M.; Pouliot, N.; et al. Marizomib suppresses triple-negative breast cancer via proteasome and oxidative phosphorylation inhibition. *Theranostics* **2020**, *10*, 5259–5275, doi:10.7150/thno.42705.
97. Thompson, A.M. Molecular Pathways: Preclinical Models and Clinical Trials with Metformin in Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 2508–2515, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0354.
98. Hecht, F.; Pessoa, C.F.; Gentile, L.B.; Rosenthal, D.; Carvalho, D.P.; Fortunato, R.S. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 4281–4291, doi:10.1007/s13277-016-4873-9.
99. Moldogazieva, N.T.; Mokhosoev, I.M.; Terentiev, A.A. Metabolic Heterogeneity of Cancer Cells: An Interplay between HIF-1, GLUTs, and AMPK. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, 862, doi:10.3390/cancers12040862.
100. Gwak, E.; Kim, D.; Hwang, H.; Kwon, H.J. Mitochondrial ROS produced in human colon carcinoma HCT116 cells reduces cell survival via autophagy. **2022**, 1–22, doi:10.20944/preprints202201.0324.v1.
101. Lacroix, M.; Leclercq, G.; Vi, M.- Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours : an update Uncorrected proof! Pdf output. *Breast Cancer Res. Treat.* **2003**, *5254521*, 1–41.
102. Vieira, A.F.; Schmitt, F. An Update on Breast Cancer Multigene Prognostic Tests—Emergent Clinical Biomarkers. *Front. Med.* **2018**, *5*, doi:10.3389/fmed.2018.00248.

Article

Characterization of Mitochondrial Proteome and Function in Luminal A and Basal-like Breast Cancer Subtypes Reveals Alteration in Mitochondrial Dynamics and Bioenergetics Relevant to Their Diagnosis

Ariadna Jazmín Ortega-Lozano ¹, Leopoldo Gómez-Caudillo ¹, Alfredo Briones-Herrera ¹, Omar Emiliano Aparicio-Trejo ²  and José Pedraza-Chaverri ^{1,*} 

¹ Department of Biology, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City 04510, Mexico; arijol-sk@hotmail.com (A.J.O.-L.); pologoca@gmail.com (L.G.-C.); bhalfredo@gmail.com (A.B.-H.)

² Department of Cardio-Renal Physiopathology, National Institute of Cardiology “Ignacio Chávez”, Mexico City 14080, Mexico; emilianoaparicio91@gmail.com

* Correspondence: pedraza@unam.mx; Tel./Fax: +52-55-5622-3878



Citation: Ortega-Lozano, A.J.; Gómez-Caudillo, L.; Briones-Herrera, A.; Aparicio-Trejo, O.E.; Pedraza-Chaverri, J. Characterization of Mitochondrial Proteome and Function in Luminal A and Basal-like Breast Cancer Subtypes Reveals Alteration in Mitochondrial Dynamics and Bioenergetics Relevant to Their Diagnosis. *Biomolecules* **2022**, *12*, 379. <https://doi.org/10.3390/biom12030379>

Academic Editors: Varda Shoshan-Barmatz and Nathalie M. Mazure

Received: 5 January 2022

Accepted: 24 February 2022

Published: 28 February 2022

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Breast cancer (BC) is the most prevalent cancer and the one with the highest mortality among women worldwide. Although the molecular classification of BC has been a helpful tool for diagnosing and predicting the treatment of BC, developments are still being made to improve the diagnosis and find new therapeutic targets. Mitochondrial dysfunction is a crucial feature of cancer, which can be associated with cancer aggressiveness. Although the importance of mitochondrial dynamics in cancer is well recognized, its involvement in the mitochondrial function and bioenergetics context in BC molecular subtypes has been scantily explored. In this study, we combined mitochondrial function and bioenergetics experiments in MCF7 and MDA-MB-231 cell lines with statistical and bioinformatics analyses of the mitochondrial proteome of luminal A and basal-like tumors. We demonstrate that basal-like tumors exhibit a vicious cycle between mitochondrial fusion and fission; impaired but not completely inactive mitochondrial function; and the Warburg effect, associated with decreased oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes I and III. Together with the results obtained in the cell lines and the mitochondrial proteome analysis, two mitochondrial signatures were proposed: one signature reflecting alterations in mitochondrial functions and a second signature exclusively of OXPHOS, which allow us to distinguish between luminal A and basal-like tumors.

Keywords: luminal A breast cancer; basal-like breast cancer; MCF7 cell line; MDA-MB-231 cell line; mitochondria dynamics; mitochondrial biogenesis; reactive oxygen species (ROS); mitochondrial proteome

1. Introduction

Breast cancer (BC) is the neoplasia with the highest incidence and mortality among women worldwide. According to World Health Organization (WHO) data, 2.3 million women were diagnosed with BC and 685,000 deaths in the world in 2020, making it a global health problem [1]. BC is a disease characterized by a highly biological heterogeneity, which is noted by specific pathologic features, clinical behavior differences and different molecular alterations [2]. Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and expression of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) are classical immunohistochemistry markers that classify BC into four main molecular subtypes: luminal A, luminal B, HER2-enriched, and basal-like [3,4]. This molecular classification provides an accurate diagnosis of BC; in addition, it is also valuable for the prediction of tumor behavioral to chemotherapy. The luminal A subtype is the most common, comprising over 70% of all cases [5], and is ER and/or PR positive, HER2 negative, and proliferator marker Ki-67 <14%. Luminal A

tumors are low-grade, they grow slowly, and they have the best prognosis, unlike the basal-like subtype, which comprises about 20% of all cases; this tumor type is biologically more aggressive and has the worst prognosis among all BC subtypes [4,6]. Basal-like tumors are also known as triple-negative, as they lack ER, PR, and HER2 expression; consequently, these tumors do not benefit from hormonal therapy or medicines that target HER2 protein receptors. Therefore, it is necessary to find a targeted therapy for basal-like patients [7].

Based on the above, we focus on the luminal A and basal-like subtypes in our present work. This is because the luminal A subtype, as mentioned, is the molecular subtype of BC with the highest incidence and the best prognosis compared to the three remaining subtypes. Although the basal-like subtype is the subtype with the lowest incidence, it is characterized by being the one with the worst prognosis and therapeutically abandoned since currently there are no biomarkers towards which to direct a specific treatment. In addition, these molecular subtypes of BC were chosen to find differences between them, and which could contribute to enriching the molecular classification of this disease.

Mitochondrial dysfunction is a crucial feature of cancer and is associated with aggressiveness [3]. The altered metabolism in cancer cells is a consequence of changes or defects in the mitochondrial bioenergetics [4]. In addition, there is evidence that cancer cells have altered their mitochondrial dynamics (the balance between mitochondrial fusion and fission), which is directly related to the change in mitochondrial biogenesis and turnover, giving proliferative and survival advantages for tumor cells [5,6].

Cancer cells are under metabolic changes; this metabolic alteration of mitochondria has a crucial role in tumorigenesis [3]. Currently, the mitochondrial alterations, regarding the dynamics and function, are still unknown among BC subtypes and their relationship with bioenergetics mitochondrial metabolism.

Despite studies reflecting the importance of mitochondrial dynamics in cancer and its relationship to bioenergetics and alterations in mitochondrial function, these alterations have been little studied in the molecular subtypes of BC [8,9].

This work aimed to find the differences in mitochondrial bioenergetics and function associated mainly with changes in mitochondrial dynamics between luminal A and basal-like subtypes. Comparing functional mitochondrial studies and evaluating mitochondrial dynamics in MCF7 and MDA-MB-231 cell lines of BC, representative of luminal A and basal-like subtypes, respectively [7], revealed that the MDA-MB-231 cell line was characterized by more remarkable mitochondrial alteration associated with changes in energy metabolism. Additionally, to further deepen the findings found in breast cancer cell lines, a mitochondrial proteome analysis was performed by statistical analysis of the proteome of BC biopsies classified as luminal A and basal-like from the experiments of Mertins et al. [10]. A mitochondrial proteomic signature showing differences in the expression of mitochondrial proteins involved in mitochondrial bioenergetics and mitochondrial dynamics processes was proposed for luminal A and basal-like subtypes of BC.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture

The MCF7 cell line was provided by Dr. Alejandro García-Carrancá and MCF10A MDA-MB-231 cell lines were provided by Dr. Alejandro Zentella-Dehesa. The MCF7 and MDA-MB-231 BC cell lines were cultured in RPMI-1640 media supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic-antimycotic. MCF10A breast epithelial cell was cultured in DMEM/F12 media supplemented with 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic, 0.5 µg/mL hydrocortisone, 10 ng/mL endothelial growth factor (EGF), 5 µg/mL insulin. Cells were cultured at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere. The culture medium was renewed every third day until the cell cultures reached a confluence of 80–90%.

2.2. Western Blot

MCF7, MDA-MB-231 and MCF10A cells were washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (40 mM

Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 1 mM Na₄P₂O₇, 0.5% sodium deoxycholate, 0.2% SDS, pH 7.4 and 1× protease inhibitors cocktail) for 30 min at 4 °C with stirring. Lysates were centrifugated at 15,000× *g* for 10 min at 4 °C, and the supernatant was collected and stored at −70 °C until the experiment was carried out. Protein concentrations were quantified by Bradford assay. Equal amounts of protein (30 μg) were denatured by dilution on 6X Laemmli buffer (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue) and immersion on boiling water for 5 min, except those employed to determine the subunit levels of mitochondrial complexes (CI-NDUFB8 and CIV-MTCO1). The samples were separated on 12% sodium dodecyl sulfate (SDS)–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE). Proteins were transferred onto Immobilon PVDF membranes for fluorescent application on wet transfer. Membranes were blocked for 1 h in at room temperature (RT) in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20 (TBST) containing 5% nonfat dry milk and incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary antibodies (Table S1). Then, the membranes were incubated for 2 h at RT in darkness with the corresponding IRDye[®] fluorescent secondary antibodies (1:10,000). Proteins bands were detected in an Odyssey Sa Infrared System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Signals were then processed employing the software Image Studio[™] 5.2 (LI-COR Biosciences). We used the blots stained with Ponceau red S as loading control due to the bioenergetics differences and structural changes in the cytoskeleton of the cell lines used in our study [11]. For this purpose, after the transfer, the membrane was incubated in 1% Ponceau S solution for 2 min. Immediately, this membrane was rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) to remove staining saturation [12]. The membrane was then inserted between transparent sheets and scanned at 300 dpi as a JPG document using a standard scanner (HP Scanjet G4050). Densitometry data for total protein staining images with Ponceau S were obtained from all visible proteins in each complete lane. All data normalization processes were performed by dividing the target protein value by the value of the chosen loading control [13]. Densitometric analysis was performed using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>, accessed on 10 August 2021) on expression of fusion and fission markers: optic atrophy 1 (Opa1) (*n* = 9), mitofusin 1 (Mfn1) (*n* = 6), mitofusin 2 (Mfn2) (*n* = 6), and dynamin-1-like protein (Drp1) (*n* = 9); mitochondrial biogenesis markers: proliferator-activated receptor γ co-activator-1alpha (PGC-1α) (*n* = 6), and nuclear respiratory 2 (NRF2) (*n* = 3); mitophagy markers: PTEN-induced kinase 1 (PINK1) (*n* = 6), ubiquitin binding protein p62 (p62) (*n* = 3), Parkin RBR E3 ubiquitin-protein ligase (Parkin) (*n* = 3), and microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B (LC3-II) (*n* = 3); oxidative metabolism marker: adenine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) (*n* = 12); glycolytic metabolism marker: hypoxia-inducible factor 1α (HIF1α) (*n* = 12); and total oxidative phosphorylation rodent Western blot (WB) antibody cocktail (OXPHOS) (*n* = 3).

2.3. Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$) Assay

To measure $\Delta\Psi_m$ by JC-1, 10,000 cells were cultured in a 96-well plate, and after 24 h, cells were incubated with dye JC-1 (1 μg/mL) on non-supplemented medium at 37 °C for 30 min. The cells were washed twice with PBS and then replaced with fresh medium to remove the excess probe. Depolarized-related (green) fluorescence was measured at 525 nm, and the polarized-related (red) signal was read at 590 nm; both emissions were obtained at 488 nm excitation. Data and representative images were obtained a Cytation 5 Cell Imaging Reader (Biotek Instruments, Inc., Winoosky, VT, USA), with GFP and RFP filters. The JC-1 fluorescence was quantified as the red fluorescence/green fluorescence ratio in MCF10A (*n* = 7), MCF7 (*n* = 12), and MDA-MB-231 (*n* = 11) cell lines. The data were obtained from three biological replicates.

2.4. Estimation of Mitochondrial Mass

The protocol used to estimate of mitochondrial mass was based on the previous methodology from [14] with some modifications. Around 10,000 cells were seeded on 96-

well black plates with the transparent bottom at the previously described culture conditions. After 24 h, the nuclei and mitochondria were stained with 1 µg/mL Hoechst and 500 nM MitoTracker Green[®], on non-supplemented medium at 37 °C for 30 min. To remove the excess probe, cells were washed three times with PBS; fresh supplemented medium was placed on cultures. Hoechst fluorescence was measured at 360 nm excitation and 460 nm emission, while MitoTracker green fluorescence was measured at 480 nm excitation and 521 nm emission. Representative images were taken by using a Cytation 5 with the GFP and the DAPI filters while using Gen5[™] 3.0 software (Biotek) for data acquisition and analysis. Mitochondrial mass levels was quantified as MitoTracker green fluorescence intensity/cell ratio in MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 cells. The number of cells was measured with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/index.htm>, accessed on 10 August 2021). The data were obtained from three biological replicates.

2.5. Determination of Mitochondrial ROS Production

Mitochondrial ROS production was measured using the fluorescent probe, MitoSOX[™] Red was based on the methodology previously from [15] with some modification. Around 10,000 cells were seeded on 96 well-black plates with a transparent bottom at the previously described culture conditions. After 24 h, the cells were incubated with 1 µg/mL Hoechst and 5 µM MitoSOX on non-supplemented medium at 37 °C for 30 min. To remove the excess probe, cells were washed three times with PBS; fresh supplemented medium was placed on cultures. Hoechst fluorescence was measured at 360 nm excitation and 460 nm emission, while MitoSOX red was measured at 510 nm excitation and 580 nm emission. ROS production was quantified as the MitoSOX red/cell ratio in MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 cells. Representative images were taken by using a Cytation 5 while using Gen5[™] 3.0 software for data acquisition and analysis. The number of cells was measured with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/index.htm>, accessed on 10 August 2021). The data were obtained from three biological replicates.

2.6. Cell Respirometry

The oxygen consumption experiments in cells were evaluated with a high-resolution respirometry equipment O2K (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) according to the previous protocol from [16] with some modification. Cells were washed with PBS, harvested with trypsin, and quantified by trypan blue assay. Determinations were made with approximately 1 million cells in 2 mL of culture medium with 10% FBS at 37 °C. The respiratory parameters evaluated were: (1) Routine respiration, corresponding to oxygen consumption of the cells; (2) Leak of the respiration, corresponding to oxygen consumption in the presence of 5 µM oligomycin; (3) Respiratory control (RC), that corresponding to the routine/leak ratio; (4) Respiration attributable to oxidative phosphorylation (P), was calculated by the difference between Routine and Leak. All parameters were corrected by subtracting the non-mitochondrial respiration, obtained by the addition of 1 µM rotenone, 5 µM antimycin A, 100 µM sodium azide and normalized by the number of cells determined by trypan blue.

2.7. Statistical Analysis

The results obtained from the cell lines were analyzed with the R package Rapport [17] to eliminate outliers. The data were tested for normality and analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey's multiple comparisons test. Data were plotted to show three or more independent experiments, and every figure shows the mean with standard deviation. All data were analyzed using the software R (version 4.1.0, Foundation for Statistical Computing).

2.8. Analysis of the Mitochondrial Proteome in Breast Cancer Tumors

To complement and validate the changes found in mitochondrial dynamics and mitochondrial bioenergetics between cell lines of BC, global proteome abundance data from 43 tumors (18 classified as basal-like, 22 luminal A, and 3 non-cancerous as controls) stored in supplementary Table S3 reported by Mertins et al. [10] were selected to be reanalyzed. Briefly, in order to correlate the genome, transcriptome and proteome in luminal A, luminal B, HER2, and basal-like molecular subtypes of BC, Mertins et al. [10] analyzed using tandem mass spectrometry (MS) the total proteome of 102 cancerous tumors histopathological and molecularly classified by The Cancer Genome Atlas (TCGA), in the four main intrinsic subtypes and three controls. A detailed explanation of the experiment and spectrometry analysis of tumors can be seen in [10].

In the first part of our analysis, all the proteins identified and quantified by Mertins et al. [10] were cross-referenced with a list of mitochondrial or mitochondrial traffic proteins reported by MitoMiner [18]. Of these mitochondrial proteins, only those with abundance values in at least 50% of the samples were selected.

Next, an exploratory analysis of the abundance data was carried out with the Report of R package [17] to eliminate from the analysis, both the samples as proteins with extreme behavior.

After eliminating the extreme data, a hierarchical cluster analysis of the tumors by the Ward method based on the Euclidian distance matrix of the samples was carried out to find homogenous groups between subtypes. Fifteen tumor samples were eliminated because they were confounded in the same cancerous subtype of BC.

With 28 final samples (14 basal-like, 11 luminal A and 3 controls), missing values were imputed with the Random Forest method (missForest, R package) [19]. Next, a PCA was applied on the protein abundance correlation matrix [20] to obtain an abundance landscape of mitochondrial proteins for the subtypes and control group [21].

Finally, only proteins with an absolute value of association equal or greater than 0.5 with both first components [22] were selected for comparative overrepresentation analysis based on Gene Ontology [23]. Overrepresentation was performed online employing the Gene List Analysis tool on the PANTHER Classification System site. As inputs, we uploaded the official gene symbols as identifiers. We select those involved in the dynamics processes, mitochondrial biogenesis, mitophagy, mitochondrial ROS, mitochondrial membrane potential and mitochondrial metabolism to conform to the mitochondrial signature of luminal A and basal-like subtypes. A flow chart of the processing and analysis of these data can be seen in Figure S1.

3. Results

3.1. Reduction in Drp1-Related Mitochondrial Fission in the Basal-like Cell Line

Alteration in the mitochondrial dynamics in cancer cells are tightly associated with mitochondrial morphology, with alterations in mitochondrial mass, mitochondrial biogenesis, dysregulation of the bioenergetics and redox functions [24,25]. We first assessed the expression of the fusion markers mitofusins 1 and 2 (Mfn1 and Mfn2) and optic atrophy type 1 (Opa1), as well as expression of the fission marker dynamin-related protein 1 (Drp1) in cell lines MCF7 representative luminal A subtype of BC, MDA-MB-231 representative basal-like subtype of BC, and MCF10A as a non-tumorigenic (control) (Figure 1A) [7]. We found a significant increase in Opa1 in the MDA-MB-231 cell line compared to the MCF10A cell line; however, no significant differences were found between the BC cell lines, but a tendency to increase this protein can be observed in the cell line MDA-MB-231 compared to the MCF7 cell line (Figure 1B). In the Mfn1 protein, no expression changes were found between cell lines (Figure 1C). However, in the Mfn2 protein, a significant decrease was found in the MCF7 cell line compared to the MCF10A cell line and a significantly higher expression in the MDA-MB-231 cell line compared to MCF7 cell line (Figure 1D). In addition, we observed that Drp1 protein expression decreased in both cell lines of BC compared to the MCF10A cell line, although this decrease was only significant in the MDA-MB-231 cell

line (Figure 1E). To our surprise, it was found that the decrease in Drp1 protein expression was mainly marked in the MDA-MB-231 cell line that is representative of the basal-like subtype. In contrast, previous studies have reported that mitochondrial fission tends to increase in cancer cells and that this increase can be associated with the aggressiveness of this disease [26]. These data suggest changes in mitochondrial control and quality and important differences in mitochondrial biology among BC subtypes and that mitochondrial fission in basal-like BC may be mediated by other Drp1-independent proteins.

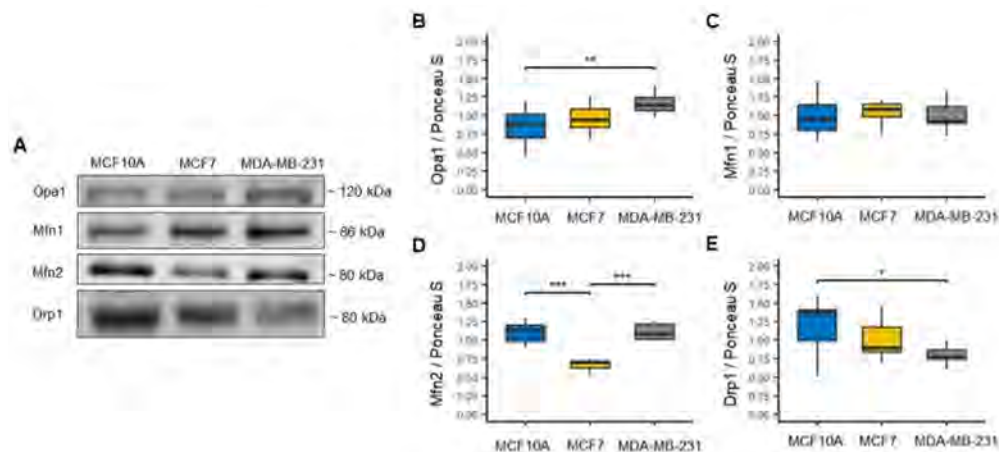


Figure 1. Mitochondrial dynamics in breast cancer cell lines. (A) Representative blots. (B–D) Expression of fusion markers, optic atrophy 1 (Opa1), $n = 9$; mitofusin 1 (Mfn1), $n = 6$; mitofusin 2 (Mfn2), $n = 6$. (E) Expression of fission marker, dynamin-1-like protein (Drp1), $n = 9$. Densitometry values were normalized by Ponceau S red staining. The data are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.2. Mitochondrial Biogenesis and Mitophagy in MCF7 and MDA-MB-231 Cells

Mitochondrial homeostasis is preserved by coordination between mitochondrial biogenesis and mitophagy [27]. To assess the effect of differences in mitochondrial dynamics on mitochondrial mass and biogenesis among BC cell lines, we measured mitochondrial mass using MitoTracker Green probe (Figure 2A). We found a significant increase in the fluorescence intensity of the MitoTracker Green in the MDA-MB-231 cell line compared to in the control and MCF7 cell lines, suggesting a higher mitochondrial mass content in the cell line representative of basal-like molecular subtype of BC. In contrast, the MitoTracker Green intensity values obtained in the MCF7 cell line suggest a lower mitochondrial mass content than the control and MDA-MB-231 cell lines (Figure 2B). To validate the mitochondrial mass results found in the cell lines of BC, we evaluated the expression of proliferator-activated receptor γ co-activator-1 α (PGC1 α) and nuclear respiratory 2 (NRF2) proteins involved in mitochondrial biogenesis (Figure 2C) [27]. We found a correlation with the data obtained by MitoTracker Green; we found a significant increase in the expression of the PGC1 α protein in the MDA-MB-231 cell line compared to the MCF10A and MCF7 cell lines (Figure 2D). Although we found no significant changes in NRF2 protein expression, we observed an increment trend in the expression of this protein in the MDA-MB-231 cell line (Figure 2E).

In addition, we evaluated mitophagy markers since it is a mitochondrial quality control process and a mechanism of mitochondrial mass regulation by which dysfunctional mitochondria are eliminated [28,29]. Thus, we evaluated the expression of mitophagy-related proteins PTEN-induced kinase 1 (PINK1) and Parkin, and autophagic proteins, ubiquitin-binding protein p62 (p62) and microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B (LC3-II) (Figure 3A). We found that PINK1 and p62 showed a significant increase in the MDA-MB-231 cell line compared to the MCF10A cell line (Figure 3B,C). Additionally, we found a significant increase in the expression of p62 in the MDA-MB-231 cell line compared to the MCF7 cell line (Figure 3C). However, we did not find significant changes in Parkin LC3-II proteins expression between the cell lines (Figure 3D,E). Although we found no

significance changes in LC3-II, we observed an increment trend in the expression of this protein in the MDA-MB-231 cell line (Figure 3E). Overall, the results of both mitochondrial biogenesis and mitophagy correlate with the previously obtained results with the mitochondrial dynamics markers. This is because increased mitochondrial fusion processes are related to increased mitochondrial mass as observed in the MDA-MB-231 line [30].

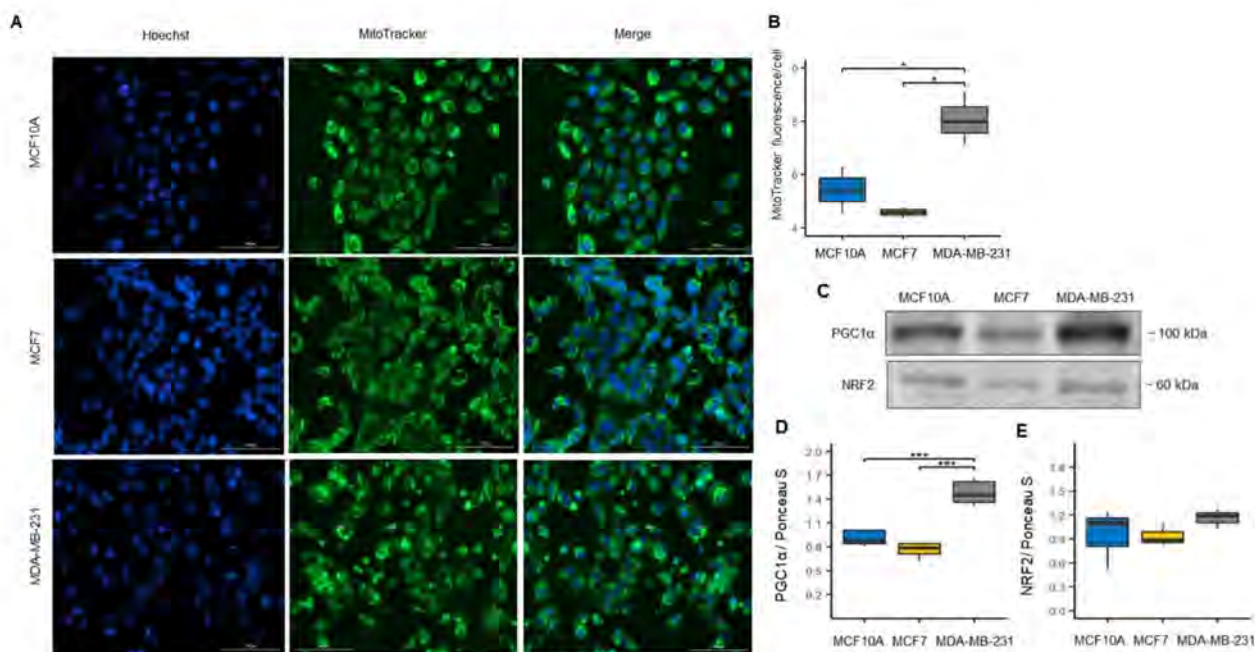


Figure 2. Increased mitochondrial mass in MDA-MB-231 cell line. (A) Confocal microscopy images of MitoTracker Green fluorescence to assess mitochondrial mass in MCF10A, MCF7 and MDA-MB-231 cells, and total nuclei were stained with Hoechst (blue). (B) Mitochondrial mass levels were quantified as MitoTracker green fluorescence intensity/cell ratio. Data were obtained from three biological replicates. The data are presented as mean \pm SD of cells ($n = 151$ – 251). * $p < 0.05$. (C) Representative blots. (D,E) Expression of mitochondrial biogenesis markers: peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1 α), $n = 6$ and nuclear respiratory factor 2 (NRF2), $n = 3$. Densitometry values were normalized by Ponceau S red staining. The data are presented as mean \pm SD. *** $p < 0.001$.

Additionally, these results suggest alterations in mitochondrial quality control and reveal differences in mitochondrial biology between luminal A and basal-like BC subtypes.

3.3. Mitochondrial Uncoupling in Luminal A and Basal-like Cell Lines of Breast Cancer

To assess this functional state and investigate the ATP-generating capacity of mitochondria, we evaluated the membrane potential as a driver for ATP generation (Figure 4A) [31]. As expected, the $\Delta\Psi_m$ decreased in both BC cell lines (Figure 4A,B); however, although no significant differences were found between the BC cell lines, it is observed that the $\Delta\Psi_m$ is little higher in the MCF7 cell line than MDA-MB-231 cell line, as indicated by a higher ratio of JC-1 red to green fluorescence (Figure 4B). These results correlate with the results found in mitophagy, suggesting that reduction in $\Delta\Psi_m$ favors mitochondrial mass reduction by mitophagy induction and that mitochondrial inner membrane is better maintained in the luminal A MCF7 cell line than in basal type MDA-MB-231 cell line.

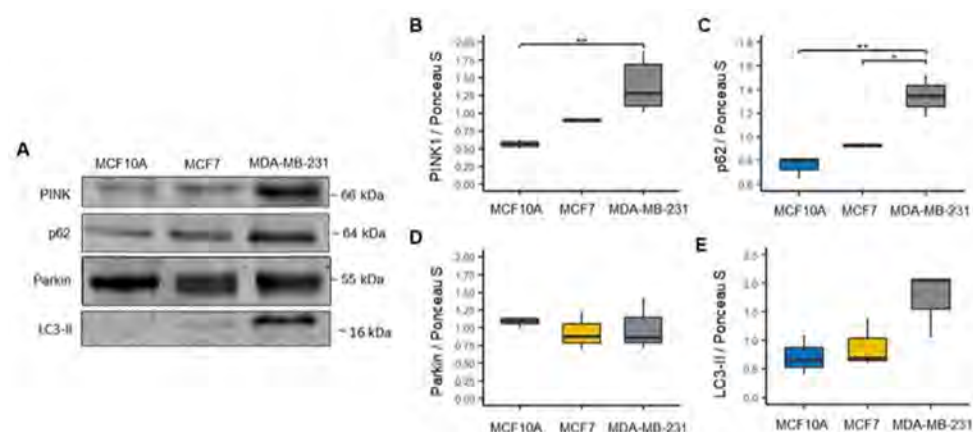


Figure 3. Increased mitophagy markers in the MDA-MB-231 cell line. (A) Representative blots. (B–E) Expression of mitophagy markers, PTEN-induced kinase 1 (PINK1), $n = 6$; ubiquitin-binding protein p62 (p62), $n = 3$; Parkin, $n = 3$; and microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B (LC3-II), $n = 3$. Densitometry values were normalized by Ponceau S red staining. The data are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

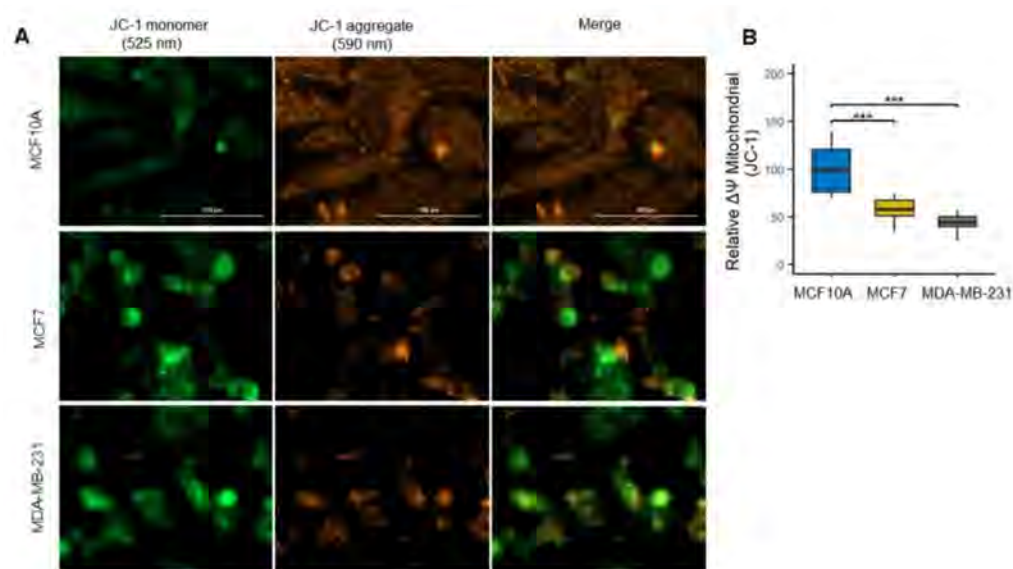


Figure 4. Decrease in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in the MDA-MB-231 cell line. (A) $\Delta\Psi_m$ levels were assessed by JC-1 probe; MCF10A cells with highly polarized mitochondria accumulate JC-1 dye in the mitochondrial matrix, forming bright red fluorescent J aggregates. Increased green fluorescence indicates decreased mitochondrial potential. (B) The JC-1 fluorescence was quantified as the red fluorescence/green fluorescence ratio in MCF10A ($n = 7$), MCF7 ($n = 12$), and MDA-MB-231 ($n = 11$) cell lines. Data were obtained from three biological replicates. The data were normalized with the values of MCF10A cells and are presented as mean \pm SD. *** $p < 0.001$.

3.4. Overexpression of HIF-1 α Associated with Metabolic Reprogramming in MCF7 and MDA-MB-231 Cell Lines

Although glycolysis is a dominant metabolism in cancer cells, there is evidence that mitochondrial OXPHOS is also used by cancer cells [32–34]. Moreover, since the BC cell lines studied here showed a different mitochondrial function, we analyzed the expression of adenine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) (Figure 5A) [35], to evaluate the relative contribution of oxidative and glycolytic metabolism, respectively, in both BC cell lines. We first observed a significant decrease in AMPK expression in both cell lines of BC compared to the MCF10A cell line, suggesting

that both MCF7 and MDA-MB-231 cell lines decreased oxidative metabolism (Figure 5B). In contrast, HIF1 α expression was found to be significantly increased in both cell lines of BC compared to the MCF10A cell line (Figure 5C), suggesting that both MCF7 and MDA-MB-231 lines had a preference for glycolytic metabolism. Then, through the AMPK/HIF1 α ratio, we found that it was less than one in the two cell lines of BC (Figure 5D), which reaffirms that both cell lines have a predominantly glycolytic metabolism compared to the cell line MCF10A.

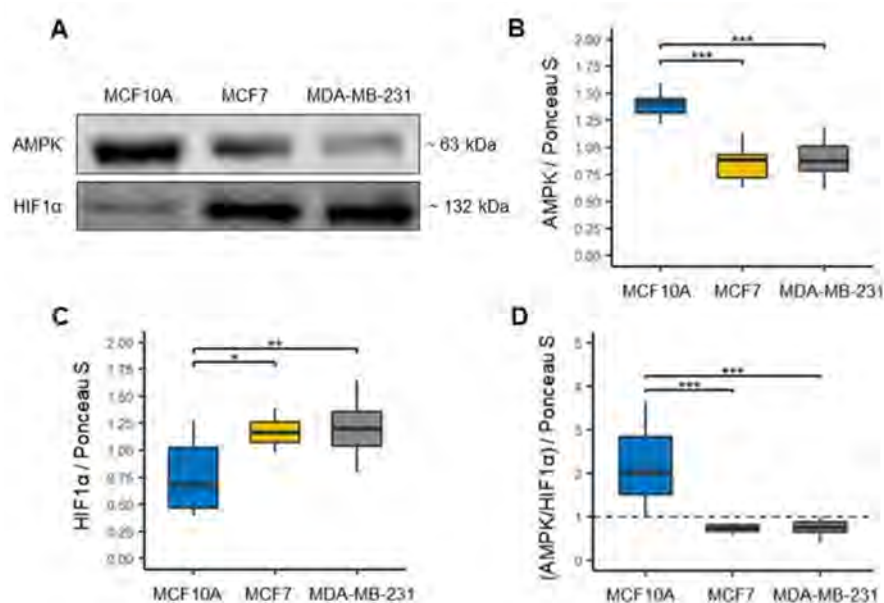


Figure 5. Metabolic reprogramming in breast cancer cell lines. (A) Representative blots. (B) Expression of oxidative metabolism marker, adenine mono-phosphate-activated protein kinase (AMPK), $n = 12$. (C) Expression of glycolytic metabolism marker, hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α), $n = 12$. (D) AMPK/HIF1 α ratio in MCF10A, MCF7 and MDA-MB-231 cell lines, a ratio less than one (black line) reflects a preferential glycolytic metabolism. Densitometry values were normalized by Ponceau S red staining. The data are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.5. Functional Status Mitochondrial in Luminal A and Basal-like Breast Cancer Cell Lines

To assess the compromised function of mitochondria and to confirm the finding of decreased OXPHOS in BC cell lines, we evaluated cellular oxygen consumption (Routine) (Figure 6A), respiration associated with oxidative phosphorylation (P) (Figure 6B), and mitochondrial respiratory efficiency (RC) (Figure 6C). We found a significant decrease in Routine and P parameters in BC cell lines, notably more marked for the MDA-MB-231 than for MCF7. These confirm the reduction in mitochondria bioenergetics, specifically in OXPHOS, in cell lines of BC, which agrees with mitochondrial mass reduction. Furthermore, these results also suggest a higher mitochondrial decoupling in the MDA-MB-231 cell line, as is shown by a low RC value.

3.6. Increased ROS Production in the Basal-like Cell Line

Increased ROS production is a feature associated with mitochondrial dysfunction [36,37]. Additionally, evidence associated increased ROS production with cancer cell malignancy [38,39]. MitoSOX red has been used to measure mitochondrial ROS production since it preferentially accumulates within the mitochondrial matrix [38–40]. To evaluate the differences in ROS generation, we used the MitoSOX red probe in cell lines of BC and control cell line (Figure 7A). We detected a significant increase in ROS in both cell lines of BC compared to the control cell line. Furthermore, we found that ROS production was higher in the MDA-MB-231 cell line than in the MCF7 cell line (Figure 7B); this strongly agreed with the mitochondrial uncoupling observed in this cell line. These results indicate a more remarkable mitochondrial alteration

in the basal-like cell line, which may be related to alterations in the mitochondrial electron transport chain.

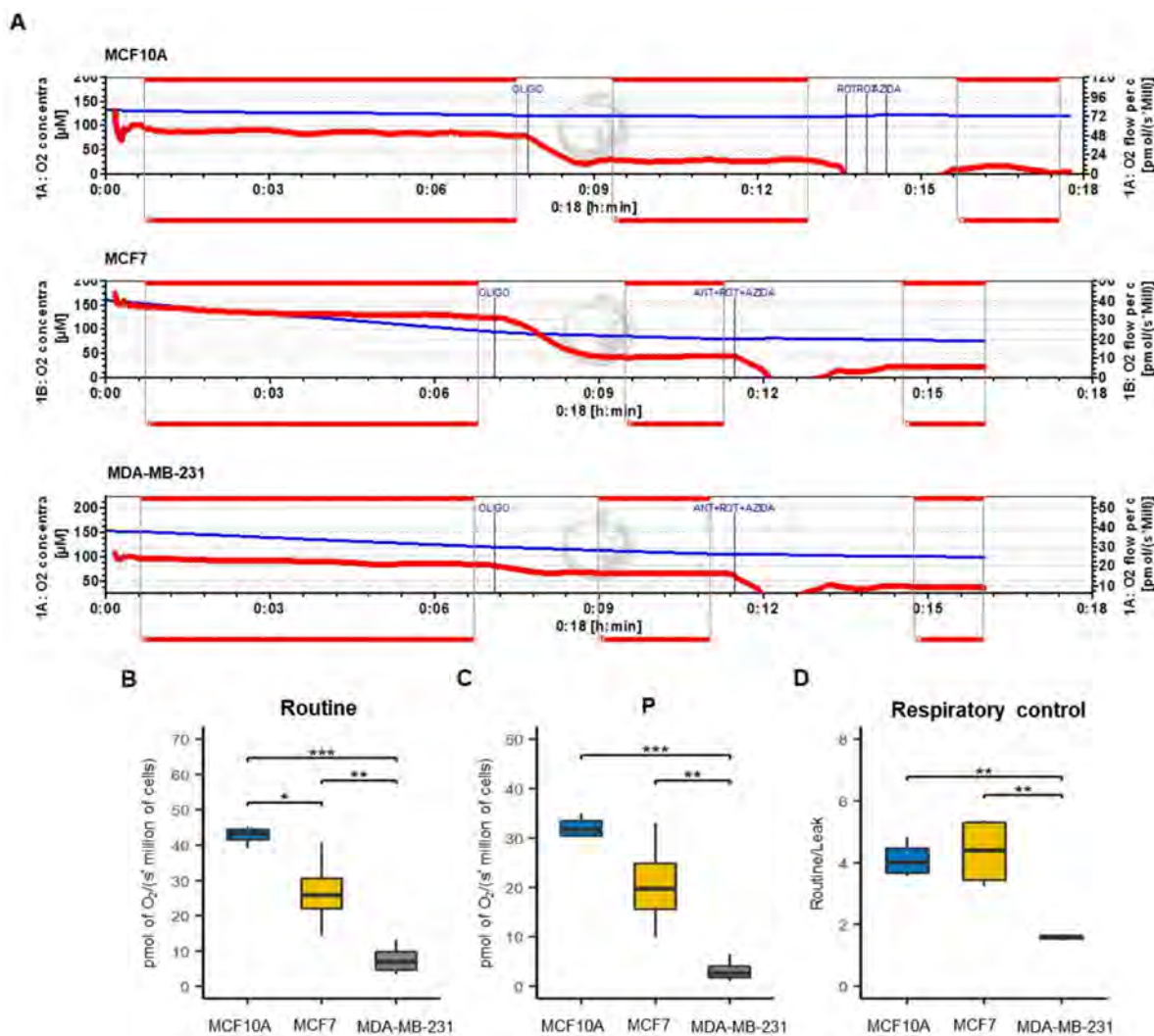


Figure 6. Mitochondrial respiratory efficiency of breast cancer cell lines. (A) Schematic representation of O₂ consumption rate by addition in order of OLIGO (oligomycin) and ANT + ROT + AZIDA (antimycin A plus rotenone plus sodium azide) inhibitors to determine the respiratory parameters in MCF10A, MCF7 and MDA-MB-231 cell lines. The blue line shows the oxygen concentration in the chamber while the red line indicates the oxygen consumption rate. (B) Cellular routine respiration (Routine), that correspond to oxygen consumption of the cells. (C) Respiration associated with oxidative phosphorylation (P); (D) respiratory control (RC) calculated as routine/leak ratio. All parameters were corrected by subtracting the non-mitochondrial respiration, obtained by the addition of ANT + ROT + AZIDA. The data are presented as mean \pm SD, $n = 3-4$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.7. Landscape of the Mitochondrial Proteome of Luminal A and Basal-like Subtypes of Breast Cancer

After cross-checking the 12,553 proteins identified by Mertins et al. [10] against the Mitominer database [18], we were left with 1152 mitochondrial or mitochondrial-transiting proteins (Table S2). Of these, 51 proteins were eliminated because they had no abundance values in at least 50% of the samples or showed atypical abundance values. Nineteen samples were also eliminated from the analysis, two showing atypical abundance patterns and 17 confounded in the hierarchical cluster analysis (Figure S2). Finally, the analysis was

carried out with 1103 proteins, 42 exclusively expressed in cancer (Table S3) and 1061 with abundance values in at least 50% of all samples (Table S4) and 28 samples.

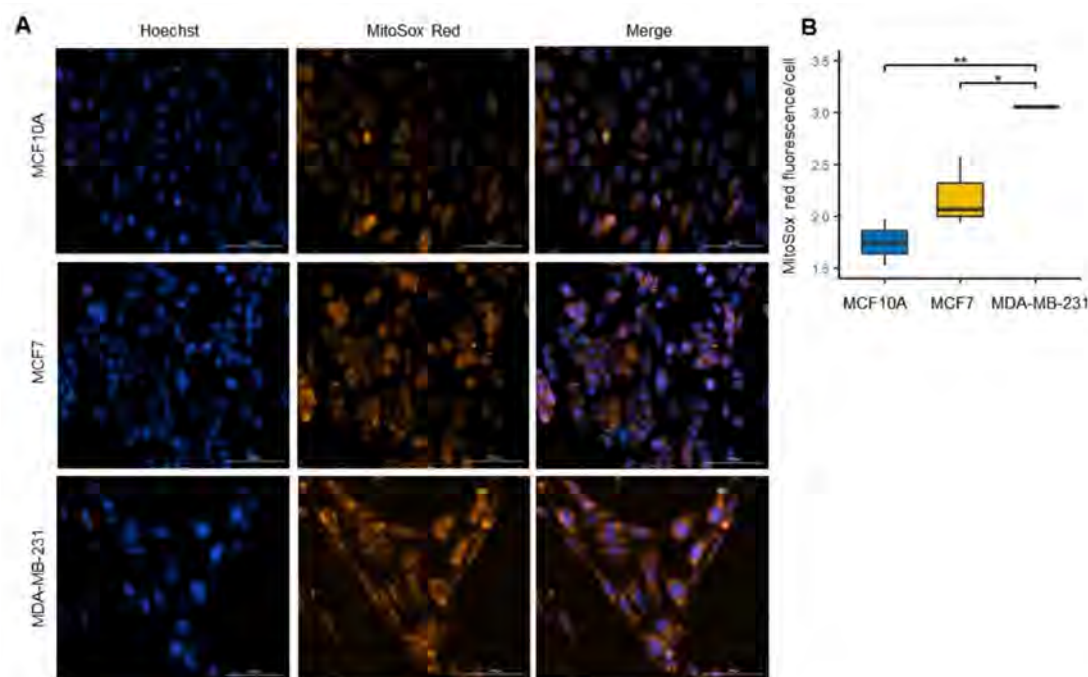


Figure 7. Increased levels of reactive oxygen species (ROS) in the MDA-MB-231 line. (A) Confocal microscopy images of mitochondrial ROS were stained by MitoSOX red (red) in MCF10A, MCF7 and MDA-MB-231 cell and total nuclei were stained with Hoechst (blue). (B) ROS production was quantified as MitoSOX red fluorescence intensity/cell ratio. Data were obtained from three biological replicates. The data are presented as mean \pm SD of cells ($n = 153$ – 200). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

The principal component analysis (PCA) showed that total protein abundance variation between samples is explained by 27 Principal Components (PCs); the first two PCs embrace 31% of whole abundance variability (Table S5) and can differentiate between luminal A and basal-like subtypes of BC and the control group (Figure 8A).

The heatmap shows that 477 proteins whose correlation with PC 1 or PC 2 is less than -0.5 or greater than 0.5 (Table S6) present a different abundance pattern between samples belonging to each of the subtypes and the control group (Figure 8B). Four patterns of expression can be distinguished in the heat map one in which a set of proteins are overregulated in luminal A and control samples and downregulated in basal-like, a second pattern in which proteins are downregulated in controls and moderately expressed in BC molecular subtypes, in the third pattern a set of proteins are downregulated in luminal A tumors and control and overexpressed in basal tumors and in the fourth pattern a set of proteins are observed with heterogeneous expression among molecular subtypes and control samples.

Additionally, a hierarchical clustering analysis applied to the abundance data in the heatmap revealed the formation of three groups. The first cluster (yellow lines) was enriched by the luminal A tumors, the control samples enriched the second cluster (blue lines), and the third cluster (gray line) was enriched by basal-like tumors, which reflected the differences in mitochondrial proteome abundance patterns between these BC subtypes (Figure 8B).

3.8. Signature Mitochondrial Alterations in Luminal Type A and Basal-like Breast Cancer

To validate and deepen the results found in cell lines on the mitochondrial processes of fusion (FUS), fission (FIS), mitophagy (MIT), ROS, $\Delta\Psi_m$ (PMM) and mitochondrial membrane organization (MMO) processes, an overrepresentation analysis of these processes

were performed using the proteins that presented an absolute value of association with the first two components equal to greater than 0.5, to distinguish between molecular subtypes. When the analysis of the overrepresentation of biological processes with mitochondrial proteins was performed, the process of mitochondrial biogenesis was not localized, possibly because mitochondrial biogenesis is a process that requires the intervention of the cell nucleus. To provide information on mitochondrial biogenesis, we chose the MMO process. Of the 519 mitochondrial proteins used for overrepresentation analysis (Table S7), 15,717 biological processes were found to be overrepresented (Table S8), and a total of 54 proteins were found to be involved in the biological processes analyzed in this study.

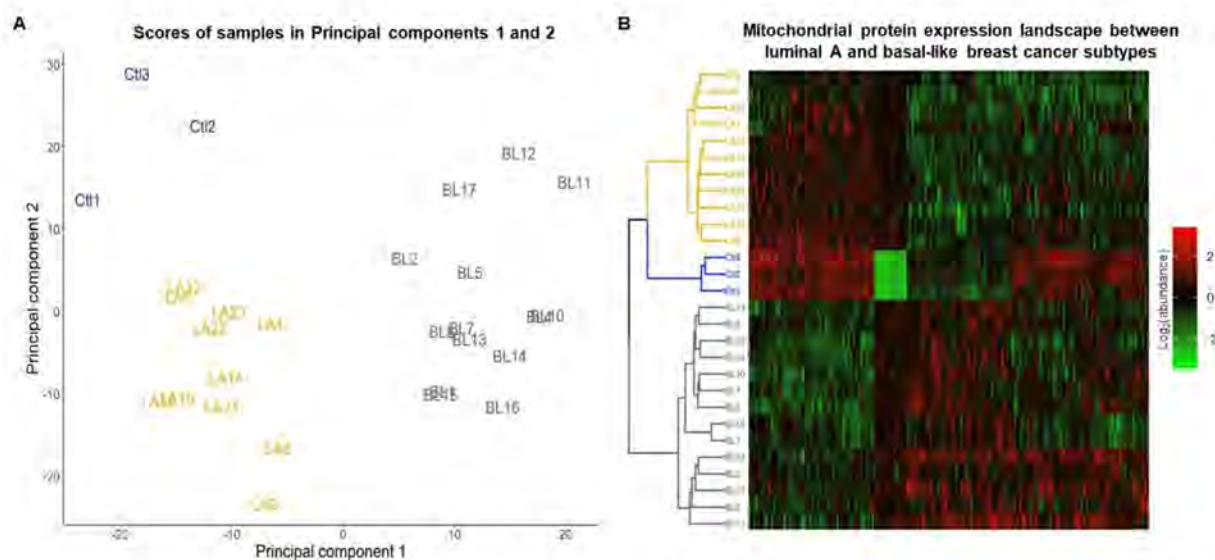


Figure 8. Analysis of the mitochondrial proteome of luminal A and basal-like tumors. (A) Principal component analysis of the mitochondrial proteome in samples control (Ctl), luminal A (LA), and basal-like (BL) breast cancer tumors. (B) Heatmap and hierarchical cluster analysis of mitochondrial proteins abundance identify in samples control, luminal A, and basal-like tumors of breast cancer.

A mitochondrial signature was obtained with the 54 mitochondrial proteins that show us patterns of abundance of proteins involved in mitochondrial dynamics, biogenesis, mitophagy, potential and ROS (Figure 9). In the signature proposed here, it is observed that proteins may be involved in one or several processes.

Additionally, characteristic protein expression patterns were found for each of the samples. In luminal A tumors, we found overexpression of GPX1, CCS, ENDOG, MAPK3, and RIPK3 proteins involved in ROS; PRDX3 and SOD1 in the ROS and PMM processes; TIMM10B, NDUFA13, APOOL, MICOS13 and TIMM10 of the MMO process; BCL2 involved in the MMO, PMM and ROS processes; PARK7 in MIT, PMM and ROS processes; ATG2B in MIT; FIS1 in FIS and MIT and MTFR1L in FIS compared to basal-like BC tumors. However, we found underexpression of the proteins CDK1, TRAP1 and TXNRD2 related to ROS; SRC, ABCD1 and LRRK2 in PMM and ROS; ROMO1 in MMO and ROS; STOML2, TOMM22, SLC25A31, MTX1, TIMM50, LETM1, OXA1L and MAIP1 in MMO; TSPO, SLC25A4 and PHB2 in MIT; and MFN2 and MFN1 in FUS compared to basal-like BC tumors.

In basal-like tumors, we found the overexpression of EEF2, CDK1, TRAP1 and TXNRD2 involved in ROS; SRC, ABCD1 and LRRK2 in ROS and PMM processes; ROMO1 in ROS and MMO; STOML2, MTX2, TOMM22, SLC25A31, MTX1, TIMM50, LETM1, OXA1L and MAIP1 in MMO; PHB2 in MIT; TSPO in MIT and PMM; SLC25A4 in MIT and MMO processes; MFN1 in FUS; MFN2 in FUS and MMO processes; and MIEF1 in FIS compared to luminal A tumors. However, we found underexpression of the proteins: PRDX2, GPX1, CCS, PRDX5, ENDOG, MAPK3, AIFM1 and RIPK3 involved in ROS; TUSC2 in PMM; PRDX3 and SOD1 in PMM and ROS processes; TIMM22, TIMM10B, NDUFA13, APOOL,

MICOS13, TIMM10, ALKBH7, RHOT1 in MMO; BCL2 in MMO, PMM and ROS processes; PARK7 in MIT, PMM and ROS processes; ATG2B and FUNDC2 in MIT; MTFR1L in FIS; and FIS1 in FIS and MIT processes compared to luminal A tumors.

Signature mitochondrial alterations in luminal A and basal-like breast cancer subtypes

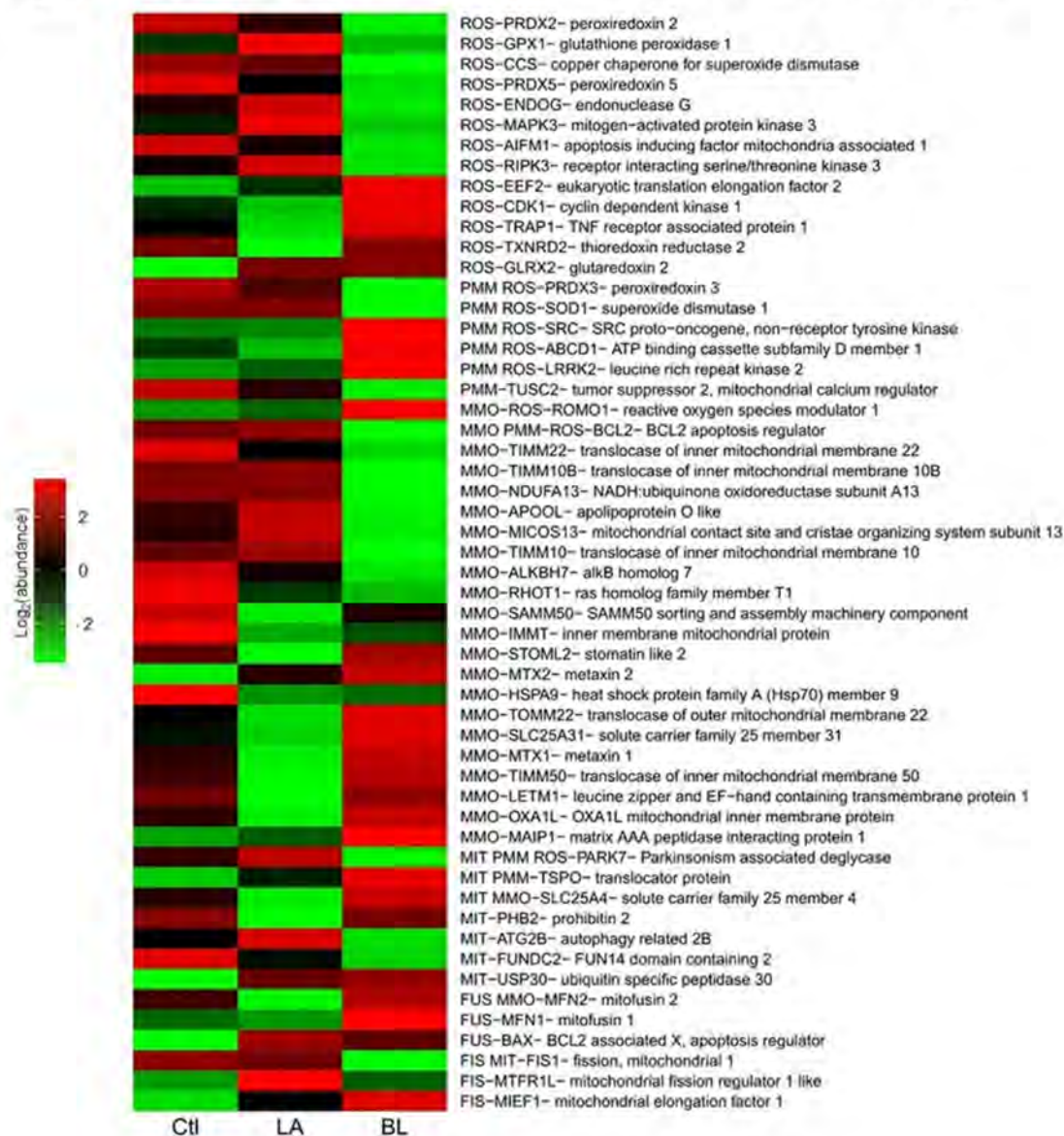


Figure 9. Signature mitochondrial alterations in luminal type A and basal-like breast cancer. Expression profiles of proteins involved in regulation and formation of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential (MMP), mitochondrial membrane organization (MMO), mitophagy (MIT), mitochondrial fusion (FUS) and mitochondrial fission (FIS), in control samples, luminal A and basal-like breast cancer tumors.

Moreover, in the case of control samples, we found overexpression of the proteins: PRDX2, PRDX5 and AIFM1 involved in ROS; TUSC2 in PMM; ALKBH7, RHOT1, SAMM50, IMMT and HSPA9 in the MMO; and FUNDC2 in MIT compared to luminal A and basal-like breast cancer tumors. However, we found underexpression of EEF2 and GLRX2 proteins involved in ROS; MTX2 in MMO; USP30 in MIT; TSPO in MIT and PPM processes; BAX in FUS; and MTFR1L and MIEF1 in FIS compared to luminal A and basal-like breast cancer tumors.

In general, these previously described protein expression profiles allow us to distinguish between luminal A and basal-like tumors and distinguish between women with and without cancer. It is also worth mentioning that these results obtained in women with luminal A and basal-like BC correlate with the data found in MCF7 and MDA-MB-231 cell lines.

3.9. Protein Signature of OXPHOS in Luminal A and Basal-like Breast Cancer

In addition, we generated a signature that exclusively shows abundance patterns of OXPHOS proteins between BC molecular subtypes and control samples to delve deeper into mitochondria's functional status and the potential it may have in detecting therapeutic targets of OXPHOS in BC [41,42].

We first evaluated the expression of mitochondrial complexes in cell lines by WB, using a cocktail containing antibodies against a labile subunit when its complex is not assembled. The following subunits of the OXPHOS complexes were immunodetected: NADH: Subunit B8 of ubiquinone oxidoreductase (CI-NDUFB8), subunit B of the iron-sulfur succinate dehydrogenase complex (CII-SDHB), ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2 (CIII-UQCRC2), mitochondrial cytochrome c oxidase catalytic subunit (CIV-MTCOI) and ATP synthase F alpha subunit (CV-ATP5A) (Figure 10A). However, we found no significant differences, but we observed a tendency to decrease the expression of the CIII-UQCRC2, CIV-MTCOI and the CV-ATP5A in the MDA-MB-231 line (Figure 10B).

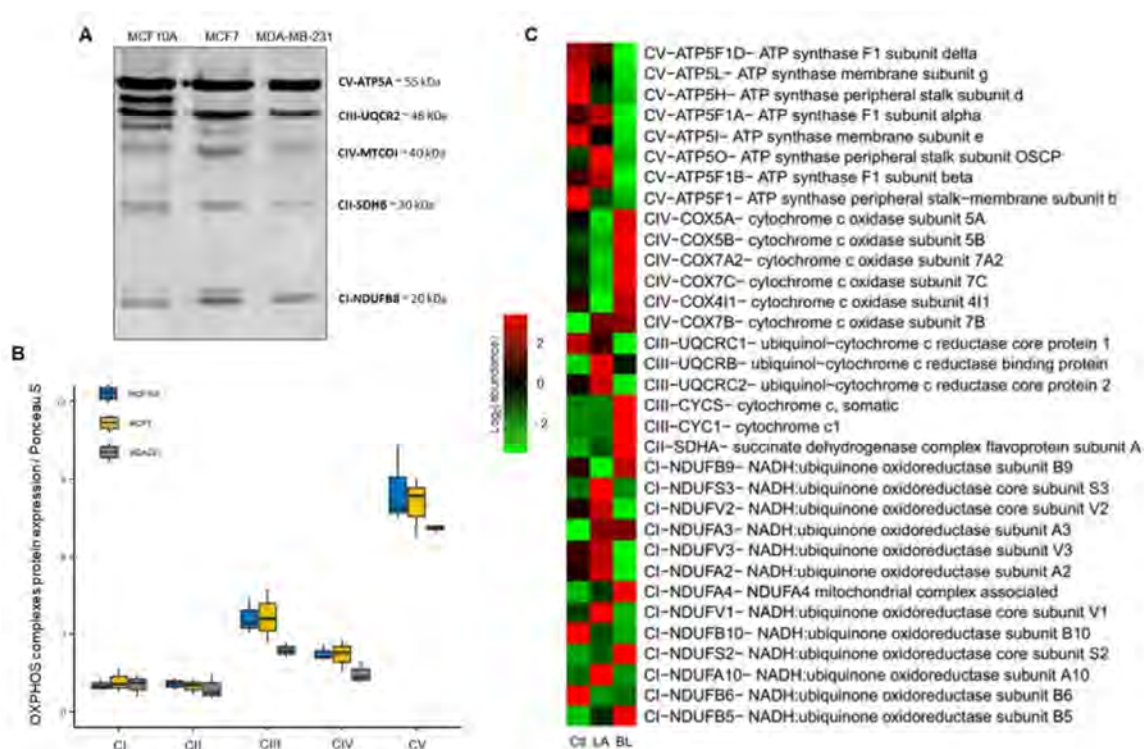


Figure 10. OXPHOS protein expression profiles in luminal A and basal-like subtypes of breast cancer. (A,B) Western blotting and expression of total oxidative phosphorylation (OXPHOS) cocktail in MCF10A, MCF7 and MDA-MB-231 cell lines. Densitometry values were normalized by Ponceau red staining. The data are presented as mean \pm SD, $n = 3$. (C) Proteins expression profiles of OXPHOS complexes in control samples, luminal A, basal-like breast cancer tumors.

In addition, we performed an overrepresentation analysis of OXPHOS with PCA proteins to generate expression profiles with OXPHOS proteins (Figure 10C).

We found that in luminal A tumors overexpression of the NDUFS3, NDUFV2, NDUFV3, NDUFA2, NDUFV1 and NDUFA10, and underexpression of the NDUFB9, NDUFA4,

NDUFB10, NDUF52 and NDUFB5 proteins of the CI; and underexpression of the COX5A, COX5B, COX7A2, COX7C and COX4I1 proteins of the CIV.

In basal-like tumors, we found overexpression of the NDUFB9, NDUF44, NDUF52 and NDUFB5 proteins of the CI; overexpression of the SDHA protein of the CII; overexpression of the CYCS and CYC1 proteins of the CIII and overexpression of the UQCR2 protein of the CIII, confirming the findings in cell lines by Western blot. Furthermore, in this same tumor type, we observed overexpression of the COX5A, COX5B, COX7A2, COX7C and COX4I1 proteins of the CIV; and underexpression of the ATP5F1D, ATP5L, ATP5H, ATP5F1A, ATP5I, ATP5O, ATP5F1B and ATP5F1 proteins of the CV.

We also observed heterogeneous expression of CI and CIII proteins in the two molecular subtypes of BC.

These findings show that the defects in the OXPHOS complexes impaired mitochondrial function, as found in past experiments. We believe that these marked differences in expression between the proteins of the OXPHOS complexes could be of diagnostic value, as they show a correlation with the aggressiveness of the type of BC.

In brief, analysis of mitochondrial protein expression shows that through the mitochondrial proteome it is possible to distinguish between BC samples and non-cancerous and to identify molecular subtypes. In addition, the analysis captures bioenergetics differences between BC types but also captures mitochondrial functional differences and their association with the aggressiveness that characterizes each type of BC. These results highlight the importance of studying differences in mitochondrial function between BC subtypes.

4. Discussion

Despite all the evidence of the critical role of mitochondria in cancer, few studies to date have focused on showing mitochondrial differences between BC subtypes, as well as few that reflect alterations in mitochondrial dynamics and their relationship to different mitochondrial and cellular processes.

The balance between mitochondrial fusion and fission is crucial to the preservation of mitochondrial function. Changes in mitochondrial dynamics have been associated with alteration in mitochondrial content, bioenergetics function and malignancy in cancer cells [43,44].

In different types of cancer, including BC, it has been reported that increased mitochondrial fission is associated mainly with Drp1 and Fis1 proteins and decreased mitochondrial fusion, which has been associated with poor prognosis and cancer aggressiveness [45–48]. This work demonstrates differential expression of proteins related to mitochondrial dynamics between luminal A and basal-like of BC. From both analyses of BC cell lines and analysis of the mitochondrial proteome in women with BC, we found decreased expression of the mitochondrial fission proteins Drp1 in MDA-MB-231 cell line (Figure 1E) and Fis1 in basal-like tumors (Figure 9). In contrast, Mfn 1 and 2 proteins overexpression was observed in basal-like tumors (Figure 9) and overexpression of Opa1 in the MDA-MB-231 cell line (Figure 1B). These findings suggest an increase in mitochondrial fusion for basal-like tumors. However, proteomics data suggest a decrease in mitochondrial fusion in luminal A subtype tumors. Similar results have been reported in gastric and lung cancer, in which Mfn2 overexpression has also been found [49,50]. Additionally, in Y. Lou et al.'s study, they also observed that silencing of Mfn2 in lung cancer results in inhibition of cell proliferation without impacting cell apoptosis [50]. Likewise, a recent study in patients with BC provided evidence that mitochondrial fission inhibits metastasis in triple-negative BC and that genes associated with mitochondrial fission correlate with better survival. In comparison, fusion genes correlate with worse survival [26]. In addition, these findings suggest that the mitochondrial dynamics have a more complex effect on BC cells than has been considered ultimately, which has not been fully elucidated.

Moreover, according to the mitochondrial proteome analysis (Figure 9), we believe that mitochondrial elongation factor 1 (MIEF1) may be a central regulator of mitochondrial fission in basal-like tumors. Research in colorectal cancer has reported that mitochondrial

division is affected by MIEF1 [51]. However, few studies have explored the influence of MIEF in BC.

On the other hand, this controversial finding may be related to the increased mitochondrial mass observed in basal-like cells (Figure 2A,B). It is well established that both mitochondrial biogenesis and mitophagy are essential to preserving mitochondrial quality control [52,53]. As mentioned, we surprisingly found an increase in PGC1 α biogenesis-related protein in the MDA-MB-231 cell line (basal-like) when compared to MCF7 (luminal A) and MCF10A (control) cell lines (Figure 2D). This increase in PGC1 α levels may be the result of a compensatory mechanism induced by the decrease in mitochondrial respiration and decoupling in OXPHOS (Figure 6B,C), as PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis increases the number of mitochondria and replaces damaged mitochondria. Furthermore, mitofusin-mediated fusion decreases the damage that accumulates in mitochondria [30]. Therefore, these data suggest a significantly altered mitochondrial function in MDA-MB-231 BC than in MCF7. Furthermore, we found a significant increase in the expression of PINK1 and p62 mitophagy proteins that contribute to removing mitochondria damage (Figure 3B,C). Additionally, although no significant difference in LC3-II expression was observed among the BC cell lines, an increasing trend was observed, especially in the MDA-MB-231 cell line (Figure 3E). This increase in the expression of mitophagy-associated proteins may be related to the decrease in both OXPHOS in both cell lines of BC. In addition to decreased mitochondrial function, we show that activation of mitophagy is a response to the decreased mitochondrial membrane potential (Figure 4A,B). Consistent with our results, previous research has reported that high LC3, PINK1 and p62 protein levels are associated with triple-negative BC (TNBC) patients and with poor response to chemotherapy, similar results have also been found in colorectal cancer, gastric, malignant melanoma, and esophageal cancer [54–61]. This demonstrates that deficiency of mitochondrial activity correlates with the invasiveness and metastatic capacity of the basal-like subtype of BC [62].

In addition, researchers have found that FUNDC1, a mammalian mitophagy receptor, regulates mitochondrial fusion-fission and mitophagy through the interaction of DNIM1L/Drp1 and Opa1 and can also recruit LC3 to induce mitophagy [63]. However, it was not identified in this work, but the FUN14 domain containing 2 (FUNDC2) protein was identified, which is also associated with mitochondria autophagy [64]. In a previous study, FUNDC2 gene overexpression was found in BC brain metastases [65]; unfortunately, so far, there are few studies on this protein in cancer.

Cancer cells have particular metabolic demands for proliferation and survival. Although the role of mitochondrial dynamics in the regulation of metabolism is still not well elucidated, it has been shown that mitochondrial fusion can promote OXPHOS capacity; thus, mitochondrial fission may be primarily related to a glycolytic phenotype [9]. Metabolic plasticity has been shown in BC to have the ability to promote late-stage tumor cell survival and relapsing tumor and metastasis formation in patients. To investigate the metabolic preference in breast cancer cell lines, we evaluated the expression of AMPK and HIF1 α , which have been considered key modulators of oxidative and glycolytic metabolism, respectively [35,66–68]. We confirmed that both MCF7 and MDA-MB-231 cell lines exhibit a switch from mitochondrial OXPHOS to glycolytic metabolism (Figure 5D). This preference for glycolytic metabolism in both cell lines of BC may be due to a decrease in the mitochondrial respiratory capacity, which was more evident in basal-like cell line by a marked decrease in mitochondrial respiration and decoupling of oxidative phosphorylation compared to luminal A cell line (Figure 6B,C). Concerning these mitochondrial alterations, here, through proteomic analysis, we showed a unique OXPHOS signature capturing the differential expression of complexes proteins between luminal A and basal-like tumors (Figure 10C), which could be of great use in exploring new therapeutic targets for BC [69]. This signature demonstrates a lower expression mainly of complexes I and V in basal-like tumors than luminal A tumors. Our results agree with a previous study by Lunetti et al. [70] in which it was suggested that complex I deficiency appears to be compensated by increased complex IV activity [70]. Supporting the idea of the therapeutic application of

OXPHOS targeted inhibitors, our data show concordance with this approach, which could also help to sensitize advanced BC. For instance, Raninga et al. [71] demonstrated that marizomib (Mzb), a proteasome inhibitor, inhibits complex II, which leads to reduced OXPHOS, induces caspase-3 dependent apoptosis and reduce tumor growth in TNBC, and reduces metastases in lung and brain cancers [71]. Another approach is the use of metformin as an anticancer therapy, showing that metformin reduces mitochondrial metabolite levels and inhibits complex I of the mitochondrial respiratory chain. However, the mechanism of action of metformin is still unclear; studies suggest that it may activate AMPK or reduce phosphorylated protein kinase B (pAKT) [42,72].

It is well established that alterations in the respiratory chain and the increase in HIF1 α , demonstrated here, can increase ROS production, and might be involved as initiators, promoters, and neoplastic transformation since it can act as mutation-driving agents and interact with signaling pathways [73,74]. It has also been suggested that increased ROS generation may play an important role in autophagy by activating signaling pathways [75]. We demonstrated that basal-like cell line produces more significant ROS levels than luminal A cell line (Figure 7A,B). This increase in ROS production may be associated with the impairment of mitochondrial complex I [70]. These differences in ROS production between the subtypes we found correlate with previous studies demonstrating that increased ROS production in TNBC cell lines has a protumorigenic role in the oncogenic signaling necessary for their proliferation and survival and maybe to promote metastatic potential [37,70].

On the other hand, there are drawbacks such as genetic and phenotypic drift and the lack of ability to reflect the intertumoral heterogeneity that cell lines present [76,77]. In this work, we demonstrate that exploiting proteomic data from repositories can be a valuable strategy/alternative that allowed us to integrate and deepen into the process of mitochondrial dynamics and bioenergetics. This strategy allowed us to obtain mitochondrial proteome expression profiles that distinguish between luminal A and basal-like tumors and discriminate between disease and normality (Figure 9). Overall, analysis of the mitochondrial proteome shows us that: (1) mitochondria play an essential role in the development of BC; (2) mitochondrial alterations are associated with increased aggressiveness and metastatic potential of this disease; (3) mitochondria may reflect functional differences between luminal A and basal-like subtypes; and (4) mitochondria proteome may be complementary to the molecular classification of BC, and of the great utility for patient stratification and the search for the new markers of diagnostic and therapeutic value. We believe that the inclusion of mitochondrial biomarkers in BC molecular signatures, such as PAM50, Oncotype DX, MammaPrint, and IHC4 [78], is crucial to improving the capture of intrinsic differences between molecular subtypes, which would have an impact on the diagnosis and even treatment of patients. This is because these signatures are still not sufficient to distinguish between subtypes, as shown in Figure S1A, where it can be seen that some luminal A are mistaken with basal-like tumors.

Therefore, in this work, we propose two mitochondrial signatures that allow us to distinguish between luminal A and basal type breast cancer tumors, from which potential biomarkers for diagnostic and/or therapeutic use could be identified.

5. Conclusions

Despite limitations of using cell lines, here it is demonstrated that through an appropriate selection, it was possible to reflect the differences between the luminal A and basal-like and the high heterogeneous that characterize BC. In addition, we demonstrated that through the complementarity of functional studies in BC cell lines and exploiting Mertins et al. [10] proteomics data analyses of BC samples, a functional mitochondrial proteomic signature was generated to distinguish between luminal A and basal-like subtypes of BC.

Furthermore, we show that the imbalance of mitochondrial dynamics may be associated with the loss of mitochondrial quality control and with alterations in bioenergetics in

luminal A and basal-like subtypes of BC. We show that although both breast cancer lines representing luminal A and basal-like subtypes possess a Warburg phenotype, the MCF7 (luminal A) cell line was characterized by a more conserved bioenergetics efficiency, even with the capacity to generate ATP via OXPHOS. In contrast, the MDA-MB-231 (basal-like) cell line showed a significant decrease in mitochondrial respiration and a marked uncoupling of OXPHOS. It was also shown that both cell lines were characterized by a significant increase in ROS, which may be due to alterations in OXPHOS complexes, mainly in CIII, CIV and CV.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom12030379/s1>, Figure S1: Flow chart of the statistical and bioinformatic analysis process of proteomic data of breast cancer tumors, Figure S2: Hierarchical cluster analysis, Table S1: Antibodies for Western blot and reagents, Table S2: Mitochondrial proteins, Table S3: Mitochondrial proteins expressed in Luminal A and basal-like subtypes of breast cancer, Table S4: Abundance data for PCA, Table S5: Explained variance of PCA, Table S6: Correlation matrix, Table S7: Proteins for analysis of overrepresentation biological processes, Table S8: Overrepresentation of biological processes.

Author Contributions: Conceptualization, A.J.O.-L.; methodology, A.J.O.-L., A.B.-H. and O.E.A.-T.; validation, A.J.O.-L. and L.G.-C.; formal analysis, A.J.O.-L. and L.G.-C.; investigation, A.J.O.-L.; resources, J.P.-C.; data curation, A.J.O.-L. and L.G.-C.; writing—original draft preparation, A.J.O.-L. and L.G.-C.; writing—review and editing, A.J.O.-L., L.G.-C. and J.P.-C.; visualization, A.J.O.-L. and L.G.-C.; supervision, A.J.O.-L. and J.P.-C.; project administration, J.P.-C.; funding acquisition, J.P.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Research conducted for this publication was supported by grants from “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” (CONACyT, A1-S-7495) to José Pedraza-Chaverri. Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (IN200922) of Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (5000-9105) of Facultad de Química, UNAM.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Global proteomics data from women with breast cancer classified according to the molecular classification of breast cancer can be found in the publication “Proteogenomics connects somatic mutations to signaling in breast cancer” by Mertins et al. in Table S3 of the supplementary material. Data used in this publication were generated by the Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium (NCI/NIH).

Acknowledgments: We acknowledge Dr. Alejandro García-Carrancá for the donation of the cell line MCF7 from the Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México & Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud, Mexico City, and Dr. Alejandro Zentella-Dehesa for the donation of the MCF10A and MDA-MB-231 cell lines from the Biochemistry Unit, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Ariadna Jazmín Ortega-Lozano is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 637627 from CONACYT, México. This article is a requirement for obtaining the Doctor of Science degree of the Programa de Posgrado de Ciencias Biomédicas, UNAM.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Polyak, K. Review series introduction Heterogeneity in breast cancer. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 2011–2013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Scheid, A.D.; Beadnell, T.C.; Welch, D.R. Roles of mitochondria in the hallmarks of metastasis. *Br. J. Cancer* **2021**, *124*, 124–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Giampazolias, E.; Tait, S.W.G. Mitochondria and the hallmarks of cancer. *FEBS J.* **2016**, *283*, 803–814. [[CrossRef](#)]

5. Bordi, M.; Nazio, F.; Campello, S. The Close interconnection between mitochondrial dynamics and mitophagy in cancer. *Front. Oncol.* **2017**, *7*, 81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Han, X.J.; Yang, Z.J.; Jiang, L.P.; Wei, Y.F.; Liao, M.F.; Qian, Y.; Li, Y.; Huang, X.; Wang, J.-B.; Xin, H.-B.; et al. Mitochondrial dynamics regulates hypoxia-induced migration and antineoplastic activity of cisplatin in breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2015**, *46*, 691–700. [[CrossRef](#)]
7. Dai, X.; Cheng, H.; Bai, Z.; Li, J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J. Cancer* **2017**, *8*, 3131. [[CrossRef](#)]
8. Kim, Y.Y.; Yun, S.H.; Yun, J. Downregulation of Drp1, a fission regulator, is associated with human lung and colon cancers. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2018**, *50*, 209–215. [[CrossRef](#)]
9. Weiner-Gorzal, K.; Murphy, M. Mitochondrial dynamics, a new therapeutic target for Triple Negative Breast Cancer. *Biochim. Biophys. Acta-Rev. Cancer* **2021**, *1875*, 188518. [[CrossRef](#)]
10. Mertins, P.; Mani, D.R.; Ruggles, K.V.; Gillette, M.A.; Clauser, K.R.; Wang, P.; Wang, X.; Qiao, J.W.; Cao, S.; Petralia, F.; et al. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature* **2016**, *534*, 55–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Ziegler, Y.S.; Moresco, J.J.; Tu, P.G.; Yates, J.R.; Nardulli, A.M. Plasma membrane proteomics of human breast cancer cell lines identifies potential targets for breast cancer diagnosis and treatment. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Romero-Calvo, I.; Ocón, B.; Martínez-Moya, P.; Suárez, M.D.; Zarzuelo, A.; Martínez-Augustín, O.; de Medina, F.S. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal. Biochem.* **2010**, *401*, 318–320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Butler, T.A.J.; Paul, J.W.; Chan, E.C.; Smith, R.; Tolosa, J.M. Misleading westerns: Common quantification mistakes in western blot densitometry and proposed corrective measures. *BioMed Res. Int.* **2019**, *2019*, 5214821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Briones-Herrera, A.; Ramírez-Camacho, I.; Zazueta, C.; Tapia, E.; Pedraza-Chaverri, J. Altered proximal tubule fatty acid utilization, mitophagy, fission and supercomplexes arrangement in experimental Fanconi syndrome are ameliorated by sulforaphane-induced mitochondrial biogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, *153*, 54–70. [[CrossRef](#)]
15. Marín Franco, J.L.; Genoula, M.; Corral, D.; Duette, G.; Ferreyra, M.; Maio, M.; Dolotowicz, M.B.; Aparicio-Trejo, O.E.; Patiño-Martínez, E.; Charton, A.; et al. Host-Derived Lipids from Tuberculous Pleurisy Impair Macrophage Microbicidal-Associated Metabolic Activity. *Cell Rep.* **2020**, *33*, 108547. [[CrossRef](#)]
16. Reyes-Fermin, L.M.; Avila-Rojas, S.H.; Aparicio-Trejo, O.E.; Tapia, E.; Rivero, I.; Pedraza-Chaverri, J. The protective effect of alpha-mangostin against cisplatin-induced cell death in LLC-PK1 cells is associated to mitochondrial function preservation. *Antioxidants* **2019**, *8*, 133. [[CrossRef](#)]
17. Blagotić, A.; Daróczy, G. Rapport: A Report Templating System 2012. Available online: https://daroczig.github.io/slides/2014-07-03_user_rapport-a-report-templating-system-in-R.pdf (accessed on 10 August 2021).
18. Smith, A.C.; Robinson, A.J. MitoMiner v3.1, an update on the mitochondrial proteomics database. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D1258–D1261. [[CrossRef](#)]
19. Stekhoven, D.J.; Bühlmann, P. MissForest-Non-parametric missing value imputation for mixed-type data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 112–118. [[CrossRef](#)]
20. Lê, S.; Josse, J.; Husson, F. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.* **2008**, *25*, 1–18. [[CrossRef](#)]
21. Vyas, S.; Zaganjor, E.; Haigis, M.C. Mitochondria and Cancer. *Cell* **2016**, *166*, 555–566. [[CrossRef](#)]
22. Abdi, H.; Williams, L.J. Principal component analysis. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* **2010**, *2*, 433–459. [[CrossRef](#)]
23. Ashburner, M.; Ball, C.A.; Blake, J.A.; Botstein, D.; Butler, H.; Michael Cherry, J.; Davis, A.P.; Dolinski, K.; Dwight, S.S.; Eppig, J.T.; et al. Gene Ontology: Tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 25–29. [[CrossRef](#)]
24. Mishra, P.; Chan, D.C. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J. Cell Biol.* **2016**, *212*, 379–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zhao, J.; Zhang, J.; Yu, M.; Xie, Y.; Huang, Y.; Wolff, D.W.; Abel, P.W.; Tu, Y. TRANSWELL MIGRATION4 Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells HHS Public Access. *Oncogene* **2013**, *32*, 4814–4824. [[CrossRef](#)]
26. Humphries, B.A.; Cutter, A.C.; Buschhaus, J.M.; Buschhaus, J.M.; Chen, Y.C.; Chen, Y.C.; Chen, Y.C.; Qyli, T.; Palagama, D.S.W.; Eckley, S.; et al. Enhanced mitochondrial fission suppresses signaling and metastasis in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2020**, *22*, 60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Popov, L.D. Mitochondrial biogenesis: An update. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 4892–4899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Chourasia, A.H.; Boland, M.L.; Macleod, K.F. Mitophagy and cancer. *Cancer Metab.* **2015**, *3*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Yoo, S.M.; Jung, Y.K. A molecular approach to mitophagy and mitochondrial dynamics. *Mol. Cells* **2018**, *41*, 18–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Archer, S.L. Mitochondrial Dynamics—Mitochondrial Fission and Fusion in Human Diseases. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 2236–2251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Ly, J.D.; Grubb, D.R.; Lawen, A. The mitochondrial membrane potential ($\delta\psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* **2003**, *8*, 115–128. [[CrossRef](#)]
32. Gorelick, A.N.; Kim, M.; Chatila, W.K.; La, K.; Hakimi, A.A.; Berger, M.F.; Taylor, B.S.; Gammage, P.A.; Reznik, E. Respiratory complex and tissue lineage drive recurrent mutations in tumour mtDNA. *Nat. Metab.* **2021**, *3*, 558–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Haq, R.; Shoag, J.; Andreu-Perez, P.; Yokoyama, S.; Edelman, H.; Rowe, G.C.; Frederick, D.T.; Hurley, A.D.; Nellore, A.; Kung, A.L.; et al. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell* **2013**, *23*, 302–315. [[CrossRef](#)]

35. Yu, L.; Lu, M.; Jia, D.; Ma, J.; Ben-Jacob, E.; Levine, H.; Kaiparettu, B.A.; Onuchic, J.N. Modeling the genetic regulation of cancer metabolism: Interplay between glycolysis and oxidative phosphorylation. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 1564–1574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. De Sá Junior, P.L.; Câmara, D.A.D.; Porcacchia, A.S.; Fonseca, P.M.M.; Jorge, S.D.; Araldi, R.P.; Ferreira, A.K. The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 2467940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Sarmiento-Salinas, F.L.; Delgado-Magallón, A.; Montes-Alvarado, J.B.; Ramírez-Ramírez, D.; Flores-Alonso, J.C.; Cortés-Hernández, P.; Reyes-Leyva, J.; Herrera-Camacho, I.; Anaya-Ruiz, M.; Pelayo, R.; et al. Breast cancer subtypes present a differential production of reactive oxygen species (ROS) and susceptibility to antioxidant treatment. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Chan, L.S.A.; Gu, L.C.H.; Leitch, H.A.; Wells, R.A. Intracellular ROS profile in hematopoietic progenitors of MDS patients: Association with blast count and iron overload. *Hematology* **2021**, *26*, 88–95. [[CrossRef](#)]
39. Nishikawa, M. Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer Lett.* **2008**, *266*, 53–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Mori, K.; Uchida, T.; Yoshie, T.; Mizote, Y.; Ishikawa, F.; Katsuyama, M.; Shibamura, M. A mitochondrial ROS pathway controls matrix metalloproteinase 9 levels and invasive properties in RAS-activated cancer cells. *FEBS J.* **2019**, *286*, 459–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Sica, V.; Bravo-San Pedro, J.M.; Stoll, G.; Kroemer, G. Oxidative phosphorylation as a potential therapeutic target for cancer therapy. *Int. J. Cancer* **2020**, *146*, 10–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Lord, S.R.; Cheng, W.C.; Liu, D.; Gaude, E.; Haider, S.; Metcalf, T.; Patel, N.; Teoh, E.J.; Gleeson, F.; Bradley, K.; et al. Integrated Pharmacodynamic Analysis Identifies Two Metabolic Adaptation Pathways to Metformin in Breast Cancer. *Cell Metab.* **2018**, *28*, 679–688.e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Cheng, C.T.; Kuo, C.Y.; Ouyang, C.; Li, C.F.; Chung, Y.; Chan, D.C.; Kung, H.J.; Ann, D.K. Metabolic stress-induced phosphorylation of kap1 ser473 blocks mitochondrial fusion in breast cancer cells. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 5006–5018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Dai, W.; Jiang, L. Dysregulated Mitochondrial Dynamics and Metabolism in Obesity, Diabetes, and Cancer. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 570. [[CrossRef](#)]
45. Liu, B.; Fan, Y.; Song, Z.; Han, B.; Meng, Y.; Cao, P.; Tan, K. Identification of DRP1 as a prognostic factor correlated with immune infiltration in breast cancer. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *89*, 107078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ferreira-da-Silva, A.; Valacca, C.; Rios, E.; Pópulo, H.; Soares, P.; Sobrinho-Simões, M.; Scorrano, L.; Máximo, V.; Campello, S. Mitochondrial dynamics protein Drp1 is overexpressed in oncocyctic thyroid tumors and regulates cancer cell migration. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0122308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Chen, L.; Zhang, J.; Lyu, Z.; Chen, Y.; Ji, X.; Cao, H.; Jin, M.; Zhu, J.; Yang, J.; Ling, R.; et al. Positive feedback loop between mitochondrial fission and Notch signaling promotes survivin-mediated survival of TNBC cells. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 1050. [[CrossRef](#)]
48. Yu, M.; Nguyen, N.D.; Huang, Y.; Lin, D.; Fujimoto, T.N.; Molkenkine, J.M.; Deorukhkar, A.; Kang, Y.; Anthony San Lucas, F.; Fernandes, C.J.; et al. Mitochondrial fusion exploits a therapeutic vulnerability of pancreatic cancer. *JCI Insight* **2019**, *4*, e126915. [[CrossRef](#)]
49. Fang, C.L.; Sun, D.P.; Chen, H.K.; Lin, C.C.; Hung, S.T.; Uen, Y.H.; Lin, K.Y. Overexpression of mitochondrial GTPase MFN2 represents a negative prognostic marker in human gastric cancer and its inhibition exerts anti-cancer effects. *J. Cancer* **2017**, *8*, 1153–1161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Lou, Y.; Li, R.; Liu, J.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Jin, B.; Liu, Y.; Wang, Z.; Zhong, H.; Wen, S.; et al. Mitofusin-2 over-expresses and leads to dysregulation of cell cycle and cell invasion in lung adenocarcinoma. *Med. Oncol.* **2015**, *32*, 132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Viale, G. The current state of breast cancer classification. *Ann. Oncol.* **2012**, *23*, x207–x210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Palikaras, K.; Tavernarakis, N. Mitochondrial homeostasis: The interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp. Gerontol.* **2014**, *56*, 182–188. [[CrossRef](#)]
53. Praharaaj, P.P.; Panigrahi, D.P.; Bhol, C.S.; Patra, S.; Mishra, S.R.; Mahapatra, K.K.; Behera, B.P.; Singh, A.; Patil, S.; Bhutia, S.K. Mitochondrial rewiring through mitophagy and mitochondrial biogenesis in cancer stem cells: A potential target for anti-CSC cancer therapy. *Cancer Lett.* **2021**, *498*, 217–228. [[CrossRef](#)]
54. Kondo, T.; Oka, T.; Sato, H.; Shinnou, Y.; Washio, K. Accumulation of aberrant CpG hypermethylation by *Helicobacter pylori* infection promotes development. *Int. J. Oncol.* **2009**, *35*, 547–557. [[CrossRef](#)]
55. Yamashita, K.; Miyata, H.; Makino, T.; Masuike, Y.; Furukawa, H.; Tanaka, K.; Miyazaki, Y.; Takahashi, T.; Kurokawa, Y.; Yamasaki, M.; et al. High Expression of the Mitophagy-Related Protein Pink1 is Associated with a Poor Response to Chemotherapy and a Poor Prognosis for Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **2017**, *24*, 4025–4032. [[CrossRef](#)]
56. Mustafa, M.F.; Saliluddin, S.M.; Fakurazi, S.; Tizen Laim, N.M.S.; Md Pauzi, S.H.; Nik Yahya, N.H.; Gopal, S.R.N.; Abdullah, M.A.; Maniam, S. Expression of Autophagy and Mitophagy Markers in Breast Cancer Tissues. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 612009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Namgoong, M.G.; Khanal, P.; Cho, H.G.; Lim, S.C.; Oh, Y.K.; Kang, B.S.; Shim, J.H.; Yoo, J.C.; Choi, H.S. The prolyl isomerase Pin1 induces LC-3 expression and mediates tamoxifen resistance in breast cancer. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 23829–23841. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

58. Quidville, V.; Alsafadi, S.; Goubar, A.; Commo, F.; Scott, V.; Pioche-Durieu, C.; Girault, I.; Baconnais, S.; Le Cam, E.; Lazar, V.; et al. Targeting the deregulated spliceosome core machinery in cancer cells triggers mTOR blockade and autophagy. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 2247–2258. [[CrossRef](#)]
59. Masuda, G.O.; Yashiro, M.; Kitayama, K.; Miki, Y.; Kasashima, H.; Kinoshita, H.; Morisaki, T.; Fukuoka, T.; Hasegawa, T.; Sakurai, K.; et al. Clinicopathological Correlations of Autophagy-related Proteins LC3, Beclin 1 and p62 in Gastric Cancer. *Anticancer Res.* **2016**, *36*, 129–136. [[PubMed](#)]
60. Wu, S.; Sun, C.; Tian, D.; Li, Y.; Gao, X.; He, S.; Li, T. Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 3882–3891.
61. Li, S.S.; Xu, L.Z.; Zhou, W.; Yao, S.; Wang, C.L.; Xia, J.L.; Wang, H.F.; Kamran, M.; Xue, X.Y.; Dong, L.; et al. p62/SQSTM1 interacts with vimentin to enhance breast cancer metastasis. *Carcinogenesis* **2017**, *38*, 1092–1103. [[CrossRef](#)]
62. Ma, Q.; Zhu, C.; Zhang, W.; Ta, N.; Zhang, R.; Liu, L.; Feng, D.; Cheng, H.; Liu, J.; Chen, Q. Mitochondrial PIP3-binding protein FUNDC2 supports platelet survival via AKT signaling pathway. *Cell Death Differ.* **2019**, *26*, 321–331. [[CrossRef](#)]
63. Chen, M.; Chen, Z.; Wang, Y.; Tan, Z.; Zhu, C.; Li, Y.; Han, Z.; Chen, L.; Gao, R.; Liu, L.; et al. Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy. *Autophagy* **2016**, *12*, 689–702. [[CrossRef](#)]
64. Bateman, A.; Martin, M.J.; Orchard, S.; Magrane, M.; Agivetova, R.; Ahmad, S.; Alpi, E.; Bowler-Barnett, E.H.; Britto, R.; Bursteinas, B.; et al. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D480–D489. [[CrossRef](#)]
65. Schulten, H.J.; Bangash, M.; Karim, S.; Dallol, A.; Hussein, D.; Merdad, A.; Al-Thoubaity, F.K.; Al-Maghrabi, J.; Jamal, A.; Al-Ghamdi, F.; et al. Comprehensive molecular biomarker identification in breast cancer brain metastases. *J. Transl. Med.* **2017**, *15*, 269. [[CrossRef](#)]
66. Chen, Y.; Liu, L.; Xia, L.; Wu, N.; Wang, Y.; Li, H.; Chen, X.; Zhang, X.; Liu, Z.; Zhu, M.; et al. TRPM7 silencing modulates glucose metabolic reprogramming to inhibit the growth of ovarian cancer by enhancing AMPK activation to promote HIF-1 α degradation. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2022**, *41*, 44. [[CrossRef](#)]
67. Muralidharan, S.; Sahoo, S.; Saha, A.; Chandran, S.; Majumdar, S.S.; Levine, H.; Jolly, M.K. Quantifying the patterns of metabolic plasticity and heterogeneity along the epithelial-hybrid-mesenchymal spectrum in cancer. *bioRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]
68. Ye, F.; Jia, D.; Lu, M.; Levine, H.; Deem, M.W. Modularity of the metabolic gene network as a prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **2018**, *9*, 15015–15026. [[CrossRef](#)]
69. Dankó, T.; Petővári, G.; Sztankovics, D.; Moldvai, D.; Raffay, R.; Lőrincz, P.; Visnovitz, T.; Zsiros, V.; Barna, G.; Márk, Á.; et al. Rapamycin plus doxycycline combination affects growth arrest and selective autophagy-dependent cell death in breast cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8019. [[CrossRef](#)]
70. Lunetti, P.; Di Giacomo, M.; Vergara, D.; De Domenico, S.; Maffia, M.; Zara, V.; Capobianco, L.; Ferramosca, A. Metabolic reprogramming in breast cancer results in distinct mitochondrial bioenergetics between luminal and basal subtypes. *FEBS J.* **2019**, *286*, 688–709. [[CrossRef](#)]
71. Raninga, P.V.; Lee, A.; Sinha, D.; Dong, L.F.; Datta, K.K.; Lu, X.; Kalita-De Croft, P.; Dutt, M.; Hill, M.; Pouliot, N.; et al. Marizomib suppresses triple-negative breast cancer via proteasome and oxidative phosphorylation inhibition. *Theranostics* **2020**, *10*, 5259–5275. [[CrossRef](#)]
72. Thompson, A.M. Molecular pathways: Preclinical models and clinical trials with Metformin in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 2508–2515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Hecht, F.; Pessoa, C.F.; Gentile, L.B.; Rosenthal, D.; Carvalho, D.P.; Fortunato, R.S. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 4281–4291. [[CrossRef](#)]
74. Moldogazieva, N.T.; Mokhosoev, I.M.; Terentiev, A.A. Metabolic heterogeneity of cancer cells: An interplay between HIF-1, GLUTs, and AMPK. *Cancers* **2020**, *12*, 862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Gwak, E.; Kim, D.; Hwang, H.; Kwon, H.J. Mitochondrial ROS produced in human colon carcinoma HCT116 cells reduces cell survival via autophagy. *Preprints* **2022**, 2022010324. [[CrossRef](#)]
76. Burdall, S.E.; Hanby, A.M.; Lansdown, M.R.J.; Speirs, V. Breast cancer cell lines: Friend or foe? *Breast Cancer Res.* **2003**, *5*, 89–95. [[CrossRef](#)]
77. Lacroix, M.; Leclercq, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: An update. *Breast Cancer Res. Treat.* **2004**, *83*, 249–289. [[CrossRef](#)]
78. Vieira, A.F.; Schmitt, F. An update on breast cancer multigene prognostic tests-emergent clinical biomarkers. *Front. Med.* **2018**, *5*, 248. [[CrossRef](#)]