



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARCELLA REGINA CARDOSO

ABORDAGEM METABOLÔMICA PARA PREDIÇÃO DA RESPOSTA À
QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE EM MULHERES COM DIFERENTES SUBTIPOS
DE CÂNCER DE MAMA

*METABOLOMIC APPROACH FOR PREDICTING RESPONSE TO NEOADJUVANT
CHEMOTHERAPY IN WOMEN WITH DIFFERENT SUBTYPES
OF BREAST CANCER*

CAMPINAS

2021

MARCELLA REGINA CARDOSO

ABORDAGEM METABOLÔMICA PARA PREDIÇÃO DA RESPOSTA À
QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE EM MULHERES COM DIFERENTES SUBTIPOS
DE CÂNCER DE MAMA

*METABOLOMIC APPROACH FOR PREDICTING RESPONSE TO NEOADJUVANT
CHEMOTHERAPY IN WOMEN WITH DIFFERENT SUBTYPES
OF BREAST CANCER*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências da
Saúde, área de concentração Oncologia Ginecológica e
Mamária.

*Thesis presented to the Obstetrics and Gynecology Graduate
Program of School of Medical Sciences from University of
Campinas to obtain the Ph.D. degree in Health Sciences in
Gynecological Oncology and Breast Cancer Area.*

ORIENTADORA: SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN

COORIENTADORA: ANDRÉIA DE MELO PORCARI

COORIENTADOR INTERNACIONAL: LEO LING CHENG

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA MARCELLA REGINA CARDOSO, E
ORIENTADA PELA PROF.^a DR.^a SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C179a Cardoso, Marcella Regina, 1986-
Abordagem metabolômica para predição da resposta à quimioterapia neoadjuvante em mulheres com diferentes subtipos de câncer de mama / Marcella Regina Cardoso. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientadores: Sophie Françoise Mauricette Derchain e Leo Ling Cheng.
Coorientador: Andréia de Melo Porcari.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.
Em cotutela com: Harvard Medical School - Massachusetts General Hospital.

1. Neoplasias da mama. 2. Espectroscopia de ressonância magnética. 3. Resistência a medicamentos. 4. Metabolismo. 5. Aprendizado de máquina. I. Derchain, Sophie Françoise Mauricette, 1959-. II. Cheng, Leo Ling. III. Porcari, Andréia de Melo, 1983-. IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. VI. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Metabolomic approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in women with different subtypes of breast cancer

Palavras-chave em inglês:

Breast neoplasms
Magnetic resonance spectroscopy
Drug resistance
Metabolism
Machine learning

Área de concentração: Oncologia Ginecológica e Mamária

Titulação: Doutora em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Sophie Françoise Mauricette Derchain [Orientador]
Ana Paula Candiota
Maria Laura Costa do Nascimento
Ana Carolina de Mattos Zeri
César Cabello dos Santos

Data de defesa: 29-09-2021

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-9924-478X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9811157145492380>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARCELLA REGINA CARDOSO

ORIENTADORA: SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN

COORDINADORA: ANDRÉIA DE MELO PORCARI

COORDINADOR: LEO LING CHENG

MEMBROS TITULARES:

1. Prof.^a Dr.^a Sophie Françoise Mauricette Derchain

2. Prof.^a Dr.^a Ana Paula Candiota Silveira

3. Prof.^a Dr.^a Maria Laura Costa do Nascimento

4. Prof.^a Dr.^a Ana Carolina de Mattos Zeri

5. Prof. Dr. César Cabello dos Santos

Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 29/09/2021

DEDICATÓRIA

E hoje eu dedico minha Tese:

Ao Rodrigo Calvi. A onipresença de estar dentro e junto mesmo quando se está longe.
A generosidade que sempre fez de você um gigante. Você é a melhor parte de mim.
A minha fonte inesgotável de inspiração.
E amor.
Infinito. 

Ao meu Pai. Eu sei que a nossa história é pra ser além de mim.
A nossa história é pra ser além daqui.
A nossa história atravessa o tempo e o plano. 

AGRADECIMENTOS

Se você tivesse asas para onde voaria?

Agradeço primeiramente a Deus por me fazer perceber todos os dias que voar é o que me mantém de pé. Agradeço pela extrema bondade, benevolência e por todas inúmeras oportunidades concedidas a cada dia. Sou muito grata por permitir que hoje eu respire a vida, certa de que há um recomeço me esperando sempre que for preciso.

Agradeço à minha mãe Regina. Minha flor, minha cor, minha cara. Muito obrigada mãe, por ser parte de tudo o que sou hoje. Nós já fomos dois corações batendo em um só corpo. Obrigada pela doação, obrigada pela dedicação e acima de tudo pela oportunidade de dividir comigo a sua vida. Agradeço pelos ensinamentos e por me fazer adotar uma postura íntegra, forte e valente perante a vida. Por vezes você me mostrou que um pássaro quando aprende a voar, sabe muito mais sobre coragem do que de voo e hoje eu amo a mulher que me tornei, porque eu lutei muito para ser quem sou. Que eu tenha a humildade todos os dias de sempre reconhecer o teu abraço como meu lar. E que eu te aproveite, em todos os sentidos enquanto há tempo, o máximo que puder. Obrigada é uma palavra que não compreende o tamanho do meu sentimento. Amor talvez chegue perto. Muito.

Agradeço ao meu pai Luiz. Porque metade de mim é feita de poesia, música, paixão e arte. Pai, você é uma longa história na minha vida. Intenso, forte e coração gigante. É exatamente assim que sempre vou me lembrar de você. Você vive dentro de mim com uma força que você nem imagina. Para mim, você existe em tudo o que eu falo, em tudo o que eu faço. Obrigada por não me deixar esquecer que o melhor lugar do mundo é aqui, e agora. Agradeço por me fazer perceber o encanto que existe na audácia e na obstinação. Na memória do coração carrego todas as eternidades. Você me ensinou que o amor não cabe na realidade. A poesia existe para isto.

Agradeço ao meu irmão Thiago por ter norteado grande parte do meu caminho até aqui. Nunca vou me esquecer de tudo o que você fez por mim.

Agradeço ao Nori por me mostrar todos os dias como a vida pode ser mais leve e mais feliz. O Nori tem o dom de melhorar tudo e numa dessas ele transformou demais a minha existência...pra sempre. Agradeço por me fazer acreditar, cada vez mais, que tudo que é pra ser meu encontrará um caminho para chegar até mim. Obrigada por me ensinar a amar no mais profundo da minha essência e por iluminar as nossas vidas.

Agradeço a minha irmã de alma Ci. Você na minha vida é um acontecimento. É um presente, forte, absoluto, definitivo. Eu costumo dizer que ter te conhecido foi como escutar uma música pela primeira vez e saber que seria a minha favorita. Obrigada por dividir comigo esse caminho lindo chamado vida, por me ensinar ser uma pessoa melhor, por trazer mais racionalidade nos meus dias e por ter sempre um conselho esperando por mim. Agradeço por todas as lições sobre lealdade e confiança. Eu amo a nossa amizade e cumplicidade. E eu te amo por milhões de pequenas coisas que você nem imagina que faz. Agradeço a Tia Sula e ao Lucas por serem absolutamente uma família para mim. Agradeço por todo acolhimento e pelas inúmeras demonstrações de carinho e amparo.

Agradeço minha mana querida Natália Tobar. Você é tão incrível! Eu queria que você se visse com os meus olhos para entender a imensidão que você é. Muito obrigada por sempre me incentivar e acreditar no meu potencial. O seu olhar para o mundo transforma minha vida todos os dias.

Muito obrigada as minhas amigas Aline, Lis, Livia e Roberta por serem meu maior alicerce de amizade. Por me mostrarem que os abismos que se alargam conforme os anos passam são tão ínfimos perto do valor que uma dá para outra. E é isso o que realmente importa.

Agradeço às minhas musas inspiradoras que a vida acadêmica me deu e que trago comigo desde a minha iniciação científica no Laboratório de Nutrição e Câncer – IB UNICAMP. Talvez a Rebeka Tomasin não tenha noção de como ela transformou a minha vida, de como eu sou grata simplesmente por ela existir. Rê, muito obrigada por ter aberto as portas do laboratório para mim e por ter me apresentado a este magnífico universo. Você sabe que a sua amizade é um dos meus bens mais preciosos. Agradeço à Laís Viana por ser minha alma gêmea e por ocupar uma parte muito especial no meu coração. Agradeço por cada momento compartilhado ao longo desses anos e por absolutamente ter me apoiado na confecção do meu projeto de doutorado. Você foi imprescindível para que tudo isto hoje tenha se tornado realidade. Agradeço à Larissa Yuri por esse nosso reencontro. A Lari é a minha caixinha de Pandora. A cada dia ela me surpreende com uma reflexão super elaborada, uma atitude extremamente evoluída e me presenteia com sua amizade singularmente preciosa. Obrigada Aline Toneto por todo companheirismo ao longo desses anos, por todos os ensinamentos sobre fé e humildade. Eu tenho um orgulho enorme da mulher que eu vi crescer ao longo desses anos. Agradeço à Emilianne Salomão por ser nosso maior exemplo e referência. A Emi além do extremo profissionalismo ela tem um dos maiores corações que eu já conheci. Eu não tenho nem palavras para descrever o tamanho da minha gratidão por tudo o que ela já fez por mim. Em um dos momentos mais difíceis e decisivos da minha vida, ela foi uma verdadeira irmã para mim, me abrigoando junto ao seio de sua família. Eu confesso que aquele foi um dos momentos que eu mais me senti cuidada e amparada. Você não imagina o tamanho da minha gratidão e da minha extrema e total admiração por você e pelo Aluizio. O Kauan tem muita sorte de ter pais tão especiais!

Agradeço aos melhores amigos que a vida poderia me dar, a verdadeira herança que veio embrulhada para presente. Leandro Calvi, João Beraquet, Jota Capovilla e Daniela Schwab (estranho seria se eu não me apaixonasse por você!), vocês não fazem ideia do tamanho do amor e consideração que eu sinto por vocês. Vocês são o maior legado que o Rodrigo poderia me deixar e serei eternamente grata por isso.

Agradeço ao Bruno Melo que tão despreziosamente entrou na minha vida e hoje se tornou meu querido compadre. Eu ainda me deixo surpreender com as voltas que o mundo dá. Que felicidade é ter você sempre por perto mesmo morando tão longe!

Agradeço à toda a minha família, em especial meu tio Renato que tem sido imprescindível na minha caminhada. Seu apoio e sua confiança foram essenciais na minha jornada.

Agradeço à Lena Sabino pelo carinho ilimitado que sempre direcionou a mim. Eu gosto tanto de você, ah como eu gosto de você! Você é amor em movimento. Meu pai definitivamente foi um cara de sorte!

Agradeço ao meu amigo Bira Schenkel que de perto ou longe sempre zelou por mim. Eu me sinto absolutamente abençoada por ter você na minha vida e por todas as vezes que você tão carinhosamente cuidou de mim, principalmente em um dos momentos mais difíceis da minha vida.

Agradeço ao Ivo Alexandre por me ensinar tanto todos os dias. Nossas conversas intermináveis no Hospital Infantil Boldrini e suas reflexões tão maduras para sua pouca idade ecoam frequentemente na minha mente. Muito obrigada por compartilhar comigo sua história, isto é um verdadeiro privilégio para mim!

Agradeço à Paula Carneiro por ter tido um papel fundamental na minha vida e hoje me dá lições diárias sobre lealdade com uma consideração incondicional. Muito obrigada por sempre estar por perto e por me presentear constantemente com sua genialidade. Eu tenho muito orgulho de você.

Agradeço as minhas queridas amigas que a UFSCar me deu Caroline Franzoe e Flávia Trigo. Muito obrigada por estarem comigo desde a graduação e estarem perto mesmo com milhares de quilômetros nos separando algumas vezes. Vocês fazem parte do meu pretérito mais que perfeito!

Agradeço à Lidiane Pacheco e à Isabele Armênio por serem minhas fiéis escudeiras e minhas incansáveis confidentes. Quem diria que a pessoa que chegou para salvar meu penteado naquele desfile, tinha chegado pra ficar na minha vida...pra sempre? Muito obrigada pelo companheirismo desde os meus tempos de modelo e por todo carinho e cuidado comigo. A presença de vocês foi um verdadeiro bálsamo em meio ao caos semanal.

Agradeço à Camila Moretti por continuar comigo nesta jornada. Sua presença, sua *expertise* e sua maneira de olhar para mim transformam meu olhar para o mundo.

Agradeço ao Francisco Barruco por estar comigo desde o cursinho e praticamente me acompanhar durante toda minha vida acadêmica. Você estava lá quando tudo aconteceu e sou grata à vida por cada vez que nossos caminhos se cruzaram ao longo de todos esses anos. Você é tão admirável. Fran, eu tenho um orgulho absurdo de você. Obrigada pela sua amizade e acima de tudo, pela genuinidade da nossa conexão.

Agradeço ao Fernando Guimarães do CAISM por ser meu grande exemplo de ética e profissionalismo. Eu gostaria que você soubesse que eu levo suas palavras e ensinamentos sempre comigo...assim como a sua lapiseira da sorte que você gentilmente me “emprestou”, mesmo sabendo que era um empréstimo definitivo. Agradeço à Caroline Araújo e a Cláudia Tonetti por dividirem não só a bancada, mas muitos momentos especiais na pós-graduação. Muito obrigada por todo apoio e acima de tudo companheirismo, foi um prazer trabalhar com vocês.

Agradeço as minhas companheiras na época de implementação do Biobanco do CAISM Luciana Rezende e Jordana Martins. Nós trabalhamos muito duro para fazer isso acontecer e sou muito grata por ter vocês ao meu lado neste momento tão difícil e intenso. Vocês são demais meninas! Agradeço a Bruna Martins pelo carinho e amizade. Espero que você saiba que pode contar comigo independente de qualquer limite geográfico.

Agradeço à Andréia Porcari do Laboratório *Life Sciences Mass Spectrometry* por ter sido além de coorientadora, uma verdadeira mentora para mim. Agradeço imensamente pelas mais valiosas contribuições ao longo desse estudo. Agradeço ao Álex, Pedro, Lamartine e Junier por toda a parceria, vocês tem muita sorte por serem orientados por alguém tão genial. É uma satisfação enorme trabalhar com vocês.

Agradeço ao Maurício Sforça e a Silvana Rocco do Laboratório Nacional de Biociências - CNPEM pelo extremo profissionalismo e por estarem sempre prontos e atentos para compartilharem da enorme bagagem de *expertise* que possuem. Trabalhar ao lado de vocês foi uma das melhores partes de toda esta pesquisa e me sinto absolutamente privilegiada por ter contado com o apoio de vocês.

Agradeço à Tássia Brena, Melissa Quintero e à Buba do Instituto de Química - UNICAMP por todo apoio e suporte e por compartilharem comigo o enorme conhecimento em Metabolômica que possuem. A participação de vocês foi fundamental durante esse trabalho. Foi um prazer trabalhar com vocês.

Aos meus amigos mais que especiais que o Departamento de Tocoginecologia me deu: Mariana Maia (minha quase cunhada, amiga do coração), Guta (minha mais querida parceira

de pesquisa, de vida e confidente nas horas vagas), Camila Araújo (companheira nas aulas ministradas em inglês), Gláucia Varella (minha musa master, exemplo de pesquisadora, a qual eu tenho a honra de chamar de amiga), André Vieira (meu grande incentivador, meu maior parceiro de dança e de risadas), Odette Del Risco (nossa Cubaninha mais amada), Euller Carvalho (um verdadeiro *gentleman*, carisma que transborda), Samantha Condé (carioca linda da minha vida), Vilma Zotareli (exemplo de eficiência e dedicação), Elaine Garcia (simpatia em pessoa), Maira Pompeu (ah, você foi minha companheira de SOGESP e de todas as horas!) e Charles (nosso querido presidente).

Agradeço a todos os funcionários do CAISM, em especial ao Lúcio Gurgel por sempre ser tão prestativo e por pacientemente me ajudar eficientemente com todos problemas relacionados com TI e tudo mais que estivesse ao seu alcance. Eu não sei o que teria sido de mim sem você todos esses anos. Muito obrigada por absolutamente tudo! Agradeço aos funcionários da Biblioteca do CAISM, Claudinei que sempre estava atento e disposto a me ajudar com muita boa vontade e esmero e a Rosário que gentilmente reservava as salas para que eu pudesse assistir minhas aulas (e por vezes participava delas também!!rs).

Agradeço às secretárias da oncologia Regina e Débora por serem tão eficientes e terem sempre uma palavra de incentivo. Agradeço aos funcionários do Laboratório Clínicos Especializados por terem um papel essencial na minha vida acadêmica desde o meu mestrado. Muito obrigada Giuliana Moreno, Thaís Trento, Julis e Higor, eu realmente espero que vocês saibam o quanto são especiais pra mim. Agradeço ao estatístico Helymar por toda paciência e ensinamentos, ao Edmundo pela total eficiência e simpatia e pelo Júlio que sempre me recebia todos os dias com um enorme sorriso. Agradeço ao Ademir pelas palavras de carinho e pelas mensagens de bom dia que nunca falham! Agradeço a todos do Ambulatório de Mama e os funcionários do Laboratório de Patologia Especializada.

Agradeço à Rosana Poderoso da biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas por ser exemplo de profissional. Sempre extremamente ágil e competente. É sempre um prazer enorme trabalhar com você.

Agradeço ao Prof. Rodolfo Pacagnella por ser um exemplo de profissional em todos os aspectos a quem eu muito considero. Ao Prof. Erich de Paula que desde o mestrado me impressiona pelo profissional exímio que é, a quem eu tenho uma admiração profunda.

Agradeço ao Dr. Torres que sempre estava disposto a sanar minhas dúvidas e discutir casos após as reuniões da Mama ou pelos corredores do hospital. Sou muito grata por sempre estar pronto para compartilhar seu conhecimento e por ter vibrado comigo quando fui aceita no processo seletivo para meu doutorado internacional.

Agradeço às professoras Eliana Araújo e Maira Misko responsáveis pela Disciplina EN092 da turma ProFis. Eu não sei como externalizar o tamanho da minha gratidão por vocês terem me escolhido como PED. Esta oportunidade mudou minha vida e foi uma das experiências mais enriquecedoras da minha pós-graduação!

Agradeço em especial ao meu maior exemplo de professor que transitou com total maestria em todos os momentos do meu doutorado, principalmente nos momentos mais críticos: Dr. Gustavo Fraga, eu nunca me esquecerei de todas as lições que você me ensinou, sobretudo as morais e de solidariedade. Você é gigante!

Agradeço a todos os integrantes do grupo Madrepérola da Enactus UNICAMP e principalmente pelo Dr. Cássio Cardoso Filho que tão certeirairamente me abriu as portas para este projeto que hoje tenho o prazer de ser a líder BAB (*Business Advisory Board*). Eu não tenho palavras para descrever o quanto eu acredito nesse trabalho que tem como propósito maior estimular o empoderamento de mulheres que foram submetidas à mastectomia, por meio

da confecção de um sutiã mais bonito, confortável e acessível com um design diferente dos demais comercializados atualmente.

Agradeço ao Nicolas Van Veen pela participação essencial para que eu obtivesse êxito no TOEFL. Seus ensinamentos extrapolam qualquer desafio imposto pela língua inglesa e eu sou extremamente grata por você ter confiado e apostado no meu potencial, isto foi transformador pra mim! Não posso deixar de agradecer minhas professoras mais que especiais que eu tenho um privilégio enorme de ter aprendido tanto: Rebeca Peres, Mayara Ribeiro, Tiffany Andrade e Tábata da Silva, vocês fizeram isso acontecer!

Agradeço ao Pedro Garbes por ter sido o melhor mentor que eu poderia ter. Eu agradeço por ter aberto a porta dessa cidade tão extraordinária que é Boston. Obrigada por todas as lições que transcenderam toda e qualquer visão limitada do cosmo. Obrigada por ressaltar minhas potencialidades e por principalmente me fazer acreditar em cada uma delas.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Carles Arús, mi supervisor de la Universitat Autònoma de Barcelona, que prontamente remitió mi carta de motivación a la Dra. Ana Paula Candiota. Ella me enseñó que todos somos iguales, pero algunos de nosotros miramos hacia las estrellas. Muchas gracias por la extraordinaria oportunidad de recibirme en vuestro laboratorio. Elegí este grupo una vez y lo elegiría otras mil veces. Esta experiencia marcó un antes y un después en mi vida. Gracias por toda vuestra receptividad y por hacerme parte integral de este grupo que siempre llevaré conmigo: Pilar Calero-Pérez, Lucía Villamañan, Shuang Wu y Margarida Julià-Sapé, me habéis enseñado definitivamente que “la llar és on està el cor”.

Agradeço à Juliana Santos por ser tão companheira e essencial para execução do meu projeto, principalmente na parte *in vitro*. Muito obrigada por me guiar em um dos momentos mais difíceis do meu doutorado. Saiba que eu admiro muito sua lealdade e integridade. Você é realmente uma pesquisadora e sobretudo, uma mulher inspiradora.

I would like to thank my dear international supervisor Dr. Cheng for trusting the quality of my work and for accepting me to his laboratory at Harvard Medical School. The opportunity to do the last part of my Ph.D. with the team at Massachusetts General Hospital was transformative for me. I am grateful to Mara Lauer, Florian Rumpf, Shuyi Chen, Andrew Gusev, Tjada Schult, Felix Ehret, Anya Zhong, Matteo Sanchez-Dahl, Jian Weng, and Isabella Muti for having been with me at this very important stage in my life. Thanks to Julia Thierauf for being a real sister to me in Boston. I am very lucky to have been able to share my story and unforgettable moments with you.

Thanks to Susan Smith for being indescribably kind and for always going to great lengths to help me overcome any obstacles.

I want to thank my dear friend Karl Petri from the Department of Pathology for having introduced me to so much and for having experienced such special moments with me even in the restricted environment of the pandemic. Thank you for teaching me so much about German culture and for introducing me to your friends Lennart Schröder, Julian Grünewald, and Andrea Schmidts and Daniel Reichart, so that this cultural experience could be even more enriching. You made my stay in Boston much better than I could have imagined or asked for.

Agradeço à Maristela Onozato, que além de ser a única representante brasileira no nosso departamento, se tornou uma amiga muito querida. Eu nunca vou me esquecer de tudo o que você fez por mim, principalmente nos momentos mais difíceis. Você é uma pessoa muito especial para mim.

Agradeço ao Fernando Guastaldi por todos os mais valiosos conselhos que sempre prontamente me ofertou. Você é certamente uma das mentes mais brilhantes que eu já cruzei na minha vida além de sempre apresentar uma notável gentileza e educação. Fico muito feliz de

ter um pesquisador de tamanha excelência representando o nosso país. Obrigada por sempre estar presente, até mesmo nos momentos mais delicados, você foi um catalisador para eu ter chegado até aqui.

Thanks to John Vanderpool for being a very dear friend. Thank you very much for all the help you offered me at the time of my accident and for expediting my care at the hospital. Thank you so much for all the moments we shared together, for all the words of encouragement, and for always pushing me to work even harder than I thought I could. Thank you for always encouraging me to believe in myself. Your friendship and guidance are something I will cherish forever.

I am grateful to the International Institute of New England for the exceptional work they do with all their students. The support that transcended the classroom was essential for me to continue with my plan. Natalie Patalano, Sarah Nguyen, Yuka Chen, and Karen Frascello, you all changed my life in ways you can't even imagine.

Thanks to my dear professors, Nancy Gutmann and Vanitha Singh, and my colleagues from the English course I took at MIT. The moments we spent together were extremely uplifting for me and I will never forget the great affection you had towards me. I will take each of you and your incredible life stories with me as I enter the next chapter of my life.

Thanks to Katherine Hamilton for simply being a part of my life. You are one of the best people I have ever met. I will never have enough words that can express how important you are to me and how grateful I am for the countless times you have helped me by listening to me, encouraging me, and making the best muffins in the world! You are one of the best gifts that life has given me, and I just wish that we could continue to share every moment of our lives. I love you so much! <3

Agradeço ao Adilson Oliveira e ao Marcos Medeiros que estiveram comigo nos primeiros dias em Boston. Obrigada por todo carinho e receptividade.

Agradeço à Daniela Afonso e Regina Rodrigues que moraram comigo na minha primeira casa definitiva em Boston. Foi um prazer ter morado com pessoas tão íntegras e especiais. A história de vida de vocês é realmente inspiradora.

I am grateful to Dr. Justin Taylor of the University of Miami for giving me the opportunity to stay in his laboratory. This period was extremely valuable for me! Jumana Afaghani, Tulası Totiger, Felipe Beckedorff and Gabriel Gaidosh, meeting you all was an indescribable pleasure and honor. Monika Chojnacka, you are a real source of inspiration for me. You are very special, and I hope we are able to share many more moments together in the future. My doors in Boston, Brazil, or wherever I end up in the world, will always be open for you!

Agradeço ao Lucas Ferreira por ser a maior representação das improbabilidades que acontecem em probabilidades tão pequenas. Agradeço pelo espaço e pelo tempo. Pelo teto e pelo chão. Entre tantas chances que mal saberia estimar, fico feliz por termos nos topado agora, neste mesmo lugar.

Agradeço ao cirurgião plástico especialista em queimados Dr. Flavio Novaes pela extrema gentileza de ter me prestado total assistência durante a minha recuperação. Mesmo à distância, suas palavras e *expertise* me trouxeram conforto e segurança para enfrentar esse momento tão delicado e desafiador.

I also want to thank Nurse Iris at MGH Burn Associates for welcoming me and caring for me with such affection and professionalism. Your presence at my appointments was a real relief for me. Thank you so much for not only being an exemplary professional, but an exemplary person as well. I will always remember you.

Agradeço a todos os pacientes do Hospital Infantil Boldrini por todos os ensinamentos sobre como ser forte e resiliente mesmo em uma idade tão precoce e sobretudo, por me fazerem aprender muito mais do que eu ensino! Que vocês possam escrever seus próprios caminhos de acordo com os seus corações, que sussurram o tempo todo em seus ouvidos.

Agradeço a todas as pacientes do CAISM por fazerem me apaixonar pela força, pela gana e pela graça de cada uma delas e por serem responsáveis por manterem sempre viva a razão pela qual realizamos as nossas pesquisas.

Agradeço aos membros da minha banca examinadora que prontamente aceitaram meu convite para esse momento tão significativo. Cada um de vocês foi escolhido com total zelo, consideração e uma extrema admiração pela carreira irretocável que construíram. É um verdadeiro lisonjeio e privilégio ter uma banca de altíssimo nível na minha defesa de tese.

Agradeço à minha orientadora Sophie Derchain por todos os momentos que passamos juntas. Sua perspicácia, seu olhar atento e afiado foram fundamentais para que este trabalho fosse possível. Agradeço profundamente por tudo que aprendi com você e por todas as potencialidades que você ajudou a despertar em mim.

Por fim, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processos no 2016/07822-4 e 2019/04314-6 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo 303742-2018-6.

EPÍGRAFE

“De que valerão meus escritos

se outras não falarem

não se contarem

não dançarem

não se manifestarem

não protestarem

não se erguerem

De que valerão meus escritos

se eu me esquecer de direcioná-los

para aquelas que engolem silêncios a seco

que escondidas oram ao impossível

que no ônibus às cinco da manhã

fecham os olhos e sonham rumos

que focam em tapar os vergões

que nunca soltaram do peito os leões

que estão habituadas a vestir

inseguranças

Eu que agora tenho a voz audível

não falarei por ninguém

convidarei para virem ao meu lado

para não deixarem se apagar

ou desencorajar

De que valerão os meus escritos

se eu não convocá-las

se eu ignorar da onde vim

se eu parar em mim?”

Poema do livro "*Jamais peço desculpas por me derramar*".

RESUMO

Introdução: Os carcinomas de mama (CM) são classificados em tipos especiais e não especiais, segundo seu padrão morfológico; e em subtipos, segundo a expressão de receptores hormonais (RH), HER-2 e Ki67. Essa classificação permite uma melhor alocação em diversos regimes terapêuticos. Análises metabolômicas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectroscopia Massas (EM) no soro e tecidos de pacientes com CM especiais e não especiais, de diferentes subtipos, poderiam contribuir para a compreensão das vias metabólicas envolvidas no diagnóstico e na resistência à quimioterapia neoadjuvante (QTNeo). **Objetivos:** 1) Revisão integrativa da literatura para identificar os principais metabólitos envolvidos na carcinogênese e aquisição de resistência à quimioterapia em mulheres com carcinoma de mama, por RMN e EM citados na literatura até o ano de 2018. 2) Correlacionar o perfil lipídico do plasma obtido por EM e do tecido utilizando o *DESI-MSI* de mulheres com CM especial e não especial; comparar os biomarcadores determinados por EM em mulheres com CM e grupo controle. 3) Determinar a acurácia de um conjunto de metabólitos identificados por RMN no soro pré-quimioterapia na predição da resposta à QTNeo de mulheres com CM. **Sujeitos e Métodos:** Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP foram selecionadas amostras de tecido e soro das pacientes com CM arquivadas no Biobanco do CAISM-UNICAMP. Para o objetivo 2 foram selecionadas 28 amostras de tecidos e 20 de plasma de 24 mulheres com CM ductal especial e não especial e 22 amostras de plasma de mulheres sem carcinoma. A regressão logística de *LASSO* foi utilizada para identificar o CM. Para a análise não supervisionada, foi utilizado o *Principal Component Analysis* (PCA). Para a análise supervisionada através de *Support Vector Machine* (SVM), os dados foram divididos em um conjunto de treinamento e um conjunto de validação. Para o objetivo 3 foram selecionadas as amostras de sangue pré-tratamento de 80 mulheres com CM, submetidas à QTNeo. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o *software* R (v3.6.2) com o *epitools* para *odds ratio* (OR), funções básicas para comparação, o pacote *caret package* para *Recursive Feature Elimination* (RFE) e regressão logística. Normalização de dados, transformação e escalonamento foram realizadas usando o MetaboAnalyst 5.0. Intervalo de confiança de 95% e *p* valor <0,05 foram considerados estatisticamente significativas. **Resultados:** Estudo 2) O perfil lipídico do plasma detectado por EM e do tecido detectado por *DESI-MSI* puderam ser utilizados como métodos diagnósticos. Cada matriz teve sua assinatura molecular própria, e não houve interposição dessas assinaturas do plasma e do tecido na mesma paciente. Estudo 3) A análise por RMN não direcionada identificou e quantificou a abundância relativa de 28 compostos, incluindo 14 aminoácidos, carnitina e outros metabólitos. Ao estudar a abundância sérica do conjunto desses metabólitos, houve uma diferença significativa entre as concentrações de Leucina e Formato. **Conclusão:** Estudo 2) O perfil lipídico do plasma e do tecido puderam ser utilizados como métodos diagnósticos. Estudo 3) Quando o método de *RFE* e a regressão logística foram acoplados ao *status* do marcador clínico, um painel metabolômico simples pôde ser usado para auxiliar no prognóstico e na previsão clínica da resposta ao QTNeo de pacientes com CM.

Palavras-chave: Neoplasias da Mama; Espectroscopia de Ressonância Magnética; Resistência a Medicamentos; Metabolismo; Metabolômica não direcionada; Aprendizado de Máquina.

ABSTRACT

Introduction: Breast carcinomas (BC) are classified into special and non-special types, according to their morphological pattern; and in subtypes, according to the expression of hormone receptors (HR), HER-2 and Ki67. This classification allows a better assignment to different therapeutic regimens. Metabolomic analyses by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Mass Spectroscopy (MS) in the serum and tissues of patients with special and non-special BC of different subtypes, could contribute to understand metabolic pathways associated with diagnosis and resistance to neoadjuvant chemotherapy (NACT). **Objectives:** 1) Integrative literature review to identify the main metabolites associated with carcinogenesis and acquisition of chemotherapy resistance in women with BC, by NMR and MS, published until the year 2018. 2) Correlate the plasma lipid profile, obtained by MS, with the tissue profile, obtained by DESI-MSI, in women with special and non-special BC; and compare biomarkers found by MS in women with BC and control group. 3) Determine the accuracy, based on a set of metabolites identified by NMR in pre-chemotherapy serum, to predict the response to NACT in women with BC. **Subjects and Methods:** This project was approved by the UNICAMP Research Ethics Committee. Tissue and serum samples from BC patients were selected at the Biobank of the Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas (CAISM-UNICAMP). For the second study, 28 tissue samples and 20 plasma samples, from 24 women with special and non-special ductal BC subtype, and 22 plasma samples from healthy women were selected. LASSO logistic regression was utilized to identify the BC. Principal Component Analysis (PCA) was applied to unsupervised analysis. For the supervised analysis using a Support Vector Machine (SVM), data were divided into training and validation set. For the third study, pre-treatment blood samples from 80 women with BC who underwent NACT were selected. All statistical analyzes were performed using R software (v3.6.2) with epitools for odds ratio (OR), basic functions for comparison, caret package for Recursive Feature Elimination (RFE) and logistic regression. Data normalization, transformation and scaling were performed using MetaboAnalyst 5.0. The confidence interval used was 95% and p-value <0.05 were considered statistically significant. **Results:** Study 2) Both plasma lipid profile detected by MS and tissue lipid profile detected by DESI-MSI could be used as a diagnostic method. Each matrix had its own molecular signature, and there was no overlap of plasma and tissue signatures in the same patient. Study 3) Untargeted NMR analysis identified and quantified the relative abundance of 28 compounds, including 14 amino acids, carnitine and other metabolites. The serum abundance of the metabolites set presented significant difference between Leucine and Formate concentrations. **Conclusion:** Study 2) Both plasma and tissue lipid profile could be used as a diagnostic method. Study 3) When the RFE method and logistic regression were combined to clinical marker status, a simple metabolomic panel could aid in prognosis and clinical prediction of NACT response in BC patients.

Key-words: Breast Neoplasms; Magnetic Resonance Spectroscopy; Drug Resistance; Metabolism; Untargeted Metabolomics; Machine Learning.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	- Uma Dimensão
ATP	- Adenosina tri-fosfato
CAISM	- Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
CG-EM	- Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas
CL-EM	- Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massas
CM	- Carcinoma de Mama
CNPEM	- Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
CONEP	- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CPMG	- Carr – Purcell – Meiboom – Gill
CQ	- Controle de Qualidade
DESI-MS	- <i>Desorption Electrospray Ionization – Mass Spectrometry</i>
DESI-MSI	- <i>Desorption Electrospray Ionization – Mass Spectrometry Imaging</i>
EM	- Espectrometria de Massas
FIA-MS	- Análise de Injeção de Fluxo-Espectrometria de Massas
HER-2	- Receptores do fator de crescimento epidermal humano 2
Ki67	- Proteína nuclear associada à taxa de proliferação
LAPE	- Laboratório de Patologia Especializada
LASSO	- <i>Least Absolute Shrinkage and Selection Operator.</i>
LNBio	- Laboratório Nacional de Biociências
LOOCV	- <i>Leave-One-Out Cross-Validation</i>
MRM	- Monitoramento de Reação Múltipla
MSI	- <i>Mass Spectrometry Imaging</i>
OR	- <i>Odds Ratio</i>
PCA	- <i>Principal Component Analysis</i>
pCR	- <i>Pathologic Complete Response</i>
QTNeo	- Quimioterapia Neoadjuvante
RCB	- <i>Residual Cancer Burden</i>
RE	- Receptores de Estrógeno
RFE	- <i>Recursive Feature Elimination</i>
RH	- Receptores Hormonais
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
ROC	- <i>Receiver Operating Characteristic curve</i>
RP	- Receptores de Progesterona
SVM	- Máquina de Vetores de Suporte
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UNICAMP	- Universidade Estadual de Campinas
USF	- Universidade São Francisco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo Geral	24
2.2. Objetivos Específicos	24
3. MATERIAIS, SUJEITOS E MÉTODOS	25
3.1. Desenho do Estudo:	25
3.2. Tamanho Amostral:	25
3.3. Seleção dos sujeitos e coleta de tecido:	26
3.3.1. Critérios de inclusão	26
3.3.2. Critérios de exclusão	27
3.3.3. Critérios de descontinuação	27
3.4. Aspectos éticos:	27
3.5. Variáveis clínicas e patológicas:	28
3.6. Técnicas para análises Metabolômicas	28
3.6.1. Espectrometria de Massas direcionada (EM)	28
3.7. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	29
3.7.1. Aquisição dos espectros de ¹ H-RMN	30
3.8. Coleta de dados	30
3.9. Processamento e análise dos dados	31
4. RESULTADOS	34
4.1. Artigo 1: Publicado	35
4.2. Artigo 2: Publicado	51
4.3. Artigo 3: Submetido para publicação	74
5. DISCUSSÃO	96
6. CONCLUSÃO	100
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
8. ANEXOS	106
8.1. ANEXO I	106
8.2. ANEXO II	119
8.3. ANEXO III	123
8.4. ANEXO IV	126

1. INTRODUÇÃO

Câncer de Mama: Epidemiologia e Classificação

O carcinoma de mama (CM) é um problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. É o primeiro tipo de câncer mais comum em mulheres (excluindo o câncer de pele não melanoma), contabilizando 2.261.419 de novos casos em 2020, correspondendo a 24,5% dos cânceres em mulheres. Em 2020, foram registradas 684.996 mortes, o que corresponde a 13,6% da mortalidade entre todos os cânceres sem distinção de gênero (Sung *et al.*, 2021). No Brasil, o câncer de mama teve uma incidência de 66.280 casos em 2020, com uma mortalidade de 17.572 em 2018 (INCA, 2020). A taxa de mortalidade por câncer de mama varia nas diversas regiões do mundo e se justifica pelo estágio ao diagnóstico, qualidade do tratamento, prevalência dos diversos subtipos e pela resposta à terapia (Partridge *et al.*, 2016). O tratamento do câncer de mama inclui cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e terapia-alvo (Steding, 2016).

Devido à grande heterogeneidade do carcinoma invasivo de mama, tanto do ponto de vista biológico e molecular quanto na morfologia e imunohistoquímica, surgiu a necessidade de classificação em diversos subtipos. Cada subtipo apresenta diferente prognóstico e diferente resposta ao tratamento sistêmico (Esserman *et al.*, 2012). Tumores Luminais A, por exemplo, são caracterizados por apresentarem receptores hormonais (RH) positivos, incluindo receptores de estrogênio (RE) e alta expressão dos receptores de progesterona (RP). A expressão do receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER-2) é ausente e possui baixa taxa de proliferação (Ki67 < 20%). Além disso, respondem à terapia hormonal, apresentam uma sobrevida muito melhor do que mulheres com carcinoma de mama triplo negativo (RE e RP não expressos e HER-2 negativo). Por outro lado, tumores Luminais ou não Luminais que expressam HER-2 se beneficiarão com terapia alvo, Trastuzumab e Pertuzumab (Cancello *et al.*, 2013). E por fim, a expressão do Ki67, embora não consensual, pode ser um marcador de melhor resposta à quimioterapia (Cheang *et al.*, 2009; Goldhirsch *et al.*, 2011).

Os receptores hormonais estão presentes em cerca de 70% dos carcinomas de mama, representando os tumores luminais (Parker *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Morrison *et al.*, 2012). Apesar dos grandes esforços e novidades em relação ao tratamento do câncer de mama, um grande número de mulheres evoluiu com metástases após a terapia sistêmica. A

resistência a drogas é um desafio clínico permanente que mobiliza muitos pesquisadores na tentativa de encontrar novas drogas e novos marcadores associados a maior tempo livre de progressão e menor mortalidade. A resistência à quimioterapia pode ser inerente ao tumor ou adquirida por mutações consecutivas (Yardley, 2013). É interessante observar que mulheres que tiveram uma boa resposta à quimioterapia sistêmica de primeira linha, quando evoluem com metástases, mesmo modificando as drogas incluídas nos esquemas terapêuticos, progredem rapidamente (Jeselson *et al.*, 2015).

Perfil Metabólico e o Câncer

Por outro lado, para o surgimento do câncer é necessário um acúmulo de fatores que, em conjunto, contribuem para uma evolução clonal. Esses fatores poderiam ser agrupados em duas grandes categorias: ativação de proto-oncogenes (MYC, RAS, e/ou via do PI3K-AKT-mTOR, entre outros) que estimulam a proliferação celular e; mutação/inativação de genes supressores de tumor envolvidos na supressão de crescimento (RB, TP53), no controle do ciclo celular (CHEK2), reparo do DNA (BRCA1/2), ou sinalização de restrição de proliferação (PTEN). Quando essas alterações estão presentes nas células germinativas, o indivíduo afetado tem maior predisposição ao câncer. Entretanto, além dessas alterações genéticas, é necessária uma reprogramação metabólica das células cancerosas e do estroma adjacente. O modelo biológico atual da carcinogênese e resistência a drogas considera várias vias como proliferação celular, evasão dos mecanismos envolvidos na supressão de crescimento celular, resistência à morte celular, instabilidade genômica e mutações. Além disso, a replicação de células imortalizadas, a indução da angiogênese, ativação da invasão e de metástases, inflamação promovida pelo tumor e escape do sistema imunológico, são elementos que atribuem à reprogramação do metabolismo energético um papel preponderante (Hanahan *et al.*, 2011; Hanahan, 2014).

A avaliação das vias metabólicas permite uma maior compreensão dos modelos bioenergéticos das células tumorais. O perfil metabólico das células do câncer de mama é diferente do das células epiteliais mamárias normais, assim como o perfil metabólico das células do câncer de mama sensíveis a drogas é diferente do das resistentes (Shajahan-Haq *et al.*, 2015). As células humanas normais utilizam a glicose como fonte de energia na presença de oxigênio. A glicose metabolizada no citosol resulta na produção de piruvato que, após entrar na mitocôndria, onde é oxidado pelo ciclo de Krebs, culmina na geração de adenosina tri-fosfato

(ATP), principal fonte de armazenamento da energia celular. Entretanto, nas células cancerosas, mesmo em condições aeróbicas, a maior parte do piruvato é desviada da mitocôndria e, sob a ação da desidrogenase láctica (LDH/LDHA), gera lactato, processo tipicamente reservado para ambientes com pouco oxigênio. A produção de lactato na presença de oxigênio é denominada “efeito Warburg” ou glicólise aeróbica (Warburg *et al.*, 1927; Penkert *et al.*, 2016). De fato, observa-se que muitos cânceres humanos possuem um aumento da absorção e utilização da glicose (Penkert *et al.*, 2016). Esse consumo aumentado de glicose está associado com ativação de oncogenes (RAS e MYC) interferindo assim na proliferação e, mutação de genes supressores (TP53), na inativação da supressão do crescimento e atenuação da apoptose. Durante o crescimento neoplásico ocorre uma progressiva hipóxia resultante da ineficiência da neovascularização, levando a expressão de múltiplas enzimas relacionadas com a via glicolítica (Hanahan *et al.*, 2011). Além de fornecer energia e biomoléculas para as células cancerosas, o desvio glicolítico contribui para a comunicação célula a célula e assim, reforça a hipótese de uma simbiose entre as células cancerosas e o estroma adjacente (microambiente tumoral). No câncer, o lactato funciona como fonte de energia e de sinalização molecular, mimetizando mecanismos fisiológicos de alta performance anaeróbia. A complexidade do microambiente tumoral assim como as interconexões entre diferentes tipos de células dificultam a compreensão do circuito do lactato nos tumores (Marchiq *et al.*, 2016).

O Papel da Metabolômica no Câncer

A metabolômica surgiu como um método baseado na espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), com o objetivo de aumentar e complementar as informações obtidas pela genômica (medição semiquantitativa da expressão) e pela proteômica (medição semiquantitativa de proteínas celulares) no estudo da resposta de sistemas vivos a processos fisiopatológicos, com a vantagem de que a metabolômica trabalha com a detecção, identificação e quantificação de mudanças metabólicas em um sistema biológico integrado, através da análise do metaboloma, ou seja, o conjunto de todos os metabólitos (moléculas pequenas) presentes em uma amostra biológica (Nicholson *et al.*, 1999). Este conceito surgiu a partir de estudos da composição metabólica de biofluidos, tecidos e células por RMN de ^1H e técnicas de reconhecimento de padrão e conhecimento do processo de homeostase. As alterações na composição dos metabólitos endógenos envolvidos em rotas celulares importantes causadas por doenças, drogas ou toxinas possuem um impacto direto. Outrossim, uma vez que

esses metabólitos estão em equilíbrio dinâmico com as células e tecidos internos, o ajuste metabólico é necessário para manter o ambiente interno constante (Lindon *et al.*, 2000; Lindon *et al.*, 2003).

Atuais Abordagens Metabolômicas

A metabolômica utiliza essencialmente duas abordagens: uma direcionada (*targeted*) e outra não direcionada (*untargeted*). A metabolômica *targeted* objetiva identificar uma via ou um metabólito de interesse, baseado no conhecimento prévio do envolvimento de determinada via ou metabólito na composição do metaboloma da amostra investigada. Já a abordagem *untargeted* procura identificar e quantificar o maior número possível de metabólitos em uma amostra e esta foi a abordagem utilizada neste estudo. Dentre as principais técnicas empregadas em estudos metabolômicos, estão a Espectrometria de Massas (EM) que pode estar acoplada a técnicas de separação como a cromatografia líquida (CL-EM) ou gasosa (CG-EM), assim como a RMN já citada anteriormente (Peterson *et al.*, 2016). A RMN apresenta como principais vantagens ser altamente reprodutível, quantitativa, custo relativamente baixo, e fornece informações estruturais que permitem a identificação acurada do metabólito. Trata-se de uma técnica não destrutiva e que não necessita de tratamentos físicos ou químicos antecedentes à análise, evitando perda de alguns metabólitos e permite a utilização da amostra para outros fins. Além disso, não utiliza radiação ionizante, conferindo grande vantagem para aplicações em amostras sensíveis ou em organismos vivos (Dettmer *et al.*, 2007; Lindon *et al.*, 2007).

A abordagem metabolômica por RMN é o estudo quantitativo de processos metabólicos em sistemas biológicos baseado em dados e análise estatística multivariada. Os dados bioquímicos obtidos e interpretados utilizando essa abordagem fornecem uma perspectiva mais abrangente dos processos patológicos do que aquela obtida com base em marcadores biológicos isolados. A metabolômica vem contribuir no diagnóstico ou tratamento do câncer de mama como ensaio composto ou derivado de medidas moleculares e interpretadas por modelos computacionais específicos de maneira a produzir um resultado clinicamente relevante: um teste baseado em metabolômica deverá estar associado com fenótipo de interesse, tais como os diferentes subtipos de carcinoma de mama, evolução clínica ou avaliação pré-clínica da terapêutica a ser utilizada (Marchiq *et al.*, 2016).

A EM é uma técnica bastante apropriada para a análise metabolômica, por ser rápida, sensível e fornecer informações estruturais sobre as moléculas de interesse. É uma técnica analítica que utiliza campos elétricos e/ou magnéticos para controlar as trajetórias de íons em fase gasosa e assim obter sua razão massa/carga (m/z), no vácuo, para diferenciá-los (Badu-Tawiah *et al.*, 2013). A hifenização a outras técnicas analíticas de separação como a cromatografia líquida (CL), cromatografia gasosa (CG) e eletroforese capilar também fornecem uma dimensão ortogonal à medida da razão m/z , podendo auxiliar na identificação e caracterização de metabólitos, sendo bastante empregada para este fim (Gowda *et al.*, 2014). Um conjunto específico de técnicas de EM, chamada de espectrometria de massas ambiente (Germano *et al.*, 2009), consiste em técnicas que se baseiam na análise direta de amostras, com pouco ou nenhum preparo das mesmas, em ambiente aberto, livre de vácuo. A principal representante deste grupo é a técnica de *DESI-MS* (*Desorption Electrospray Ionization – Mass Spectrometry*) (Shajahan-Haq *et al.*, 2015), onde um jato de solvente carregado com potencial elétrico é direcionado à superfície da amostra intacta. Esse solvente carregado é capaz de dessorver as moléculas da superfície, bem como ionizá-las, permitindo sua detecção pelo espectrômetro de massas. *DESI-MS* vem sendo aplicado com sucesso na análise de um subconjunto metabolômico: o perfil lipídico. Estas análises são aplicadas em tecidos animais (Denkert *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2015; Hart *et al.*, 2017), colônias de bactérias (Scalbert *et al.*, 2009), tecidos vegetais (Scalbert *et al.*, 2009; Clendinen *et al.*, 2017), entre outros (Gorrochategui *et al.*, 2016). Ao monitorar o perfil químico de uma superfície em conjunto com sua informação espacial (coordenadas x e y), é possível gerar imagens químicas das amostras analisadas, observando as diferentes composições de íons nas diferentes regiões da amostra. Este tipo de análise, aliada à análise histopatológica, foi empregada com sucesso para determinação e classificação de gliomas, incluindo oligodendroglioma, astrocitoma, e oligoastrocitoma, de diferentes graus histológicos e contendo diferentes concentrações de células tumorais em ambiente intraoperatório (Badu-Tawiah *et al.*, 2013). Outros tipos de tecidos foram investigados utilizando a abordagem de *MSI* (*Mass Spectrometry Imaging*) (Gowda *et al.*, 2014), como é o caso da análise de tumores de próstata (Wei *et al.*, 2013), placas arteroescleróticas (Jove *et al.*, 2017), cristalino dos olhos (Porcari *et al.*, 2018), tumores de rins (Porcari *et al.*, 2018), e tumor de bexiga (Bemis *et al.*, 2015).

Metabolômica e o Câncer de Mama

Para identificar e compreender os vários estudos publicados para embasar esta tese, publicamos uma revisão da literatura incluindo experimentos *in vitro* e *in vivo* referentes a diagnóstico e quimiorresistência do câncer de mama (Cardoso *et al.*, 2018). Essa revisão, que inclui artigos publicados sobre o tema e compõem o primeiro artigo desta tese avaliou como as abordagens metabolômicas recentes contribuíram para a compreensão da relação entre o câncer de mama, carcinogênese e a aquisição de resistência ao tratamento. Focamos nas vantagens e desafios do tratamento do câncer e no uso de novas estratégias no atendimento clínico, o que nos ajuda a compreender a resistência aos medicamentos e prever as respostas ao tratamento. Identificamos que poucos estudos incluíam a utilização da técnica direcionada de EM em complementaridade com as técnicas RMN não direcionada o que motivou a realização de dois estudos complementares com objetivos de diagnóstico de câncer de mama em plasma e soro e identificação de quimiorresistência em mulheres com câncer de mama. Acreditamos que a utilização dessas duas técnicas, em amostras de mulheres brasileiras com câncer de mama, irá trazer novos conhecimentos na detecção de biomarcadores por meio da abordagem metabolômica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a acurácia da metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear e/ou da Espectrometria de Massas no diagnóstico de carcinoma de mama e dos seus diferentes subtipos, assim como na predição de quimiorresistência.

2.2. Objetivos Específicos

- 1: Identificar os principais metabólitos envolvidos na carcinogênese e aquisição de resistência à quimioterapia em mulheres com carcinoma de mama, por RMN e EM citados na literatura.
- 2: Correlacionar o perfil lipídico do plasma obtido por CL-EM com aquele encontrado no tecido utilizando a abordagem de *DESI-MSI (Desorption Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Imaging)* de mulheres com carcinoma de mama especial e não especial e comparar os marcadores plasmáticos determinados por CL-EM em mulheres com e sem carcinoma mama.
- 3: Quantificar por RMN os principais metabólitos encontrados no soro de mulheres com carcinoma de mama coletado antes da Quimioterapia Neoadjuvante (QTNeo) associados ou não à expressão dos receptores hormonais; identificar metabólitos associados a quimiorresistência e avaliar a acurácia de diversos modelos incluindo os metabólitos e os marcadores imunohistoquímicos (RH, HER-2 e Ki67) como modelo preditivo de quimiorresistência.

Cada objetivo específico será apresentado na forma de um artigo.

3. MATERIAIS, SUJEITOS E MÉTODOS

A Metodologia será explicada conforme cada objetivo específico.

3.1. Desenho do Estudo

Trata-se de 1) Revisão da literatura, 2) Estudo de corte transversal de mulheres com carcinoma de mama submetidas a biópsia e cirurgia *up-front* e 3) Coorte prospectiva de mulheres com carcinoma de mama submetidas à QTNeo.

3.2. Tamanho Amostral

Para os estudos:

1) A seleção dos artigos para a revisão integrativa da literatura foi feita a partir do levantamento da bibliografia em língua inglesa considerando-se as palavras-chaves: “*Metabolomic*”, “*Breast Cancer*” e “*Drug Resistance*”. Foram integrados todos os artigos originais publicados entre os anos de 2011 e 2017.

2) Estudo piloto que incluiu 28 amostras de tecidos e 20 amostras de plasma, de 24 mulheres com carcinoma de mama ductal de subtipos especial e não especial, e 22 amostras de plasma de mulheres saudáveis.

3) Estudo de coorte que incluiu 80 mulheres com diferentes subtipos de CM submetidas à QTNeo.

3.3. Seleção dos sujeitos e coleta de tecido

Para os estudos 2 e 3:

Foram realizadas as coletas de amostras de tecido e sangue seguindo o protocolo do Biobanco. Todas as mulheres com carcinoma de mama atendidas no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), Hospital Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), foram submetidas à biópsia para retirada de amostra de tecido sob visão ultrassonográfica para fins de diagnóstico. Uma amostra foi armazenada no Biobanco. Para as que aceitaram o convite, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi lido, explicado e assinado. Após coleta, o material biológico foi arquivado no Biobanco do CAISM (CONEP B-056), como parte da rotina estabelecida no hospital. O Biobanco localiza-se no Laboratório de Patologia Especializada – LAPE – CAISM/UNICAMP, sob cuidados do patologista responsável (autorização para desenvolvimento do projeto: ANEXO I).

As mulheres com carcinoma de mama incluídas nestes estudos foram mulheres que ainda não haviam recebido nenhum tratamento e mulheres submetidas à QTNeo e cirurgia seguindo o protocolo do serviço. Após o tratamento, as mulheres foram acompanhadas nos ambulatorios do CAISM.

3.3.1. Critérios de inclusão

Foram incluídas em uma amostra de conveniência tecidos e sangue de mulheres com diagnóstico de carcinoma de mama invasivo, e sangue de mulheres com carcinoma de mama submetidas à QTNeo com tecido adequado para estudos histopatológico e imunohistoquímico, atendidas no período de janeiro 2017 a janeiro 2019.

3.3.2. Critérios de exclusão

Foram excluídas mulheres com antecedente pessoal de carcinoma de mama ou de quimioterapia por outra neoplasia e gestantes. Todas as mulheres que optaram por serem reconsentidas no momento da assinatura do TCLE.

3.3.3. Critérios de descontinuação

Para o estudo realizado em mulheres submetidas à QTNeo, foram excluídas durante o estudo as pacientes que iniciaram a quimioterapia e evoluíram para óbito antes da cirurgia ou não puderam ser operadas.

3.4. Aspectos éticos

Todas as mulheres incluídas nestes estudos aceitaram participar e coletar material para o Biobanco do CAISM (CONEP B-056), com o TCLE assinado. Adicionalmente, o material armazenado nesse Biobanco só pôde ser utilizado para esta pesquisa após análise e autorização pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pró-Reitoria de Pesquisa da UNICAMP CAAE nº 69699717.0.0000.5404 sob Número do Parecer: 2.203.692 em 06 de Agosto de 2017, CEP-UNICAMP com emenda em 08 de Novembro de 2018 sob Número do Parecer: 3.008.079 (ANEXO 1 E 2). As mulheres do grupo controle também assinaram o TCLE antes de serem incluídas no estudo aprovado pelo CEP-Universidade São Francisco (CAAE # 25222619.4.0000.5514, 13/12/2019, CEP-USF) (ANEXO 3). O estudo seguiu as recomendações do *Guiding Medical Doctors in Biomedical Research Involving Human Subjects*, da declaração de Helsinque (Declaração de Helsinque III, 1997) e da resolução 441/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

3.5. Variáveis clínicas e patológicas:

Os dados clínicos e do tumor foram obtidos pelo prontuário das mulheres. Foram avaliados: idade, estado menopausal, utilização de terapia hormonal pregressa, raça autodeclarada, idade da menarca, uso de terapia de reposição hormonal, número de gestações, partos e abortos, lactação, tabagismo, alcoolismo, índice de massa corpórea, hipertensão, diabetes, hipotireoidismo, história familiar de câncer de mama e/ou ovário. Em relação à doença, foram avaliados: grau histológico de *Nottingham*, receptores hormonais, HER-2, Ki67, tamanho do tumor clínico, linfonodos axilares, metástases, tipo e subtipo histológico.

A resposta patológica foi baseada na ferramenta *online* “*Breast Cancer Residual Cancer Burden Calculator – MD Anderson Cancer Center*”, para avaliação de doença residual pós QTNeo, classificado em quatro categorias: Resposta Patológica Completa (pCR); RCB-I (doença residual mínima); RCB-II (doença residual moderada) e RCB-III (doença residual extensa) (Symmans *et al.*, 2007; Bossuyt *et al.*, 2015).

3.6. Técnicas para análises Metabolômicas

3.6.1. Espectrometria de Massas direcionada (EM)

Preparação de Amostra de Plasma e Tecido

Antes de serem extraídas, as amostras de plasma foram divididas em alíquotas (5µL) para formar um *pool* de amostra e posteriormente redistribuídas em amostras de controle de qualidade (CQ). Um grupo de 10 amostras de CQ foi usado para estabilizar o método no momento da análise e uma amostra de CQ foi injetada a cada dez amostras para correção adicional de variações instrumentais durante a análise. Novas alíquotas (75µL) de cada amostra foram colocadas individualmente em um microtubo. Metanol gelado (150µL) contendo padrão interno (uma mistura de aminoácidos marcados isotopicamente e acilcarnitinas, NSK-A e NSK-B, *Cambridge Isotope Laboratories*, diluído em metanol 1:200, v/v, de acordo com as instruções do fabricante) foi usado para precipitação de proteínas. As amostras foram agitadas

(10 segundos), submetidas à uma mesa agitadora (10 minutos) e centrifugadas (13.000 RPM, à 4°C, 15 minutos). O sobrenadante (75µL) foi transferido para outro microtubo, seco sob N₂ e mantido à -20°C até o momento da análise. As amostras foram ressuspensas em 150µL de solução de acetonitrila (ACN) (ACN: H₂O, 1:1 v/v), colocadas em frasco de vidro e submetidas à análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção por Espectrometria de Massas.

Análise de Injeção de Fluxo-EM (FIA-MS)

Para a análise FIA-MS, foi usado um sistema Xevo TQD (Waters) operando no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM). Um HPLC Sil 20A (Shimadzu) foi usado para injeção de amostra. Foi usada a fase móvel isocrática (H₂O: ACN: ácido fórmico, 80: 20: 0,1 v/v/v). O gradiente de fluxo iniciou em 0,01mL min⁻¹ até 0,5 min e foi mantido em 0,5mL min⁻¹ de 0,51 a 3,5 min, e então voltou a 0,01mL min⁻¹ até 4 min. Utilizou-se a fonte de ionização por eletrospray, operando com os seguintes parâmetros: voltagem capilar de 3,0 kV, voltagem do cone de extração de 3,00 V, temperatura da fonte de 150°C, temperatura de dessolvatação de 500°C e vazão de 850L h⁻¹ do gás de dessolvatação. A energia de colisão e a voltagem do cone para os canais MRM foram otimizadas com base nos compostos para os quais os padrões estavam disponíveis, e de acordo com sua similaridade química para aqueles sem padrão disponível. O software TargetLynx (Waters) foi usado para processamento de dados e calibração. As áreas de pico obtidas após a integração foram exportadas para um arquivo de planilha Excel[®] (Microsoft, Redmond, EUA). Além disso, o conjunto de dados foi submetido a análise estatística.

3.7. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Preparação de Amostra de Soro

As amostras de soro foram descongeladas até atingirem temperatura ambiente antes da análise. Ao soro (400µL) foram adicionados 200µL de água deuterada D₂O (0.03% de TSP)

sendo esta solução, gentilmente misturada, e transferida para o tubo de 5 mm RMN (Norell® Standard Series TM 5 mm, Sigma-Aldrich®) para aquisição espectral.

3.7.1. Aquisição dos espectros de ^1H -RMN

A análise metabolômica foi realizada por meio da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear. Os espectros foram adquiridos no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), integrante do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas – Brasil, utilizando-se um espectrômetro INOVA® (Agilent Technologies® Inc., Santa Clara, EUA) equipado com sonda criogênica de tripla ressonância e operando a uma frequência de ressonância de ^1H a 599.887 MHz. As aquisições foram conduzidas utilizando sequência de pulso 1D CPMG (Carr – Purcell – Meiboom – Gill) otimizada para supressão do sinal da água. Os espectros foram adquiridos com 128 repetições, número de pontos igual a 38k e largura de varredura espectral de 16 ppm; tempo de aquisição de 4 segundos; e tempo de espera de 4 segundos; a filtragem T2 teve tempo de eco de 300 μs repetido 166 vezes, sendo que a duração total de tempo de eco efetivo foi de 50 ms.

Os metabólitos foram processados utilizando-se o *software* Chenomx® NMR Suite versão 8.1 (Chenomx Inc™, Edmonton, AB, Canada). O módulo “*Processor*” deste software foi usado para ajustar a fase, e a correção de linha base. Uma função de “*line-broadening*” de 0,5 Hz foi aplicada aos espectros e a região de sinal da água foi retirada. Os espectros foram individualmente transferidos para o módulo “*Profiling*” para a identificação dos metabólitos de acordo com a base de dados do Chenomx e levando em consideração os deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamentos específicos para cada metabólito, os quais foram posteriormente exportados para o Excel® e normalizados.

3.8. Coleta de dados

A coleta do material biológico de mulheres com carcinoma de mama para o Biobanco do CAISM-UNICAMP (CONEP B-056) é uma rotina estabelecida no hospital. Deste modo, neste projeto de pesquisa, a pesquisadora utilizou apenas as amostras armazenadas no Biobanco após as mulheres terem aceitado ceder o material de origem biológica do componente

sólido do sangue, (soro e plasma) e assinarem o TCLE do Biobanco do CAISM-UNICAMP (CONEP B-056) durante a realização da pesquisa. Não foi realizada nenhuma coleta adicional.

A coleta do material biológico das mulheres com carcinoma de mama foi realizada no momento da consulta como caso novo ou retorno. Foram coletados 2 tubos de amostra de sangue pelas enfermeiras do Ambulatório de Mama, no Ambulatório de Oncologia Clínica ou Unidade de Internação de Oncologia Clínica e Cirúrgica do CAISM-UNICAMP: um tubo de EDTA e um tubo seco. Para armazenamento e processamento do material biológico no Biobanco, a amostra foi encaminhada ao LAPE (CAISM-UNICAMP), aos cuidados do patologista responsável. A indicação do tratamento foi realizada de acordo com protocolo assistencial do serviço e esse projeto não interferiu na conduta clínica. A busca de reações adversas em mulheres submetidas a quimioterapia com Adriamicina e Taxol, foram investigadas durante a realização da quimioterapia e por prontuário médico.

3.9. Processamento e análise dos dados

Os dados coletados utilizando-se o prontuário *online* das mulheres selecionadas, associados aos dados dos resultados da revisão histopatológica dos diagnósticos e dos exames metabolômicos foram compilados numa planilha de dados de Excel[®].

Para a análise dos dados obtidos por EM, foram extraídos do tecido as áreas de interesse das imagens de íons usando o *software* MSiReader (Bokhart *et al.*, 2018). O pré-processamento dos dados foi realizado de acordo com Porcari *et al.*, 2018. O modelo de regressão logística gerado anteriormente com regularização LASSO foi usado para prever amostras de tecido de acordo com a presença de carcinoma de mama, *status* do RE e *status* do RP. Para análise de plasma, a lista de cromatogramas de íons extraídos por tempo de retenção foi enviada para a plataforma *web* MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>). Os dados foram normalizados por soma e escalonados automaticamente. Os íons detectados em pelo menos 10% das amostras foram retidos para análise. Comparações foram realizadas do caso contra os grupos de controle. Para a análise não supervisionada, foi utilizada a *Principal Component Analysis (PCA)*. Para a análise supervisionada por meio de *Support Vector Machine (SVM)*, os dados foram divididos em um conjunto de treinamento (70% das amostras) e um conjunto de validação (30% das amostras). O conjunto de treinamento foi composto por plasma de 14 mulheres com carcinoma de mama e pelo plasma de 15 mulheres saudáveis, enquanto o

conjunto de validação foi composto por plasma de 6 mulheres com carcinoma de mama e 7 mulheres saudáveis. Foi utilizado o módulo de análise de biomarcador fornecido pela plataforma *web* MetaboAnalyst e os dados carregados na forma de uma tabela contendo a lista de cromatogramas de íons extraídos por tempo de retenção e o rótulo do grupo para 70% das amostras. Trinta por cento das amostras não tinham rótulo de grupo (amostras de teste). Os mesmos parâmetros usados para *PCA* foram escolhidos para filtragem, normalização e escalonamento dos dados. O método de classificação foi *SVM* linear, enquanto o método de classificação de recurso selecionado foi *SVM* integrado. Para avaliar o conjunto de teste, os 10 principais recursos com maior área sob o valor da curva *ROC* (*Receiver Operating Characteristic*) foram selecionados para compor o modelo *SVM* final, que foi usado para classificar e fornecer a probabilidade média de classificação correta para cada amostra de teste. Para investigar se os biomarcadores validados como discriminatórios para análise de tecido também poderiam ser preditivos no plasma, os biomarcadores de tecido detectados no plasma foram usados para construir um modelo de *PCA*. Dessa forma, avaliou-se seu poder discriminatório em relação às amostras de plasma dos grupos caso e controle.

Para análise dos dados obtidos por RMN, todos os cálculos estatísticos foram realizados usando o *R Project for Statistical Computing* (v3.6.2) usando o pacote de *epitools* para cálculo de *odds ratio* (*OR*) (Brown *et al.*, 2001). As funções “básicas” de *R* foram usadas para comparação de média, usando o teste de Mann-Whitney-Wilcoxon ou o teste *t* em função de ser uma distribuição normal comprovada com o teste de Shapiro. O pacote *caret* foi usado para regressão logística e para aplicar a *Recursive Feature Elimination* (*RFE*) (Kuhn, 2021). A normalização, transformação e escalonamento dos dados foram realizados usando o Metabonalyst 5.0 (Pang *et al.*, 2021). Um modelo de regressão logística foi construído com o objetivo de classificar mulheres sensíveis e resistentes com base em seu painel de metabólitos determinado por RMN e as informações clínicas relacionadas aos *status* de RH, Ki67 e HER-2. O *RFE* foi aplicado para eliminação contínua de características (ou seja, metabólitos ou marcadores moleculares) com baixa contribuição para o modelo (Guyon *et al.*, 2002; Guan *et al.*, 2009; Sheng *et al.*, 2020). A tabela de dados foi normalizada por soma, e as variáveis com valores quase constantes foram detectadas e removidas usando a filtragem de intervalo interquartil. Os modelos foram construídos com base em um conjunto de treinamento composto por 75% dos dados. Para avaliar o desempenho dos modelos, realizamos a *Leave-One-Out Cross-Validation* (*LOOCV*). A área sob a curva da curva *ROC* para as características selecionadas também foi usada para avaliar seu poder de predição. Um conjunto de validação

compreendendo 25% dos dados também foi usado para avaliação de desempenho de sensibilidade, especificidade e precisão (Murata *et al.*,2019). Por meio da plataforma *web* MetaboAnalyst™, utilizamos a Biblioteca KEGG para enriquecimento quantitativo de um *pool* de metabólitos e as vias com um valor de $p < 0,05$ serão discutidas posteriormente.

4. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em forma de artigo para cada objetivo específico proposto respectivamente:

4.1. Artigo 1: Publicado

Cardoso MR, Santos JC, Ribeiro ML, Talarico MCR, Viana LR, Derchain SFM. *A Metabolomic Approach to Predict Breast Cancer Behavior and Chemotherapy Response*. *Int J Mol Sci*. 2018 Feb 21;19(2):617. doi: 10.3390/ijms19020617. PMID: 29466297.

4.2. Artigo 2: Publicado

Silva AAR, Cardoso MR, Rezende LM, Lin JQ, Guimaraes F, Silva GRP, Murgu M, Priolli DG, Eberlin MN, Tata A, Eberlin LS, Derchain SFM, Porcari AM. *Multiplatform Investigation of Plasma and Tissue Lipid Signatures of Breast Cancer Using Mass Spectrometry Tools*. *Int J Mol Sci*. 2020 May 20;21(10):3611. doi: 10.3390/ijms21103611. PMID: 32443844.

4.3. Artigo 3: Submetido para publicação

Cardoso MR, Silva AAR, Talarico MCR., Godoy P, Sforca ML, Rocco SA, Resende LM, Costa TBBC, Viana LR, Canevarollo RR, Mendes FMM, Ferracini AC, Ramalho S, Marrero J, Guimaraes F, Tasic L, Tata A, Sarian LO, Cheng LL, Porcari AM, Derchain SFM. *¹H-NMR serum metabolome combined with machine learning predicts the response to neoadjuvant chemotherapy in women with Breast Cancer*.



Review

A Metabolomic Approach to Predict Breast Cancer Behavior and Chemotherapy Response

Marcella Regina Cardoso ¹, Juliana Carvalho Santos ^{1,*}, Marcelo Lima Ribeiro ²,
Maria Cecília Ramiro Talarico ¹, Lais Rosa Viana ¹ and Sophie Françoise Mauricette Derchain ¹

¹ Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti—Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo 13083-881, Brazil; macardoso86@hotmail.com (M.R.C.); mcecilia_r@hotmail.com (M.C.R.T.); lala.viana311088@gmail.com (L.R.V.); sophie.derchain@gmail.com (S.F.M.D.)

² Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit, São Francisco University, Bragança Paulista, São Paulo 13083-881, Brazil; marcelo.ribeiro@usf.edu.br

* Correspondence: santos.j.c@outlook.com; Tel.: +55-(11)-997-661-068

Received: 30 November 2017; Accepted: 31 January 2018; Published: 21 February 2018

Abstract: Although the classification of breast carcinomas into molecular or immunohistochemical subtypes has contributed to a better categorization of women into different therapeutic regimens, breast cancer nevertheless still progresses or recurs in a remarkable number of patients. Identifying women who would benefit from chemotherapy could potentially increase treatment effectiveness, which has important implications for long-term survival. Metabolomic analyses of fluids and tissues from cancer patients improve our knowledge of the reprogramming of metabolic pathways involved in resistance to chemotherapy. This review evaluates how recent metabolomic approaches have contributed to understanding the relationship between breast cancer and the acquisition of resistance. We focus on the advantages and challenges of cancer treatment and the use of new strategies in clinical care, which helps us comprehend drug resistance and predict responses to treatment.

Keywords: breast cancer; drug resistance; metabolomics

1. Introduction

Breast cancer is a worldwide public health problem in both developed and developing nations. It is the second most common cancer in women, with an estimated 1.7 million invasive breast cancer cases and 521,900 deaths in 2012 [1]. The death rate associated with breast cancer varies in different regions, depending on the diagnosis stage, treatment quality, prevalence of various subtypes, and therapy effectiveness [2,3]. Breast cancer treatments include surgery, radiation therapy, chemotherapy, hormone therapy, and targeted therapy [4–6].

The main obstacle that arises from the treatment of any cancer with chemotherapeutic drugs is the development of resistance. Chemoresistance enables cancer cells to survive drug attack and proliferate uncontrollably, which may lead to strong metastatic potential and disease progression [7–12]. Cancer cells can be intrinsically resistant to first-line chemotherapeutic agents or acquire resistance during treatment after long-term drug exposure [4,13].

Long-term survival rates related to breast cancer are directly correlated to early detection of disease. Thus, more sensitive biomarkers capable of detecting earlier stages of disease may contribute to the identification of molecular targets necessary for successful treatment [14]. Metabolomics has emerged as a new approach to identify and characterize biomarkers, which analyzes metabolites associated with disease from biofluids and tissues [15].

The metabolomic approach can be applied using techniques such as nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS), which offer information about a large number of metabolites

through a multivariate statistical analysis. This approach allows the comparison of metabolite levels between healthy individuals and patients with diseases such as cancer [16,17]. Metabolomic analysis is used for early disease diagnosis, nutritional studies, toxicity analysis, and the evaluation of drug action, as well as studying the acquisition of resistance to chemotherapy [18]. Metabolites are final byproducts derived from the interaction between intracellular pathways and their microenvironment [19]. It has been proposed that the evaluation of a metabolite profile might allow the understanding of biochemical processes that occurred, or were occurring, at the time of breast cancer diagnosis [13,20,21]. Additionally, in the field of chemoresistance, developing sensitive prognostic tools is important to characterize the patient as an individual and to customize treatment with specific strategies aimed to maximize the drug action [22,23]. This review discusses advances in metabolomics approaches that help understand the relationship between disease and the acquisition of resistance to treatment, with a particular focus on breast cancer.

2. Breast Cancer Treatment According to Histological Subtype

Breast cancer is a heterogeneous disease classified into several biological, molecular, and histological subtypes that demonstrate variable prognoses and responses to chemotherapy [24]. Genetically, it can be classified into hierarchical clusters of intrinsic subtypes that have particular tumor characteristics and clinical evolution: basal, luminal A, luminal B, human epidermal growth factor receptor 2 overexpressed (HER2+), and normal [25,26]. Several commercially available tests, including prediction analysis of microarray 50 (PAM50), classify breast carcinomas into the five intrinsic subtypes [27,28]. However, other biological methods can be used for categorization, such as the reverse phase protein array based on the expression of 171 cancer-related proteins, which defines the subtypes of breast cancer as basal, HER2, luminal A, and luminal A/B. Additionally, the potentially novel protein-defined subgroups reactive I and reactive II have been identified as associated with the expression of proteins likely found in the microenvironment and/or active cancer fibroblasts around the carcinoma [29].

In clinical practice, the method for breast carcinoma classification is based on the immunohistochemical assessment of estrogen (ER), progesterone receptor (PR), and Ki67, as well as reflex fluorescence in situ hybridization of HER2 expression [30]. The luminal A subtype demonstrates strong expression of ER and PR, does not express HER2, and has low Ki67 expression, while the luminal B subtype expresses ER, high levels of Ki67, and may express PR. Tumors expressing ER and positive for HER2 are also classified into this subtype [31]. Typically, luminal subtypes have a better prognosis than non-luminal subtypes, while the luminal A subtype has a better prognosis than luminal B largely because cases of the latter have an imprecise prognosis and poor response to treatment [32]. The luminal A subtype is more common in older women who show a better response to hormone therapy and an intermediate response to chemotherapy [28,33,34]. Luminal B/HER2-positive cases have the worst prognosis and a higher incidence among young women compared with luminal B/HER2-negative cases [31,35]. The most common treatments for patients with the luminal B subtype are endocrine therapy and chemotherapy. Luminal B carcinomas have a poor response to tamoxifen because of drug resistance [36].

Trastuzumab, also known as humanized monoclonal antibody, is used as a treatment for luminal B/HER2-positive tumors in early and metastatic cases [37]. It interacts with HER2 and inhibits HER2/HER3 signaling and subsequent HER2 release [38]. Compared with other proteins of the HER family, there are no known mutations or alterations that result in oncogenic activity to HER3. Additionally, no transformations have been observed when HER3 is overexpressed or under continuous ligand stimulation. HER3 appears to function as a signaling substrate and specialized allosteric activation mechanism of other HER proteins [38,39]. Studies in HER2-positive breast cancer indicate that ligand-independent HER2–HER3 heterodimers behave as oncogenic inductors in trastuzumab-sensitive substrates. However, it is possible that overexpression of HER3 itself, or any of its ligands, may result in trastuzumab sensitivity [40,41]. HER2-positive patients in advanced stages who underwent trastuzumab treatment were shown to have an improved survival rate, but occasionally

to experience disease progression [42]. Recently, national and international guidelines established that neoadjuvant chemotherapy should involve a combination of taxanes with a dual blockade of trastuzumab and pertuzumab in HER2-positive cases [43]. Pertuzumab acts by inhibiting HER2 dimerization with another HER (HER1–4) receptor. Its treatment choice is based on higher rates of pathological complete response (pCR) with the addition of HER2-specific agents coupled with chemotherapy, including the effects of pCR on disease-free survival and overall survival [43,44]. Lapatinib is another drug that acts on HER2 as an epidermal growth factor receptor (EGFR) and inhibits tyrosine kinase. Combined with capecitabine, lapatinib is administered in HER2-positive patients with advanced breast cancer [45,46].

Non-luminal tumors are characterized by non-expressing hormonal receptors and may express HER2 [28,47]. They are more common in young women and have a worse prognosis despite an initial good response to chemotherapy. The triple-negative breast cancer (TNBC) subtype is an undifferentiated carcinoma that is biologically aggressive and is usually detected in its advanced stages. Although TNBC presents with high rates of pCR after neoadjuvant chemotherapy with anthracycline and taxanes, a high rate of recurrence is observed among patients [47]. Preclinical and clinical studies suggest that women harboring TNBC may benefit from platinum-based chemotherapy. Randomized trials of patients with initial or advanced TNBC showed that platinum-based chemotherapy was generally associated with long-term survival [48–50]. Lapatinib may also be indicated as a treatment for TNBC because of its selective EGFR targeting. Additionally, it has clinical benefits regarding metastatic progression [46].

HER2-positive/ER- and PR-negative tumors are aggressive high-grade cancers that are usually self-detected and often observed in younger women [51]. Target therapies with anti-HER2 (trastuzumab), anti-HER2/HER3 (pertuzumab), or anti-HER2 and EGFR (lapatinib) can be used in these patients [36].

Although the classification of breast carcinomas into molecular or histological subtypes has contributed to a better stratification of patients into different therapeutic techniques, breast cancer nevertheless progresses or recurs in many women despite systemic therapy. Therefore, drug resistance remains a critical unsolved problem [51].

3. Drug Resistance in Breast Cancer

Drug resistance is the main factor responsible for cancer-associated deaths, and brings significant impairment to therapeutic interventions. Indeed, chemotherapy, the most common systemic treatment of breast cancer, benefits only 50% of users because of the development of resistance to multiple drugs [52]. For example, more than 30% of women with metastatic breast cancer do not respond to first-line chemotherapy based on anthracyclins and taxanes, and their disease typically progresses in less than 1 year [9]. Moreover, up to 50% of women with luminal carcinomas treated with endocrine therapy develop hormonal resistance. However, ER-regulatory pathways that could contribute to a hormone-resistant phenotype are still poorly understood [53].

Drug resistance may be inherent in first-line chemotherapy or hormone therapy, or the patient may develop resistance leading to disease progression some years after the initial treatment [9]. Resistance observed prior to treatment is innate (also known as intrinsic or *de novo*) and depends on the cancer subtype and a variety of factors influencing the tumor microenvironment [54]. Acquired resistance occurs through the growth of resistant cell clones, the type of drug used, or an accumulation of mutations in initial sensitive cells. Acquired resistance can be ascribed to pharmacological mechanisms, increased or decreased activity or gene expression, or changes in target molecules and other mechanisms [4].

Chemoresistance can be acquired through different molecular changes including epigenetic modifications [55], the inhibition of DNA repair proteins [56], the deregulation of proliferative and apoptotic pathways, metabolic alterations [57], an increase in autophagy [58], or the overexpression of adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) [59] efflux transporter or breast cancer resistance protein, which decreases intracellular drug concentrations. Breast cancer resistance protein is encoded by the *ABCG2* gene [60] and was shown to interact with other proteins responsible for drug transport

mechanisms and chemoresistance [61]. Moreover, the interactions between tumor cells and their surrounding stroma may affect tumor behavior and contribute to therapeutic responses [62]. Therefore, tumor microenvironment pathway changes are also critical to treatment success. The deregulation of chemokines and cytokines in therapy, for instance, leads to the selection of tumor cell clones associated with chemoresistance [63]. Macrophages recruited after anti-cancer drug administration can protect tumor cells from death and induce chemoresistance [64]. Breast tumors have an accumulation of cancer-associated fibroblasts (CAFs), which are thought to promote chemoresistance [65]. Increasing evidence shows that CAFs interact with breast cancer cells, resulting in diverse responses to anti-cancer drugs, mostly through metabolic regulation or signaling pathway activation [66–68].

The presence of the specific sub-population of cells, the cancer stem cells (CSCs), is another factor relevant to chemoresistance. CSCs are characterized by a self-renewing capacity, cell-surface marker $CD44^+ / CD24^{-/low}$ expression, an enhanced capacity for tumor generation, and resistance to treatment because of their quiescent behavior [69]. Some studies have shown that TNBCs exhibit an enriched CSC population, which may favor tumor recurrence [70,71]. Accordingly, several reports recently demonstrated that breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy had an enrichment of CSCs and aggressive properties, which affect patient curability [72,73]. These factors together constitute important mechanisms to explain the high rate of breast cancer recurrence through acquired chemoresistance (Figure 1).

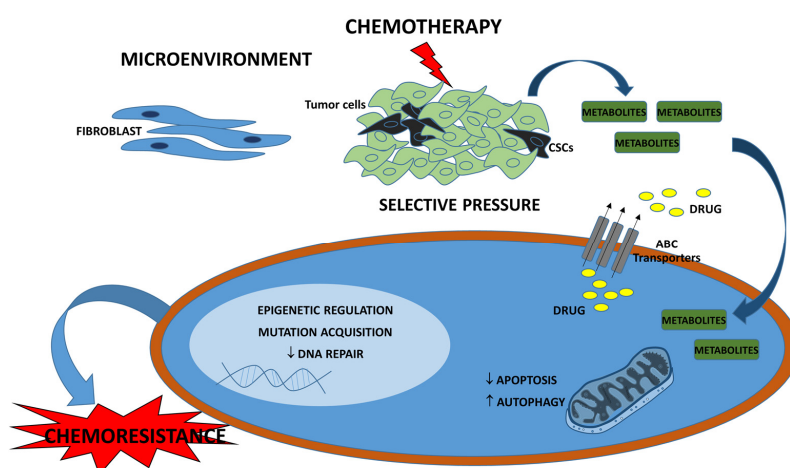


Figure 1. Chemotherapy agent could promote selective pressure of cancer stem cells (CSCs) and resistant cell clones and might increase the probability of recurrence. It may occur through pharmacological mechanisms, epigenetic modification, inhibition of DNA repair proteins, deregulation of proliferation and apoptotic pathways, metabolic alterations, autophagy increase, adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) efflux transporters overexpression that decreases the drug intracellular concentration. Moreover, the interactions between tumor cells and its surrounding microenvironment enriched by fibroblasts may also contribute to response to therapy.

4. Current Metabolomic Approaches

MS and NMR are the main analytical tools employed in metabolome analyses. Biochemical data obtained and interpreted using these approaches provide a broader perspective of pathological processes than can be obtained from isolated biological markers. Metabolomics contributes to the diagnosis or treatment response of breast cancer by interpreting molecular measures using specific computational models to produce a clinically relevant result [70,74,75].

Metabolomics essentially uses targeted and untargeted approaches. Targeted metabolomics aims to identify a pathway or a metabolite of interest, based on a previously known relationship with a particular pathway or metabolite in the metabolome composition of an investigated sample. The untargeted approach seeks to identify and quantify the largest number of metabolites in a

sample. Among the main techniques used in metabolomics studies, MS can be coupled to separation techniques such as liquid chromatography (LC-MS) or gas chromatography (GC-MS), as well as to NMR. Although NMR is a conservative technique and less sensitive than MS, its key advantages are that it is highly reproducible, quantitative, has a relatively low cost, and provides structural information for the accurate identification of metabolites [76]. Additionally, NMR does not use ionizing radiation, or require physical or chemical treatments prior to analysis, thus avoiding metabolite loss. Therefore, NMR is particularly useful in applications involving sensitive samples or living organisms [77].

5. Metabolic Profile of Breast Cancer

Cancer development occurs when different factors contribute to clonal evolution. These factors can be grouped into two major categories: the activation of oncogenes (e.g., MYC proto-oncogene (MYC), RAS type GTPase family (RAS), and/or phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K-AKT-mTOR) pathways) that stimulate cell proliferation, and the inactivation of tumor suppressor genes involved in growth suppression (e.g., retinoblastoma-associated (RB) and tumor protein p53 (TP53)), DNA repair (breast cancer type 1/2 (BRCA1/2)), or proliferation-restrictive signaling (phosphatase and tensin homolog (PTEN)) [78,79]. When these changes are present in early stage cells, the affected individual has a high chance of developing cancer. However, in addition to these genetic alterations, the metabolic reprogramming of cells and adjacent stroma is required for cancer development. The current biological model of carcinogenesis and drug resistance considers various pathways, such as cell proliferation, evasion of the mechanisms involved in suppression of cell growth, resistance to cell death, genomic instability and mutations, replication of immortalized cells, induction of angiogenesis invasion and metastasis capability, tumor-induced inflammation, and evasion of the immune system [79,80].

Cancer and metabolism are deeply interconnected. Changes in metabolic networks, such as those involved in biosynthetic pathways, can greatly affect the metabolism of cancer cells [81]. Processes such as tumor development, tissue remodeling, cell survival changes, and metastasis are responsible for triggering these metabolic changes. Studies indicate that metabolism determines cancer evolution, and is allied with the action of a particular drug. In other words, metabolic adaptation is influenced by tumor microorganization [82]. The production of metabolites changes when tumor cells show altered metabolism, which results in a signature capable of characterizing the presence or even the behavior of the cancer. The metabolomic profile can also be altered by the surrounding stroma and immune response, providing complementary information about the tumor development and treatment response [83].

The metabolic profile of breast cancer cells differs from that of normal breast epithelial cells, and the metabolic profile of drug-sensitive breast cancer cells differs from resistant ones. Therefore, the analysis of metabolic pathways enables a better understanding of changes in metabolism that could promote carcinogenesis [22]. Normal human cells use glucose as a source of energy in the presence of oxygen. The glucose metabolized in the cytosol results in the production of pyruvate that enters mitochondria, is oxidized by the Krebs cycle, and culminates in the generation of ATP, the main source of cellular energy storage. However, even in aerobic conditions, most of the pyruvate in cancer cells is directed away from mitochondria and, under the action of lactic dehydrogenase, results in lactate. This process is typically observed in low oxygen environments. Lactate production in the presence of oxygen is known as aerobic glycolysis or the “Warburg effect” [78,84–86].

Breast cancer cells have an increased absorption of glucose [78], which is associated with activated oncogenes (RAS and MYC) and mutant tumor suppressors (TP53). These both interfere with proliferation, the inactivation of growth suppression, and the decrease of apoptosis. During neoplastic growth, progressive hypoxia occurs because of inefficient neovascularization leading to the expression of multiple enzymes involved in the glycolytic pathway [79]. As well as providing energy and biomolecules to cancer cells, glycolytic deviation contributes to cell–cell communication, thus reinforcing the hypothesis that a symbiosis known as the tumor microenvironment exists between cancer cells and adjacent stroma. In cancer, lactate acts as a source of energy and molecular signaling,

mimicking physiological mechanisms of high anaerobic performance. The complexity of a tumor microenvironment and the interconnections between different cell types make it difficult to understand the lactate circuit [87].

Recent research aimed to identify metabolic pathway changes associated with breast carcinogenesis. Using a large-scale methodology, Jain et al. [88] recognized that the glycine biosynthetic pathway was highly correlated with fast proliferating breast cancer cells. They suggested that glycine consumption is required for cancer cell proliferation, and is associated with worse prognosis in breast cancer patients. Their findings also suggested a potential cancer biomarker and therapeutic response tracking [88].

In an in vitro analysis, Xie et al. [89] reported that aspartate levels were higher in the MCF-7 cell line than in MCF-10A cells. The low levels of aspartate found in the blood of breast cancer patients suggested that amino acids were being consumed as part of tumor development. These results indicated that circulating aspartate is a key metabolite characteristic of human breast cancer [89]. Another in vitro analysis of MCF-7 and MDA-MB-231 cells used NMR to identify metabolites and quantify inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP3R). This revealed the functional relevance of IP3R in causing metabolic disorders, resulting in reduced glucose uptake in both cell lines. Metabolomic analysis was also used to study changes in breast cancer metabolism with an emphasis on glutamine and its transporters. Glutamine is considered one of the main amino acids involved in tumor development. The authors used in vivo analysis to identify serum metabolites in breast cancer patient, which showed that IP3R expression was up-regulated in many cases. An increase in lipoprotein content and levels of metabolites such as lactate, lysine, and alanine, and a decrease in serum pyruvate and glucose levels, were also observed in patients who presented with high IP3R levels compared with healthy individuals [90].

In an analysis of serum from breast cancer patients and healthy controls, GC-MS was used to obtain metabolic profiles, followed by chemometric analysis to differentiate which metabolites showed substantial changes. Pathway analysis revealed metabolic alterations in breast cancer patients evidencing increased glycolysis, lipogenesis, and the production of volatile organic metabolites compared with healthy women [91]. Also comparing the metabolic profile of serum samples from healthy women with subtype-independent breast cancer patients, Jové et al. [92] identified 1269 metabolites with different serum concentrations in both groups and 354 metabolites belonging to aminoacyl-tRNA biosynthesis, arginine and proline metabolism, and primary bile acid biosynthesis pathways. Caproic acid and stearamide were identified as metabolites significantly associated with disease. Patients with early stage cancer had increased serum levels of choline, tyrosine, valine, lactate, isoleucine, and decreased glutamate levels. However, in women with metastatic cancer, serum glucose and glutamine levels were shown to decrease. The authors argued that differences in oncogene expression are correlated with the metabolic profile, which may lead to disease relapse [92]. In another study, serum lipid concentrations were evaluated in women with newly diagnosed invasive breast cancer at stages I and II. NMR was used for the metabolomic analysis of serum lipoprotein subfractions, which revealed an association between lipoproteins and ER expression. However, an inverse association between subfractions of high density lipoprotein and Ki67 was noted, and low density lipoproteins were positively associated with nodal metastasis. Therefore, it was possible to associate subfractions of lipoproteins with a characteristic of breast cancer acting on the aggressiveness and prognosis of the tumor. These results suggested an association between different lipoprotein subfractions and the expression of PR and Ki67 in breast tumors [93].

Through the metabolomic analysis of serum and plasma samples from two groups of patients with primary breast cancer, Xie et al. showed that breast cancer was associated with low plasma levels of aspartate due to higher levels of aspartate in breast cancer tissues in consequence of increased tumor aspartate utilization [89]. Evaluating the plasma metabolism of patients with early or metastatic breast cancer by NMR, they also observed variations in glucose, lactate, pyruvate, alanine, leucine, isoleucine, glutamate, glutamine, lysine, glycine, threonine, tyrosine, phenylalanine, acetate, acetoacetate, β -hydroxybutyrate, urea, creatine, and creatinine. In particular, lactate levels were inversely correlated

with tumor size in the cohort of patients with early breast cancer. It has been suggested that tumor cells are capable of inducing modulation of the patient's metabolism even in early stages of the disease [94].

Fuss et al. [95] emphasized the importance of evaluating a complete metabolomic profile rather than correlating isolated metabolites because of its greater ability to predict prognosis. They analyzed the role of cancer metabolism using *ex vivo* high-resolution magic angle spinning (HR-MAS) to study the metabolic profiles of intact breast tissue. Compared with benign tissue, levels of compounds containing taurine and choline were elevated in breast tissue. Patients reported to be healthy up to five years after surgery were found to have increased levels of taurine, glycerophosphocholine, and creatine, with decreased levels of glycine and phosphocholine in their malignant tissues [95]. In an analysis of primary tumor samples from un-treated breast cancer patients, the authors used HR-MAS magnetic resonance spectroscopy (MRS) to identify three significant metabolic clusters: one had the highest levels of glycerophosphocholine and phosphocholine, the second had the highest levels of glucose, and the third had the highest levels of lactate and alanine. Interestingly, the genetic subtypes were uniformly found among the three metabolic clusters. The metabolic clusters could contribute to explaining the heterogeneity of breast cancer [96].

Ansari et al. [97] concluded that understanding the metabolic pathways of different breast cancer subtypes may lead to the discovery of potential biomarkers to help in the orientation of personalized treatments. Discrepancies among molecular classes of breast cancer are apparent for some metabolic pathways, such as the glutamine pathway in TNBC, which has an aggressive metabolic pattern. Although previous studies have undoubtedly shown the usefulness of the metabolomics approach, the establishment of future validation using independent cohorts is essential to understanding the relevance of specific metabolic biomarkers [97].

6. Metabolomic-Based Breast Cancer Chemoresistance

Recently, several *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* studies have been performed to understand the metabolic pathways involved in breast cancer drug resistance (Table 1). Among the major *in vitro* studies, Ryu et al. [98] observed that glycolysis, as well as the production of lactates and ATP, is associated with resistance to adriamycin in MCF-7 cells. Their results suggest that the regulation of sulfur amino acid metabolism may be a therapeutic target for chemoresistant cells [98]. Using the same cell line, Cao et al. [99] observed that adriamycin decelerated several metabolic pathways, including purine, pyrimidine, glutathione, and glycolysis routes, as well as aggravating oxidative stress. These findings suggest that cellular metabolomics and the quantitative measurement of metabolic markers can be used to evaluate antitumor effects and investigate antitumor candidate agents [99]. In MCF-7 cells exposed to ascididemin, Morvan [100] observed an increase in citrate, gluconate, and polyunsaturated fatty acids, and a decrease in glycerophosphocholine and ethanolamine associated with severe oxidative stress *in vitro*. He concluded that central metabolic changes in breast cancer cells are responses to high oxidative stress [100]. Similarly, Bayet-Robert and Morvan [101] reported changes in glutathione and lipid metabolism as well as glucose use in MCF-7 and MDA-MB-231 cells exposed to curcumin and docetaxel [100,101].

Comparing metabolic pathways in luminal A breast cancer cells (BT474 and MCF-7) and triple-negative cells (MDA-MB-231 and MDA-MB-468), Stewart et al. [102] observed different metabolic responses to paclitaxel treatment. For example, in both luminal A and triple-negative cells, choline and its metabolites increased in the presence of paclitaxel. Moreover, choline, acetylcholine, phosphocholine, and sn-glycero-3-phosphocholine increased under treatment in MDA-MB-468 but not MDA-MB-231 cells, except for sn-glycero-3-phosphocholine. The myo-inositol level also increased during treatment and was higher in luminal A cells compared with triple-negative cells. Based on these studies, it was notable that glycolysis and glutathione pathways were deregulated when cells were treated with adriamycin and docetaxel. This suggested that new studies should focus on these biochemical pathways to expand our understanding of chemotherapeutic effects as well as possible mechanisms of resistance [102].

Table 1. Studies involving metabolic pathway changes based on different treatments.

Biological Materials	Approach	Specific Treatment	Metabolic Pathways Identified	Reference
MCF-7	Immunoblot analyses	Adriamycin	Sulfur amino acid metabolism	[98]
MCF-7	GC-MS	Adriamycin	Increase in glycerol metabolism and decrease in glutathione biosynthesis.	[99]
MCF-7	NMR	Ascididemin	Increase in citrate, gluconate and polyunsaturated fatty acids and decrease in glycerophospho-choline and ethanolamine.	[100]
MCF-7 MDA-MB-231	NMR	curcumin +/- docetaxel (dose- and time-response)	Changes in glutathione metabolism, lipid metabolism, and glucose utilization—some biphasic changes depending on exposure.	[101]
BT474 MCF-7 MDA-MB-231 MDA-MB-468	NMR	Paclitaxel	In luminal A cell lines: lactate and creatine decreased while certain choline metabolites and myo-inositol increased with paclitaxel. In TNBC cell lines: glutamine, glutamate, and glutathione increased, whereas lysine, proline, and valine decreased in the presence of drug.	[102]
Human serum samples	LC-MS	Trastuzumab-paclitaxel	Changes in spermidine and tryptophan.	[103]
MDA-MB-231	HR-MAS NMR	Tamoxifen, cisplatin and doxorubicin	Changes in acetate, lactate and phosphocholine.	[104]
MCF-7	UHPLC-MS	Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)	Change in the pentose phosphate pathway.	[105]
Tissue samples mouse model	HR-MAS	Docetaxel	In docetaxel-sensitive tumors: increase in choline metabolites. In tumors resistant to docetaxel: metabolites derived from choline did not increase during treatment.	[106]
Human breast tumor tissue	HR-MAS	5-Fluorouracil, epirubicin, cyclophosphamide followed by taxane randomized to bevacizumab	Lower glucose and higher lactate was observed in patients exhibiting a good response compared to those with no response	[107]
Human serum samples	LC-MS NMR	Epirubicin and cyclophosphamide followed of doxorubicin in association to trastuzumab in HER2-positive cases	Concentrations significantly different threonine, isoleucine, glutamine and linolenic acid.	[108]

Using human serum samples, Miolo et al. [103] investigated biomarkers potentially associated with pCR in the treatment of neoadjuvant trastuzumab-paclitaxel in HER2-positive breast cancer patients through a pharmacometabolomics approach. Serum levels of spermidine and tryptophan identified patients who achieved pCR with a high sensitivity. These results were useful for elucidating individual metabolic responses to treatment, and may help select the most suitable patients for treatment with trastuzumab-paclitaxel [103].

Using HR-MAS NMR spectroscopy technology, Maria et al. [104] studied the in vitro metabolic profile of human breast cancer cells treated with tamoxifen, cisplatin, and doxorubicin. The study findings emphasized that different breast tumor lines respond in remarkably different ways to chemotherapy. It was also observed that changes in acetate, lactate, and phosphocholine helped identify tumor response to a given treatment based only on molecular properties [104].

Wei et al. [105] investigated the toxicity mechanism of 2,2',4,4'-tetra-bromodiphenyl ether (BDE-47) in MCF-7 breast cancer cells. Metabolomic analysis using ultra-high performance LC-MS showed that toxicity to MCF-7 cells increased gradually when the concentration of BDE-47 exceeded 1 mM. BDE-47 was found to induce oxidative stress by inhibiting pathways involving pyrimidine and purine, and the pentose phosphate pathway (PPP), and disrupting the entire cell metabolism. Thus, pyrimidine and purine metabolism could be reduced by downregulating mRNA transcripts, and oxidative stress could be induced by inhibiting nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen (NADPH) in the PPP observed in MCF-7 cells exposed to BDE-47 [105].

Based on an ex vivo model, van Asten et al. [106] observed that breast cancer tissues of syngeneic mice (K14cre; Brca1^{F/F}p53^{F/F}) resistant and sensitive to docetaxel showed different modifications of metabolic pathways during treatment. Evaluating the tumors sensitive to docetaxel, the authors observed that the metabolic profile 48 h after drug treatment was characterized by a high level of phosphocholine compared with untreated tumors. Within the first 48 h of treating sensitive tumors, the observed proportion of total choline, glycerophosphocholine, phosphocholine, and creatinine was significantly increased. They concluded that docetaxel-sensitive tumors have an increase of metabolites containing choline, as observed 1–2 days after beginning therapy, which corresponded with the time of higher apoptotic activity. In docetaxel-resistant tumors, the metabolites derived from choline did not increase during treatment. However, relative concentrations of choline components were higher in the pre-treatment of docetaxel-resistant tumors than in sensitive tumors [106].

Euceda et al. [107] used HR-MAS MRS to analyze human breast tumor samples. The tumors were biopsied before, during, and after neoadjuvant chemotherapy. Metabolites of all observed constituents of total choline significantly decreased post-treatment, and were significantly lower in sensitive patients compared with a resistant patient. A significantly lower level of succinate was also observed in sensitive patients. Unexpectedly, the authors found a significant increase in lactate with treatment progression in sensitive patients. Both an increase in lactate production and rapid glucose consumption are characteristic of the Warburg effect. They also observed changes in glutathione metabolism identified as a possible effect of bevacizumab [107].

Few studies have evaluated serum metabolomic changes in women with breast cancer. Wei et al. [108] compared the serum metabolic profile of HER2-positive women with a pCR, a partial response, and with stationary disease following neoadjuvant chemotherapy with epirubicin and cyclophosphamide followed by doxorubicin associated with trastuzumab. They identified a progressive increase in threonine, glutamine, and linoleic acid in patients with a pCR, followed by those with a partial response and stationary disease with the progressive reduction of isoleucine. The underlying mechanism of this distinction in resistant and sensitive patients is not fully understood. In vivo analyses showed that the linoleic acid pathway was the most affected after doxorubicin treatment [108].

7. Future Perspectives

Metabolomic analytical techniques are distinguished by the level of sensitivity, volume of material to be analyzed, and sample preparation methods. Analytical platform improvements have allowed the high-throughput collection of different molecular levels with large amounts of data. These multi-layer data omics enable a clearer view of biological systems to be obtained because they do not only focus on single-layer omics. Given the complementary nature of different molecular levels, multi-layer data omics facilitate understanding and applicability in clinical routine. Metabolomics is therefore an attractive approach for providing information about cancer biology because it is obtained through a metabolic profile and is associated with complementary methods [96].

Recent studies have focused on in vitro and in vivo approaches. However, few have correlated both approaches to validate the methodology. Additionally, few have evaluated the different subtypes of breast cancer with respect to functions of time, stage, drugs, and duration of treatment. Studies in clinical cohorts should therefore be performed to recognize the potential of data to predict results and follow up on breast cancer treatment. It is also important that specialized oncologists work with other health professionals to improve the analysis of results obtained from methodological tools and present them in a format that is helpful for managing routine patients. Use of the metabolomic approach in clinical routine helps decipher the main regulatory pathways in different breast cancer subtypes. The clarification of individual behavioral changes in both disease development and treatment response is essential for developing more effective treatments and customizing cancer treatments [109].

Breast cancer is a heterogeneous disease, and chemotherapy failures are caused by drug resistance, which is a leading cause of breast cancer mortality. The metabolic analysis of fluids and tissues of cancer patients contributes to an understanding of the metabolic pathway reprogramming involved in neoplastic transformation, prognosis, and drug resistance [78,79]. Several studies have been proposed to evaluate metabolic pathway reprogramming in chemoresistance, and identify patients who are resistant to chemotherapy. However, studies that verify whether metabolic pathways are associated with the response to chemotherapy are lacking. Such studies could provide evidence for use in clinical practice, while the identification of different metabolic profiles may suggest new molecular targets and metabolic biomarkers that will contribute to patient stratification of different breast cancer subtypes. Finally, the knowledge of specific metabolic pathways could impact on the evaluation of new drugs with possible repercussions on the survival of breast cancer patients. The prompt identification of chemotherapy-resistant tumors would aid with earlier and more accurate stratification of patients, and the choice of adjusted therapeutic regimens [74,105].

Acknowledgments: This study was supported by a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP (number 2016/07822-4), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (number 306583/2014-3) and Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES). We thank Sarah Williams, from Edanz Group (www.edanzediting.com) for editing a draft of this manuscript.

Author Contributions: Marcella Regina Cardoso, Juliana Carvalho Santos, and Sophie Françoise Mauricette Derchain performed the literature search; Marcella Regina Cardoso, Sophie Françoise Mauricette Derchain, and Juliana Carvalho Santos wrote the paper; Maria Cecília Ramiro Talarico, Marcelo Lima Ribeiro, and Lais Rosa Viana put forward relevant insights and contributed to the paper editing. All authors reviewed the manuscript.

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

References

1. Torre, L.A.; Bray, F.; Siegel, R.L.; Ferlay, J.; Lortet-tieulent, J.; Jemal, A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* **2015**, *65*, 87–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Partridge, A.H.; Hughes, M.E.; Warner, E.T.; Ottesen, R.A.; Wong, Y.N.; Edge, S.B.; Theriault, R.L.; Blayney, D.W.; Niland, J.C.; Winer, E.P.; et al. Subtype-Dependent Relationship between Young Age at Diagnosis and Breast Cancer Survival. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 3308–3314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. DeSantis, C.E.; Bray, F.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Anderson, B.O.; Jemal, A. International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2015**, *24*, 1495–1506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Steding, C.E. Creating chemotherapeutic-resistant breast cancer cell lines: Advances and future perspectives. *Future Oncol.* **2016**, *12*, 1517–1527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Luqmani, Y.A. Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Med. Princ. Pract.* **2008**, *14*, 35–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. American Cancer Society: Breast Cancer Facts & Figures (2015). Available online: <http://www.cancer.org> (accessed on 6 August 2017).
7. Lee, A.; Djamgoz, M.B.A. Triple negative breast cancer: Emerging therapeutic modalities and novel combination therapies. *Cancer Treat. Rev.* **2018**, *62*, 110–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Majidinia, M.; Yousefi, B. Breast tumor stroma: A driving force in the development of resistance to therapies. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, *89*, 309–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Yardley, D.A. Drug Resistance and the Role of Combination Chemotherapy in Improving Patient Outcomes. *Int. J. Breast Cancer* **2013**, *2013*, 137–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Hong, B.; Zhang, J.; Yang, W. Activation of the LKB1-SIK1 signaling pathway inhibits the TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition and apoptosis resistance of ovarian carcinoma cells. *Mol. Med. Rep.* **2017**, 2837–2844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Cornelison, R.; Llaneza, D.C.; Landen, C.N. Emerging therapeutics to overcome chemoresistance in epithelial ovarian cancer: A mini-review. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Sadeghi, M.R.; Jeddi, F.; Soozangar, N.; Somi, M.H.; Samadi, N. The role of Nrf2-Keap1 axis in colorectal cancer, progression, and chemoresistance. *Tumor Biol.* **2017**, *39*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kerbel, R.S.; Kobayashi, H.; Graham, C.H. Intrinsic or acquired drug resistance and metastasis: Are they linked phenotypes? *J. Cell. Biochem.* **1994**, *56*, 37–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sauter, E.R. Reliable Biomarkers to Identify New and Recurrent Cancer. *Eur. J. Breast Health* **2017**, *13*, 162–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lindon, J.C.; Holmes, E.; Nicholson, J.K. Metabonomics and its role in drug development and disease diagnosis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2004**, *4*, 189–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Zhang, J.; Bowers, J.; Liu, L.; Wei, S.; Gowda, G.A.N.; Hammoud, Z.; Raftery, D. Esophageal cancer metabolite biomarkers detected by LC-MS and NMR methods. *PLoS ONE* **2012**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lanza, I.R.; Zhang, S.; Ward, L.E.; Karakelides, H.; Raftery, D.; Nair, K.S. Quantitative metabolomics by 1H-NMR and LC-MS/MS confirms altered metabolic pathways in diabetes. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Gowda, G.A.N.; Zhang, S.; Gu, H.; Asiago, V.; Shanaiah, N.; Raftery, D. Metabolomics-Based Methods for Early Disease Diagnostics: A Review. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2008**, *8*, 617–633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Pavlova, N.N.; Thompson, C.B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* **2016**, *23*, 27–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Dettmer, K.; Aronov, P.A.; Hammock, B.D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26*, 51–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Patel, S.; Ahmed, S. Emerging field of metabolomics: Big promise for cancer biomarker identification and drug discovery. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *107*, 63–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Shajahan-Haq, A.N.; Cheema, M.S.; Clarke, R. Application of metabolomics in drug resistant breast cancer research. *Metabolites* **2015**, *5*, 100–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Denkert, C.; Bucher, E.; Hilvo, M.; Salek, R.; Orešič, M.; Griffin, J.; Brockmöller, S.; Klauschen, F.; Loibl, S.; Barupal, D.K.; et al. Metabolomics of human breast cancer: New approaches for tumor typing and biomarker discovery. *Genome Med.* **2012**, *4*, 37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Esserman, L.J.; Berry, D.A.; DeMichele, A.; Carey, L.; Davis, S.E.; Buxton, M.; Hudis, C.; Gray, J.W.; Perou, C.; Yau, C.; et al. Pathologic complete response predicts recurrence-free survival more effectively by cancer subset: Results from the I-SPY 1 TRIAL—CALGB 150007/150012, ACRIN 6657. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 3242–3249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Sorlie, T.; Perou, C.M.; Tibshirani, R.; Aas, T.; Geisler, S.; Johnsen, H.; Hastie, T.; Eisen, M.B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10869–10874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Haukaas, T.H.; Euceda, L.R.; Giskeødegård, G.F.; Lamichhane, S.; Krohn, M.; Jernström, S.; Aure, M.R.; Lingjærde, O.C.; Schlichting, E.; Garred, Ø.; et al. Metabolic clusters of breast cancer in relation to gene- and protein expression subtypes. *Cancer Metab.* **2016**, *4*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Bernard, P.S.; Parker, J.S.; Mullins, M.; Cheung, M.C.U.; Leung, S.; Voduc, D.; Vickery, T.; Davies, S.; Fauron, C.; He, X.; et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 1160–1167. [[CrossRef](#)]
29. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature* **2012**, *490*, 61–70. [[CrossRef](#)]
30. Kos, Z.; Dabbs, D.J. Biomarker assessment and molecular testing for prognostication in breast cancer. *Histopathology* **2016**, *68*, 70–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Cheang, M.C.U.; Chia, S.K.; Voduc, D.; Gao, D.; Leung, S.; Snider, J.; Watson, M.; Davies, S.; Bernard, P.S.; Parker, J.S.; et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2009**, *101*, 736–750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Dai, X.; Li, T.; Bai, Z.; Yang, Y.; Liu, X.; Zhan, J.; Shi, B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am. J. Cancer Res.* **2015**, *5*, 2929–2943. [[PubMed](#)]
33. Morrison, D.H.; Rahardja, D.; King, E.; Peng, Y.; Sarode, V.R. Tumour biomarker expression relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer. *Br. J. Cancer* **2012**, *107*, 382–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wang, Y.; Yin, Q.; Yu, Q.; Zhang, J.; Liu, Z.; Wang, S.; Lv, S.; Niu, Y. A retrospective study of breast cancer subtypes: The risk of relapse and the relations with treatments. *Breast Cancer Res. Treat.* **2011**, *130*, 489–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Coates, A.S.; Winer, E.P.; Goldhirsch, A.; Gelber, R.D.; Gnant, M.; Piccart-Gebhart, M.; Thürlimann, B.; Senn, H.J. Tailoring therapies—Improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann. Oncol.* **2015**, *26*, 1533–1546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Cancellio, G.; Maisonneuve, P.; Rotmensz, N.; Viale, G.; Mastropasqua, M.G.; Pruneri, G.; Montagna, E.; Iorfida, M.; Mazza, M.; Balduzzi, A.; et al. Progesterone receptor loss identifies Luminal B breast cancer subgroups at higher risk of relapse. *Ann. Oncol.* **2013**, *24*, 661–668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Yamashita Kashima, Y.; Shu, S.; Yorozu, K.; Moriya, Y.; Harada, N. Mode of action of pertuzumab in combination with trastuzumab plus docetaxel therapy in a HER2 positive breast cancer xenograft model. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 4197–4205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Molina, M.A.; Codony-servat, J.; Albanell, J.; Rojo, F.; Baselga, J. Trastuzumab (Herceptin), a Humanized Anti-HER2 Receptor Monoclonal Antibody, Inhibits Basal and Activated HER2 Ectodomain Cleavage in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4744–4749. [[PubMed](#)]
39. Dey, N.; Williams, C.; Leyland-Jones, B.; de, P. A critical role for HER3 in HER2-amplified and non-amplified breast cancers: Function of a kinase-dead RTK. *Am. J. Transl. Res.* **2015**, *7*, 733–750. [[PubMed](#)]
40. Zhang, K.; Sun, J.; Liu, N.; Wen, D.; Chang, D.; Thomason, A.; Yoshinaga, S.K. Transformation of NIH 3T3 cells by HER3 or HER4 receptors requires the presence of HER1 or HER2. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3884–3890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Lipton, A.; Goodman, L.; Leitzel, K.; Cook, J.; Sperinde, J.; Haddad, M.; Köstler, W.J.; Huang, W.; Weidler, J.M.; Ali, S.; et al. HER3, p95HER2, and HER2 protein expression levels define multiple subtypes of HER2-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2013**, *141*, 43–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Li, Q.; Zhang, R.; Yan, H.; Zhao, P.; Wu, L.; Wang, H.; Li, T. Prognostic significance of HER3 in patients with malignant solid tumors. *Oncotarget* **2017**, *8*, 67140–67151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Wuerstlein, R.; Harbeck, N. Neoadjuvant Therapy for HER2-positive Breast Cancer. *Rev. Recent Clin. Trials* **2017**, *12*, 81–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Apuri, S. Neoadjuvant and Adjuvant Therapies for Breast Cancer. *South Med. J.* **2017**, *110*, 638–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Tevaarwerk, A.J.; Kolesar, J.M. Lapatinib: A small-molecule inhibitor of epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 tyrosine kinases used in the treatment of breast cancer. *Clin. Ther.* **2009**, *31*, 2332–2348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Wan, X.; Zheng, X.; Pang, X.; Zhang, Z.; Jing, T.; Xu, W.; Zhang, Q. The potential use of lapatinib-loaded human serum albumin nanoparticles in the treatment of triple-negative breast cancer. *Int. J. Pharm.* **2015**, *484*, 16–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Perou, C.M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist* **2011**, *16* (Suppl. 1), 61–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Gerratana, L.; Fanotto, V.; Pelizzari, G.; Agostinetto, E.; Puglisi, F. Do platinum salts fit all triple negative breast cancers? *Cancer Treat. Rev.* **2016**, *48*, 34–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. La Belle, A.; Khatib, J.; Schiemann, W.P.; Vinayak, S. Role of Platinum in Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* **2017**, *18*, 68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Zhou, L.; Xu, S.; Yin, W.; Lin, Y.; Du, Y.; Jiang, Y. Weekly paclitaxel and cisplatin as neoadjuvant chemotherapy with locally advanced breast cancer: A prospective, single arm, phase II study. *Oncotarget* **2017**, *8*, 79305–79314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Oldridge, D.A.; Wood, A.C.; Weichert-leahey, N.; Crimmins, I.; Winter, C.; Mcdaniel, L.D.; Diamond, M.; Hart, L.S.; Durbin, A.D.; Abraham, B.J.; et al. Associations between sociodemographic and clinicopathological factors, and breast cancer subtypes in a population-based study. *Cancer Causes Control* **2016**, *528*, 418–421. [[CrossRef](#)]
52. Germano, S.; O'Driscoll, L. Breast cancer: Understanding sensitivity and resistance to chemotherapy and targeted therapies to aid in personalised medicine. *Curr. Cancer Drug Targets* **2009**, *9*, 398–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Jeselsohn, R.; Buchwalter, G.; Angelis, C.; Brown, M.; Schiff, M. ESR1 mutations as a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2015**, *12*, 573–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Groenendijk, F.H.; Bernards, R. Drug resistance to targeted therapies: Déjà vu all over again. *Mol. Oncol.* **2014**, *8*, 1067–1083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Jiménez-Garduño, A.M.; Mendoza-Rodríguez, M.G.; Urrutia-Cabrera, D.; Domínguez-Robles, M.C.; Pérez-Yépez, E.A.; Ayala-Summano, J.T.; Meza, I. IL-1 β induced methylation of the estrogen receptor ER α gene correlates with EMT and chemoresistance in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *490*, 780–785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Wu, Y.H.; Hong, C.W.; Wang, Y.C.; Huang, W.J.; Yeh, Y.L.; Wang, B.J.; Wang, Y.J.; Chiu, H.W. A novel histone deacetylase inhibitor TMU-35435 enhances etoposide cytotoxicity through the proteasomal degradation of DNA-PKcs in triple-negative breast cancer. *Cancer Lett.* **2017**, *400*, 79–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Jin, L.; Chun, J.; Pan, C.; Alesi, G.N.; Li, D.; Magliocca, K.R.; Kang, Y.; Chen, Z.G.; Shin, D.M.; Khuri, F.R.; et al. Phosphorylation-mediated activation of LDHA promotes cancer cell invasion and tumour metastasis. *Oncogene* **2016**, *8*, 444–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Kim, M.; Jung, J.Y.; Choi, S.; Lee, H.; Morales, L.D.; Koh, J.T.; Kim, S.H.; Choi, Y.D.; Choi, C.; Slaga, T.J.; et al. GFRA1 promotes cisplatin-induced chemoresistance in osteosarcoma by inducing autophagy. *Autophagy* **2017**, *13*, 149–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Murakami, M.; Ohnuma, S.; Fukuda, M.; Chufan, E.E.; Kudoh, K.; Kanehara, K.; Sugisawa, N.; Ishida, M.; Naitoh, T.; Shibata, H.; et al. Synthetic analogs of curcumin modulate the function of multidrug resistance-linked ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Drug Metab. Dispos.* **2017**, *45*, 1166–1177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Nickel, S.; Selo, M.A.; Fallack, J.; Clerkin, C.G.; Huwer, H.; Schneider-Daum, N.; Lehr, C.M.; Ehrhardt, C. Expression and Activity of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Human Distal Lung Epithelial Cells In Vitro. *Pharm. Res.* **2017**, *34*, 2477–2487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Natarajan, K.; Xie, Y.; Baer, M.R.; Ross, D.D. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83*, 1084–1103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Hölzel, M.; Bovier, A.; Tüting, T. Plasticity of tumour and immune cells: A source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 365–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Gilbert, L.A.; Hemann, M.T. DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. *Cell* **2010**, *143*, 355–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Shree, T.; Olson, O.C.; Elie, B.T.; Kester, J.C.; Garfall, A.L.; Simpson, K.; Bell-Mcguinn, K.M.; Zabor, E.C.; Brogi, E.; Joyce, J.A. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 2465–2479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

65. Chaiwun, B.; Sukhamwang, N.; Trakultivakorn, H.; Saha, B.; Young, L.; Tsao-Wei, D.; Naritoku, W.Y.; Groshen, S.; Taylor, C.R.; Imam, S.A. GSTPi-positive tumour microenvironment-associated fibroblasts are significantly associated with GSTPi-negative cancer cells in paired cases of primary invasive breast cancer and axillary lymph node metastases. *Br. J. Cancer* **2011**, *105*, 1224–1229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Park, S.Y.; Kim, H.M.; Koo, J.S. Differential expression of cancer-associated fibroblast-related proteins according to molecular subtype and stromal histology in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2015**, *149*, 727–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Pontiggia, O.; Sampayo, R.; Raffo, D.; Motter, A.; Xu, R.; Bissell, M.J.; De Kier Joffé, E.B.; Simian, M. The tumor microenvironment modulates tamoxifen resistance in breast cancer: A role for soluble stromal factors and fibronectin through $\beta 1$ integrin. *Breast Cancer Res. Treat.* **2012**, *133*, 459–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Ueno, T.; Utsumi, J.; Toi, M.; Shimizu, K. Characteristic gene expression profiles of human fibroblasts and breast cancer cells in a newly developed bilateral coculture system. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Opyrchal, M.; Salisbury, J.L.; Iankov, I.; Goetz, M.P.; McCubrey, J.; Gambino, M.W.; Malatino, L.; Puccia, G.; Ingle, J.N.; Galanis, E.; et al. Inhibition of Cdk2 kinase activity selectively targets the CD44 +/CD24-/Low stem-like subpopulation and restores chemosensitivity of SUM149PT triple-negative breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2014**, *45*, 1193–1199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Shima, H.; Yamada, A.; Ishikawa, T.; Endo, I. Are breast cancer stem cells the key to resolving clinical issues in breast cancer therapy? *Gland Surg.* **2017**, *6*, 82–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Perou, C.M. Molecular stratification of Triple negative breast cancer. *Oncologist* **2010**, *15*, 39–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Tanei, T.; Morimoto, K.; Shimazu, K.; Seung, J.K.; Tanji, Y.; Taguchi, T.; Tamaki, Y.; Noguchi, S. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 4234–4241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Saha, S.; Mukherjee, S.; Khan, P.; Kajal, K.; Mazumdar, M.; Manna, A.; Mukherjee, S.; De, S.; Jana, D.; Sarkar, D.K.; et al. Aspirin suppresses the acquisition of chemoresistance in breast cancer by disrupting an NFB-IL6 signaling axis responsible for the generation of cancer stem cells. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 2000–2012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Judes, G.; Rifa, K.; Daures, M.; Dubois, L.; Bignon, Y.J.; Penault-Llorca, F.; Bernard-Gallon, D. High-throughput Omics technologies: New tools for the study of triple-negative breast cancer. *Cancer Lett.* **2016**, *382*, 77–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Budczies, J.; Denkert, C. Tissue-Based Metabolomics to Analyze the Breast Cancer Metabolome. *Recent Results Cancer Res.* **2016**, *207*, 157–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Peterson, A.L.; Walker, A.K.; Sloan, E.K.; Creek, D.J. Optimized method for untargeted metabolomics analysis of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Metabolites* **2016**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Jagannathan, N.R.; Sharma, U. Breast tissue metabolism by magnetic resonance spectroscopy. *Metabolites* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Penkert, J.; Ripperger, T.; Schieck, M.; Schlegelberger, B.; Steinemann, D.; Illig, T. On metabolic reprogramming and tumor biology: A comprehensive survey of metabolism in breast cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 67626–67649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Hanahan, D. Rethinking the war on cancer. *Lancet* **2014**, *383*, 558–563. [[CrossRef](#)]
81. Hirschey, M.D.; DeBerardinis, R.J.; Diehl, A.M.E.; Drew, J.E.; Frezza, C.; Green, M.F.; Jones, L.W.; Ko, Y.H.; Le, A.; Lea, M.A.; et al. Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *35*, S129–S150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Mishra, P.; Ambs, S. Metabolic signatures of human breast cancer. *Mol. Cell. Oncol.* **2015**, *2*, e992217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Hart, C.D.; Vignoli, A.; Tenori, L.; Uy, G.L.; Van To, T.; Adebamowo, C.; Hossain, S.M.; Biganzoli, L.; Risi, E.; Love, R.R.; et al. Serum metabolomic profiles identify ER-positive early breast cancer patients at increased risk of disease recurrence in a multicenter population. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 1422–1431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

84. Hsu, P.P.; Sabatini, D.M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* **2008**, *134*, 703–707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Samudio, I.; Fiegl, M.; Andreeff, M. Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: Molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res.* **2009**, *69*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Otto, W. On the Origin of Cancer Cells. *Science* **1956**, *123*, 309–314. [[CrossRef](#)]
87. Marchiq, I.; Pouyssegur, J. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H⁺ symporters. *J. Mol. Med.* **2016**, *94*, 155–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Jain, M.; Nilsson, R.; Sharma, S.; Madhusudhan, N.; Kitami, T.; Souza, A.L.; Kafri, R.; Kirschner, M.W.; Clish, C.B.; Mootha, V.K. Metabolite Profiling Identifies a Key Role for Glycine in Rapid Cancer Cell Proliferation. *Science* **2012**, *336*, 1040–1044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Xie, G.; Zhou, B.; Zhao, A.; Qiu, Y.; Zhao, X.; Garmire, L.; Shvetsov, Y.B.; Yu, H.; Yen, Y.; Jia, W. Lowered circulating aspartate is a metabolic feature of human breast cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 33369–33381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Singh, A.; Sharma, R.K.; Chagtoo, M.; Agarwal, G.; George, N.; Sinha, N.; Godbole, M.M. ¹H NMR metabolomics reveals association of high expression of inositol 1, 4, 5 trisphosphate receptor and metabolites in breast cancer patients. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0169330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Hadi, N.I.; Jamal, Q.; Iqbal, A.; Shaikh, F.; Somroo, S.; Musharraf, S.G. Serum Metabolomic Profiles for Breast Cancer Diagnosis, Grading and Staging by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Jové, M.; Collado, R.; Quiles, J.L.; Sol, J.; Ruiz-sanjuan, M.; Fernandez, M.; De, C.; Pamplona, R. A plasma metabolomic signature discloses human breast cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 19522–19533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Flote, V.G.; Vettukattil, R.; Bathen, T.F.; Egeland, T.; McTiernan, A.; Frydenberg, H.; Husøy, A.; Finstad, S.E.; Lømo, J.; Garred, Ø.; et al. Lipoprotein subfractions by nuclear magnetic resonance are associated with tumor characteristics in breast cancer. *Lipids Health Dis.* **2016**, *15*, 56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Richard, V.; Conotte, R.; Mayne, D.; Colet, J.-M. Does the ¹H-NMR plasma metabolome reflect the host-tumor interactions in human breast cancer? *Oncotarget* **2017**, *8*, 49915–49930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Fuss, T.L.; Cheng, L.L. Evaluation of cancer metabolomics using ex vivo high resolution magic angle spinning (HRMAS) magnetic resonance spectroscopy (MRS). *Metabolites* **2016**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Haukaas, T.H.; Euceda, L.R.; Giskeødegård, G.F.; Bathen, T.F. Metabolic portraits of breast cancer by HR MAS MR spectroscopy of intact tissue samples. *Metabolites* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. El Ansari, R.; McIntyre, A.; Craze, M.L.; Ellis, I.O.; Rakha, E.A.; Green, A.R. Altered glutamine metabolism in breast cancer; subtype dependencies and alternative adaptations. *Histopathology* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Ryu, C.S.; Kwak, H.C.; Lee, K.S.; Kang, K.W.; Oh, S.J.; Lee, K.H.; Kim, H.M.; Ma, J.Y.; Kim, S.K. Sulfur amino acid metabolism in doxorubicin-resistant breast cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2011**, *255*, 94–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Cao, B.; Li, M.; Zha, W.; Zhao, Q.; Gu, R.; Liu, L.; Shi, J.; Zhou, J.; Zhou, F.; Wu, X.; et al. Metabolomic approach to evaluating adriamycin pharmacodynamics and resistance in breast cancer cells. *Metabolomics* **2013**, *9*, 960–973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Morvan, D. Functional metabolomics uncovers metabolic alterations associated to severe oxidative stress in MCF7 breast cancer cells exposed to ascididemin. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 3846–3860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Bayet-Robert, M.; Morvan, D. Metabolomics Reveals Metabolic Targets and Biphasic Responses in Breast Cancer Cells Treated by Curcumin Alone and in Association with Docetaxel. *PLoS ONE* **2013**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Stewart, D.A.; Winnike, J.H.; McRitchie, S.L.; Clark, R.F.; Pathmasiri, W.W.; Sumner, S.J. Metabolomics Analysis of Hormone-Responsive and Triple-Negative Breast Cancer Cell Responses to Paclitaxel Identify Key Metabolic Differences. *J. Proteome Res.* **2016**, *15*, 3225–3240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Miolo, G.; Muraro, E.; Caruso, D.; Crivellari, D.; Ash, A.; Scalone, S.; Lombardi, D.; Rizzolio, F.; Giordano, A.; Corona, G. Pharmacometabolomics study identifies circulating spermidine and tryptophan as potential biomarkers associated with the complete pathological response to trastuzumab-paclitaxel neoadjuvant therapy in HER-2 positive breast cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 5657–5670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Maria, R.M.; Altei, W.F.; Selistre-de-Araujo, H.S.; Colnago, L.A. Impact of chemotherapy on metabolic reprogramming: Characterization of the metabolic profile of breast cancer MDA-MB-231 cells using ¹H HR-MAS NMR spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *146*, 324–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

105. Wei, J.; Xiang, L.; Yuan, Z.; Li, S.; Yang, C.; Liu, H.; Jiang, Y.; Cai, Z. Metabolic profiling on the effect of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in MCF-7 cells. *Chemosphere* **2018**, *192*, 297–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Van Asten, J.J.A.; Vettukattil, R.; Buckle, T.; Rottenberg, S.; van Leeuwen, F.; Bathen, T.F.; Heerschap, A. Increased levels of choline metabolites are an early marker of docetaxel treatment response in BRCA1-mutated mouse mammary tumors: An assessment by ex vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *J. Transl. Med.* **2015**, *13*, 114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Euceda, L.R.; Haukaas, T.H.; Giskeødegård, G.F.; Vettukattil, R.; Engel, J.; Silwal-Pandit, L.; Lundgren, S.; Borgen, E.; Garred, Ø.; Postma, G.; et al. Evaluation of metabolomic changes during neoadjuvant chemotherapy combined with bevacizumab in breast cancer using MR spectroscopy. *Metabolomics* **2017**, *13*, 1–14. [[CrossRef](#)]
108. Wei, S.; Liu, L.; Zhang, J.; Bowers, J.; Gowda, G.A.N.; Seeger, H.; Fehm, T.; Neubauer, H.J.; Vogel, U.; Clare, S.E.; et al. Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Mol. Oncol.* **2013**, *7*, 297–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Moestue, S.; Sitter, B.; Frost Bathen, T.; Tessem, M.-B.; Susann Gribbestad, I. HR MAS MR Spectroscopy in Metabolic Characterization of Cancer. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 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 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Article

Multiplatform Investigation of Plasma and Tissue Lipid Signatures of Breast Cancer Using Mass Spectrometry Tools

Alex Ap. Rosini Silva ^{1,†}, Marcella R. Cardoso ^{2,†} , Luciana Montes Rezende ², John Q. Lin ³ , Fernando Guimaraes ² , Geisilene R. Paiva Silva ⁴, Michael Murgu ⁵, Denise Gonçalves Priolli ¹, Marcos N. Eberlin ⁶, Alessandra Tata ⁷, Livia S. Eberlin ³ , Sophie F. M. Derchain ² and Andreia M. Porcari ^{1,*}

¹ Postgraduate Program of Health Sciences, São Francisco University, Bragança Paulista SP 12916-900, Brazil; alexrosinisilva@hotmail.com (A.A.R.S.); denise.priolli@usf.edu.br (D.G.P.)

² Department of Gynecological and Breast Oncology, Women's Hospital (CAISM), Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas SP 13083-881, Brazil; macardoso86@hotmail.com (M.R.C.); luciana_mrezende@hotmail.com (L.M.R.); fernando@caism.unicamp.br (F.G.); derchain@fcm.unicamp.br (S.F.M.D.)

³ Department of Chemistry, The University of Texas at Austin, Austin, TX 78712, USA; john@jqlin.com (J.Q.L.); liviase@utexas.edu (L.S.E.)

⁴ Laboratory of Molecular and Investigative Pathology—LAPE, Women's Hospital (CAISM), Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas SP 13083-881, Brazil; geisi@unicamp.br

⁵ Waters Corporation, São Paulo, SP 13083-970, Brazil; Michael_Murgu@waters.com

⁶ School of Engineering, Mackenzie Presbyterian University, São Paulo SP 01302-907, Brazil; mneberlin@gmail.com

⁷ Laboratorio di Chimica Sperimentale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale Fiume 78, 36100 Vicenza, Italy; atata@izsvenezie.it

* Correspondence: andreia.porcari@usf.edu.br; Tel.: +55-11-2454-8047

† These authors contributed equally to this work.

Received: 9 April 2020; Accepted: 8 May 2020; Published: 20 May 2020



Abstract: Plasma and tissue from breast cancer patients are valuable for diagnostic/prognostic purposes and are accessible by multiple mass spectrometry (MS) tools. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and ambient mass spectrometry imaging (MSI) were shown to be robust and reproducible technologies for breast cancer diagnosis. Here, we investigated whether there is a correspondence between lipid cancer features observed by desorption electrospray ionization (DESI)-MSI in tissue and those detected by LC-MS in plasma samples. The study included 28 tissues and 20 plasma samples from 24 women with ductal breast carcinomas of both special and no special type (NST) along with 22 plasma samples from healthy women. The comparison of plasma and tissue lipid signatures revealed that each one of the studied matrices (i.e., blood or tumor) has its own specific molecular signature and the full interposition of their discriminant ions is not possible. This comparison also revealed that the molecular indicators of tissue injury, characteristic of the breast cancer tissue profile obtained by DESI-MSI, do not persist as cancer discriminators in peripheral blood even though some of them could be found in plasma samples.

Keywords: breast cancer; liquid chromatography-mass spectrometry; desorption-electrospray-ionization—mass spectrometry imaging; lipidomics; plasma; tumor tissue

1. Introduction

The use of omics technologies for breast cancer investigations has impacted our understanding of how the molecular alterations, at multiple levels, lead to carcinogenesis [1]. Although no significant clinical gains have been conquered yet, metabolomics and lipidomics studies have led to the discovery of an increasing number of molecules suggested as possible biomarkers for breast cancer [2]. Robust biomarkers, able to improve diagnosis and prognosis, are highly attractive and multiple analytical platforms may act as complementary tools in the search for them. Powerful features such as superior sensitivity, simultaneous detection of multiple compounds, ability to employ small sample volumes, and ease of coupling to chromatographic techniques have allowed mass spectrometry (MS) to occupy an increasingly prominent place in clinical diagnosis [3].

In the field of clinical diagnosis, liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) has been extensively exploited for blood analysis of breast cancer patients to achieve early diagnosis [4–11], metabolic reprogramming [12,13], cancer typing or staging [14] and therapeutic intervention response [15], as recently reviewed [16–18].

While LC-MS is very suitable for biofluid analysis, MS imaging (MSI) is another outstanding MS technique that has gained attention for direct tissue analysis [19,20]. MSI provides comprehensive information on the distribution of the molecules directly over the surface of samples. MS-based tissue imaging applied to clinical research has been accelerated by the development of ambient ionization MS, that allows the samples to be analyzed with minimal or no sample preparation, in an open environment and at atmospheric pressure [21]. Other features such as the shorter time and the non-destructive nature of the analysis have motivated investigations using ambient MSI in the intra-operative environment [22,23]. Ambient MSI is being increasingly used for metabolomics investigations with a particular interest in lipids since these molecules are abundant over cell membranes and easily ionized under ambient conditions [24–27]. Desorption-electrospray-ionization-MSI (DESI-MSI) is one of the most prominent ambient MSI techniques and has recently demonstrated its value in the study of breast cancer. DESI-MSI has proved to be a robust and reproducible technology for rapid breast-cancer-tissue diagnosis and margin analysis [28–32], differentiation of necrotic areas in breast cancer [33], and identification of in situ and invasive area of breast carcinoma across the different molecular subtypes [34].

Using DESI-MSI, our lab recently carried out a multicenter investigation [28] for a diverse population set comprising different patient races from different countries and built statistical classifiers able to discriminate no special type (NST) invasive ductal carcinoma (IDC) tissue from normal tissue. The model was also able to predict the status of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the resulting hormone receptor status (HR) in IDC. Overall, DESI-MSI enabled us to discriminate distinct histological regions over the tissue, and molecular signatures specific of carcinoma cells were selected from the surrounding stroma, vessels, adipose tissue, and normal glands, besides generating a robust predictive statistical model for breast cancer diagnosis. In the present study, we wondered whether a correspondence exists between lipid cancer signatures observed by DESI-MSI of cancer tissue and those detected by LC-MS in plasma.

To answer this question, we first carried out an accurate literature search and realized that only a few studies correlated the lipid profile of tissues obtained by DESI-MSI to those obtained by LC-MS [35–38]. Abbassi-Ghadi et al. compared DESI-MS lipid profiling of tissue to LC-MS lipid profiling of the same excised and extracted tissue [39]. The authors demonstrated that the lipid profile observed by DESI-MS is congruent to that obtained by LC-MS, which confirmed the role of DESI-MS for lipid profiling as a stand-alone technique. To the best of our knowledge, a comparison between the cancerous biomarkers recovered by LC-MS in circulating plasma and those detected through direct tissue analysis by DESI-MS has not been made yet.

Therefore, in this pilot study, the lipid profile of plasma obtained by LC-MS was correlated to that revealed by DESI-MSI of core biopsies and excised tumors of Brazilian women with breast cancer. Both special and NST types of carcinoma were evaluated using the model described by our group [28]

as a complementary validation set. To determine putative plasma biomarkers, LC-MS analysis of plasma from cancer women was also compared to a control group.

2. Results

2.1. Molecular Imaging of Breast Tissues by DESI-MSI

Twenty-eight human breast tissue samples were analyzed using DESI-MSI. These samples included 11 special type samples and 17 NST samples obtained from core biopsy fragments or surgical specimens (Supplementary Table S1). DESI-MSI enabled visualization of histological features within ductal carcinoma (DC) samples (i.e., fibrosis, stroma, normal glands, IDC regions, in situ DC, vessels, etc.), as previously reported [28–30]. The molecular images generated could then be correlated with optical images of the hematoxylin & eosin (H&E) stained tissue sections (Figure 1). Indeed, molecular images of the glycerophosphoinositol (PI) and fatty acid (FA) ions could serve as markers for the tumor areas over the tissue. Tumor regions spatially correlated with the distribution of PI(36:2) and FA(20:4). Other lipids such as PI(38:4) showed no specificity around stroma, fibrosis, normal adjacent tissue, or tumor regions and were found over the entire tissue section. Molecular images of both NST and special type samples correctly correlated with the optical images. Figure 1 shows the good correspondence between the optical microscopy images and the ion images of a biopsy fragment of a special type tumor, exemplifying that these molecules are characteristic of cancer, independently of the type of breast cancer and the type of tumor sampling.

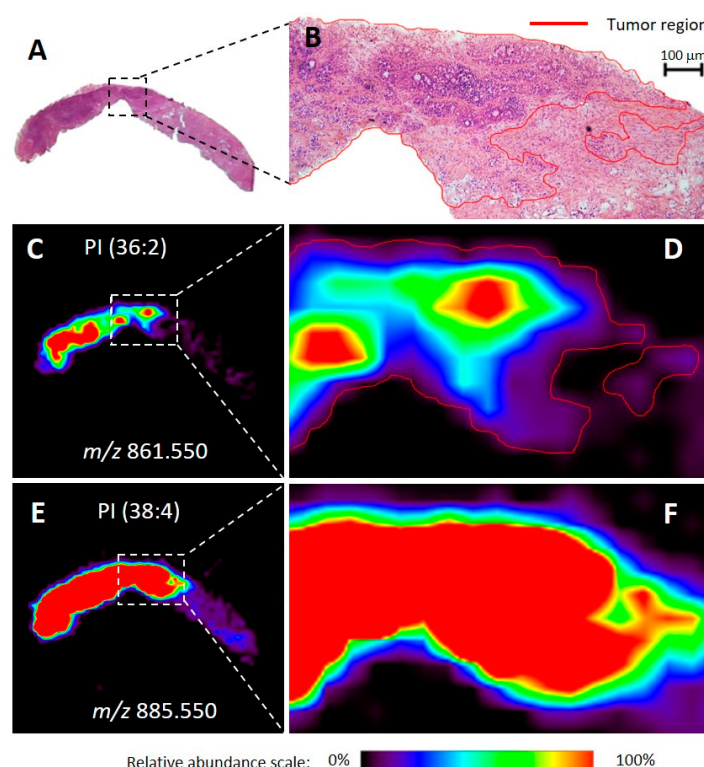


Figure 1. Optical images of hematoxylin & eosin (H&E) stained slides and representative ion images for a biopsied tissue sample diagnosed as invasive apocrine carcinoma of the breast with a signet ring. The entire tissue section is shown in (A) and the optical magnification (40×) of a region is shown in (B), with red-marked tumor areas. The representation of the relative abundance of a tumor discriminatory ion of mass-to-charge ratio (m/z) 861.550 is shown in (C). Zoomed in and outlined in red, (D) shows a comparative perspective with the H&E image above (B). The representation of the relative abundance of a non-discriminatory ion of m/z 885.550 is shown in (E). Also, zoomed-in, (F) shows a comparative perspective with images D and B above. Areas of red intensity within the ion images represent the highest (100%) and black the lowest (0%) relative abundance. PI: glycerophosphoinositol. Lipid species are described by the numbers of fatty acid chain carbons and double bonds.

The set of samples comprising both NST and special type carcinomas, which were collected and analyzed in Brazil, was later submitted to a blind classification test performed in the USA, using the predictive models of NST-IDC built for lipid DESI-MSI data described by our group [28]. All the 28 breast samples, including special type tumors, were correctly classified according to their cancer status (as being cancer or normal samples). The predictive model was also able to define their ER and PR status, as being positive or negative (Figure 2).

The results of the classification test showed that all the 28 samples were correctly predicted as being cancer samples. From these, 6 samples were correctly classified as ER-negative, while 22 samples were classified (also correctly) as ER-positive. Similarly, 5 samples were correctly classified as PR negative, whereas 23 samples were classified (also correctly) as PR positive. The results presented for cancer status prediction, ER and PR status classification showed, therefore, a sensitivity of 100% and specificity of 100%, in a per-patient analysis, regardless of the type of IDC samples (NST- or special type-IDC).

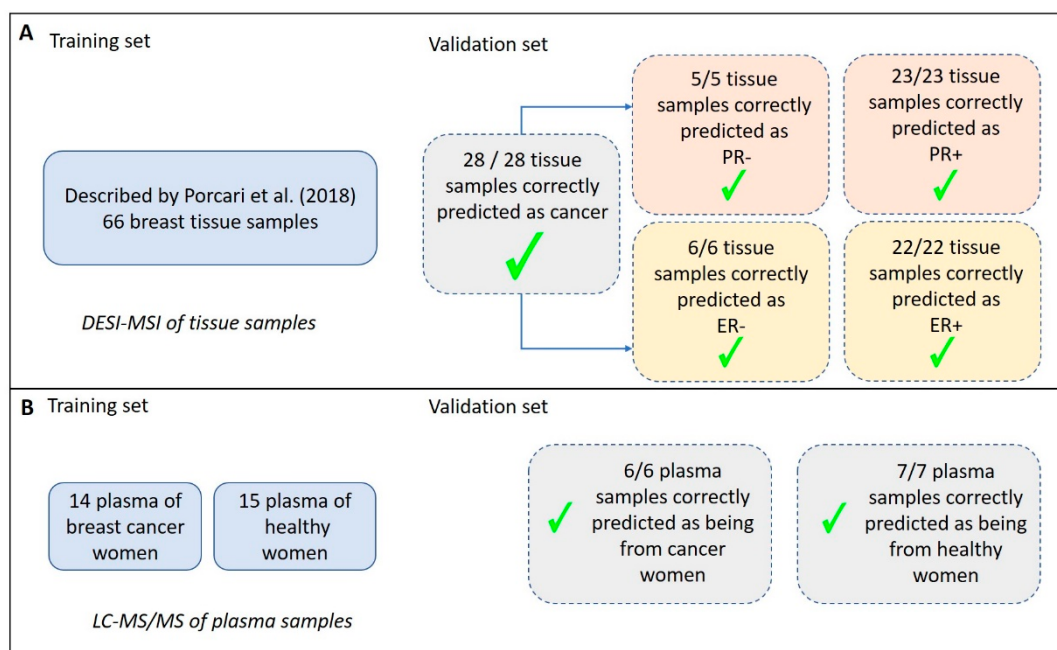


Figure 2. Summary of the classification predictions of breast carcinoma tissue and plasma samples. (A) Results obtained for tissue analysis using DESI-MSI (Desorption-Electrospray-Ionization—Mass Spectrometry Imaging). A previously validated model for classification of samples was described by Porcari et al. [28], with 66 breast cancer samples compared to normal breast tissue, and it was used here as a test set. In the validation set, all the NST (no special type) and special type tissue samples were correctly classified as being cancer and as having +/- Progesterone Receptor (PR) and +/- Estrogen Receptor (ER). (B) Describes the results obtained for plasma analysis using LC-MS/MS (Liquid Chromatography—tandem Mass Spectrometry). The test set was composed of 29 plasma samples and resulted in average accuracies of 99.8% (positive ion mode) and 99.2% (negative ion mode) based on 100 cross-validations. In the validation set, including 30% of the samples, all the plasma samples were correctly classified as being cancer or not.

2.2. Analysis of Plasma by LC-MS/MS

The sum of 42 plasma samples obtained from 22 healthy volunteers (control) and 20 breast cancer women (case) had their organic extracts analyzed by LC-MS/MS. A total of 1434 compounds were detected in positive ion mode, whereas 1480 compounds were detected in negative ion mode. From these, 892 compounds were automatically identified using Progenesis QI based on accurate mass, isotope similarity, and MS^E experiments. In this untargeted approach, the relative intensities of the ions, normalized to the total ion current (TIC), were considered to detect changes among

the groups. Examples of the chromatograms, raw spectra, and feature identification are shown in the Supplementary Figures S1–S3, for the positive and negative ion modes. Using all the detected compounds, unsupervised multivariate analysis was performed for data from both the positive and negative ion modes. Figure 3 shows the Principal Component Analysis (PCA) score plots for both ionization modes. Although some overlap of the 95% confidence level ellipses occurs in both plots, a clear tendency of segregation of cancerous and healthy individuals by PCA is observed.

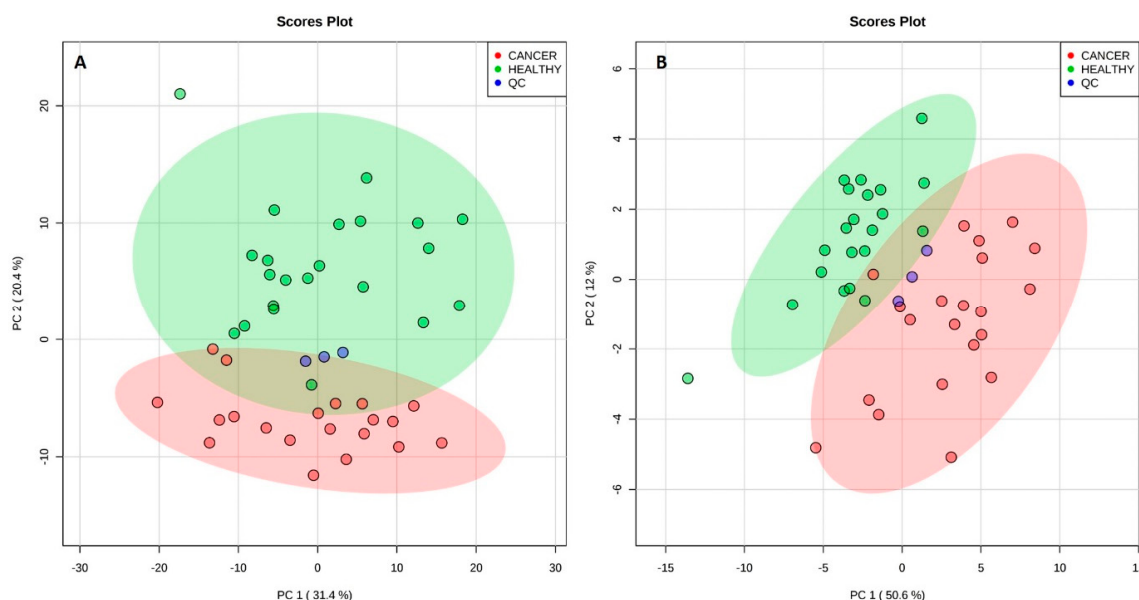


Figure 3. Principal component analysis (PCA) scores plot for plasma analysis in positive ion mode (A) and in negative ion mode (B). Segregation was observed for both modes between cancer and healthy individuals. Quality control (QC) samples (pool of all the samples) are also plotted. The explained amount of the total variance of the full data set is shown for each principal component (PC1–2).

Based on the plasma composition of 70% of the samples (training set) from the two ionization modes, two classification models were built using the Supporting Vector Machine (SVM) algorithm and they were tested for their ability to classify unknown samples (30%) comprising the validation set. SVM models were also used to point out which of the detected molecules would contribute more significantly to such differentiation. To build the classification models, 8 predictive molecular features were selected for positive ion mode, and 9 for negative ion mode. Table 1 shows the selected molecular features together with their possible assignments. Features selection was based on their area under the curve (AUC) value for their individual receiver operating-characteristic (ROC) curves, a parameter that indicates their ability to distinguish between healthy and cancer plasma. The overall prediction power of these two models was estimated based on the AUC of ROC plots obtained from the combination of the AUC of all the selected features. Both models presented the maximum AUC value (1.00), indicating how well the set parameters could distinguish between case and control groups. As Figure 2 summarizes, the resulting SVM models were applied to classify the validation set. Both the SVM models correctly classified 7 out of 7 healthy samples and 6 out of 6 cancer samples, resulting in maximum positive and negative predictive values (PPV/NPV), specificities of 100%, and sensitivity of 100% in a per-patient analysis. The medium probability of correct classification found for the validation set is a value that indicates the probability of each specific sample in the data set to be classified as being part of a determined class. In the present study, this value was found as 93.6% for positive ion mode SVM model and 92.7% for negative ion mode SVM model. If these medium probabilities were close to 0.5 then the model would have insufficient discriminatory power and should not be used for predictions [40].

Table 1. Discriminant ions selected by Supporting Vector Machine (SVM) models (positive and negative ion mode) as significant contributors to the molecular classification of plasma from healthy and cancer women.

Measured m/z	Ion Mode	Species	Lipid Assignment	Proposed Formula	Exact m/z	Mass Error (ppm)
Characteristic of healthy plasma samples						
496.340	+	$[M + H]^+$	LysoPC(16:0)	$C_{24}H_{51}NO_7P$	496.340	0.0
524.371	+	$[M + H]^+$	LysoPC(18:0)	$C_{26}H_{55}NO_7P$	524.372	1.9
782.569	+	$[M + H]^+$	PC(40:4)	$C_{44}H_{81}NO_8P$	782.570	1.3
810.600	+	$[M + H]^+$	PC(38:4)	$C_{46}H_{85}NO_8P$	810.601	1.2
540.330	−	$[M + FA - H]^-$	LysoPC(16:0)	$C_{25}H_{51}NO_9P$	540.330	0.0
568.361	−	$[M + FA - H]^-$	LysoPC(18:0)	$C_{27}H_{55}NO_9P$	568.361	0.0
588.330	−	$[M + FA - H]^-$	LysoPC (20:4)	$C_{29}H_{51}NO_9P$	588.330	0.0
566.346	−	$[M + FA - H]^-$	LysoPC(18:1)	$C_{27}H_{53}NO_9P$	566.346	0.0
Characteristic of cancer plasma samples						
786.600	+	$[M + H]^+$	PC(36:2)	$C_{44}H_{85}NO_8P$	786.601	1.3
796.738	+	$[M + NH_4]^+$	TG (46:0)	$C_{49}H_{98}NO_6$	796.739	1.3
758.570	+	$[M + H]^+$	PC(34:2)	$C_{42}H_{81}NO_8P$	758.570	0.0
824.770	+	$[M + NH_4]^+$	TG(48:0)	$C_{51}H_{102}NO_6$	824.771	1.2
407.294	−	$[M - H_2O - H]^-$	13'-Hydroxy-gamma-tocotrienol	$C_{28}H_{39}O_2$	407.295	2.5
409.310	−	$[M - H]^-$	gamma-tocotrienol	$C_{28}H_{41}O_2$	409.311	2.4
802.559	−	$[M + FA - H]^-$	PC(34:2)/PE-Nme(36:2)	$C_{43}H_{81}NO_{10}P$	802.560	1.2
830.590	−	$[M + FA - H]^-$	PC(36:2)	$C_{45}H_{85}NO_{10}P$	830.591	1.2
776.544	−	$[M + FA - H]^-$	PC(32:1)	$C_{41}H_{79}NO_{10}P$	776.544	0.0

m/z : mass-to-charge ratio; ppm: parts per million; LysoPC: Lysophosphatidylcholine; PC: phosphatidylcholine; TG: triglyceride; PE-Nme: methylphosphatidylethanolamine. Lipid species are described by the numbers of fatty acid chain carbons and double bonds.

2.3. Correspondence of Biomarkers Between Tissue-DESI-MSI and Plasma-LC-MS

To verify the presence of tissue biomarkers among the metabolites detected in plasma, the set of tissue biomarkers reported by Porcari et al. [28] and used to classify the tissue samples of this study were sought among the 892 compounds which had automatically been identified in plasma samples. From the list of 31 compounds previously reported as discriminators of breast cancer by DESI-MSI, 17 were detected among the plasma metabolites. Table 2 summarizes the list of DESI-MSI tissue biomarkers and their occurrence in plasma samples.

Table 2. Tissue biomarkers found by DESI-MSI (Desorption-Electrospray-Ionization—Mass Spectrometry Imaging) and their occurrence in plasma samples of breast cancer patients analyzed by LC-MS/MS (Liquid Chromatography—tandem Mass Spectrometry).

Tissue Biomarkers for No Special Type (NST) Ductal Carcinoma of the Breast [28]	Prevalence in Plasma Samples of Breast Carcinoma (NST and Special Type) Patients According to LC-MS/MS Results
PS(34:1); PE(38:4); PS(38:4); PI(34:1); PS(40:4); PI(36:2); PI(38:3); PE(36:2); PE(O-38:6); PE(O-38:5); PS(36:2); PS(36:1); PC(34:2); PC(34:1); PS(38:1); PI(34:0); PI(38:4)	Yes
PG(34:1); PG(36:2); PG(40:7); PS(O-41:0); Cer(t42:1); CL(72:8); CL(72:7); PA(38:2); PS(O-33:0); PE(O-38:4); PG(36:4); PS(P-36:2); PE(39:5); TG(52:3)	No

PS: glycerophosphoserine, PE: glycerophosphoethanolamine; PI: glycerophosphoinositol; PC: glycerophosphocholine; PG: glycerophosphoglycerol; Cer: ceramide; CL: cardiolipin; PA: phosphatidic acid; TG: triacylglycerol. Lipid species are described by the numbers of fatty acid chain carbons and double bonds.

The set of 17 mutual molecules (Table 2) was used to build a PCA model aimed at distinguishing between the case and control plasma samples (Figure 4). The abundances of these molecules in plasma for negative ion mode were considered. No differentiation of the groups was achieved. An SVM model was also built and showed a near to diagonal line for the ROC curve (Figure S4), confirming the poor differentiation power of this set of molecules.

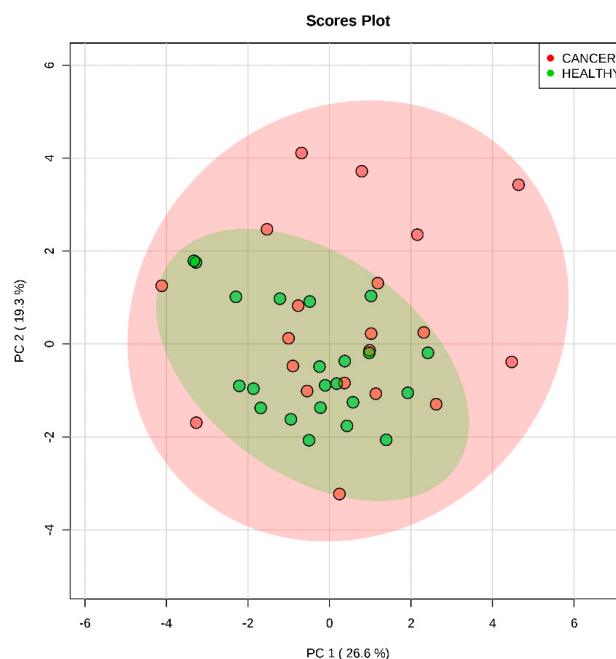


Figure 4. Principal component analysis scores-plot of the differentiation of plasma samples analyzed by LC-MS/MS (Liquid Chromatography—tandem mass spectrometry) using the molecules found in both plasma and tissue by DESI-MSI (Desorption-Electrospray-Ionization—Mass Spectrometry Imaging) [28]. The set of selected features does not enable group differentiation. Principal component (PC) 1 explains 33.3% of the total variance of the full data set, whereas PC2 explains 25.7%.

3. Discussion

In our study, multiple MS techniques were used to establish a comprehensive diagnostic workflow for the different sample types collected from breast patients (i.e., plasma, core biopsy, and surgical specimen). DESI-MSI correctly assigned tumor regions both in pre-surgical and post-surgical tissue slides, in excellent agreement with the pathologist's evaluation. Plasma analysis through LC-MS/MS revealed putative lipid biomarkers for both positive and negative ionization modes and our models showed excellent sensitivities and accuracy in a per-patient analysis. The correlation of plasma and tissue lipids showed that some of the tissue biomarkers were also detected in plasma samples, although these molecules were not found as significant contributors for plasma differentiation among healthy and breast cancer groups.

3.1. Molecular Imaging of Breast Tissues by DESI-MSI

In the present study, we analyzed biopsies and surgical specimens of breast cancer patients including NST and special type tumors, to verify whether our model, previously built based solely on NST samples, would also be able to correctly classify special type tumors.

Our study submitted DESI-MSI data of 28 tissue samples, including 12 samples from special type tumors, to our pre-generated classification model, again with an inter-laboratory approach. Remarkably, 100% of specificity, sensitivity, and accuracy were achieved for this new validation set in a per-patient analysis, even when special tumors were considered. These results emphasize that a single Lasso model built from DESI-MSI can classify inter-laboratory independent sample sets and that the putative biomarkers pointed out by this model for IDC breast tumors are robust enough to differentiate special tumor types.

3.2. Analysis of Plasma by LC-MS/MS

Healthy and cancerous plasmas, as previously reported [8,41,42], have a distinct lipid profile. These differences were able to discriminate these groups both by unsupervised and supervised multivariate analysis. Using the support vector machine (SVM), a multivariate classification method that applies a non-parametric machine learning technique, two sensitive and accurate models for plasma sample differentiation were built [40,43]. These models (built for the positive and negative ionization modes) are independent and complementary to one another. To deepen the understanding of metabolic pathways involved in breast cancer, a set of features was selected to compose the statistical models. Nonetheless, it was observed that a minimal number of features (two features per model, data not shown) would be enough to provide sensitive and accurate classification models, exemplifying the highly discriminant power of lipids for plasma breast cancer differentiation.

Among the molecular contributors for plasma sample differentiation, LysoPC, glycerophospholipids, and triglycerides (TG) were found to be the most important. Indeed, dysregulation of lipid metabolism in tumor cells is known as a hallmark related to the tumors' opportunistic modes of nutrient acquisition [44]. Other studies reported alterations in the abundance of lysoPC among healthy and breast cancer samples which proved to be consistent with both our models [45,46]. As reported by Taylor et al. [47], LysoPC(16:0) and LysoPC(18:0) are the most abundant types of LysoPC in plasma and their decreased level in breast cancer samples could be associated with an activated inflammatory status and a higher metabolism rate in breast cancer cells. LysoPC are derived from the turnover of PC in circulation, as products of lysophospholipase enzymes such as phospholipase A₂ (PLA₂). Yamashita et al. [48] and Yarla et al. [49] reported highly elevated PLA₂ levels in patients with various malignant tumors, especially in breast cancer. Overexpression or enhanced activity of PLA₂ is expected to increase LysoPC levels, and this observation could also explain the relative increase in some PC levels observed for healthy plasma samples. Qiu et al. [41] also reported decreased levels of LysoPC in breast plasma samples when compared to healthy samples. Concerning the TG, their higher abundance in cancer plasma may be related to an increased *de novo* lipogenesis. TG are precursors for the synthesis of phospholipids

and are also an independent source for fatty acid oxidation. These key processes supply energy and membrane lipids for the accelerated cell proliferation required in tumorigenesis [50,51]. Interestingly, some tocotrienol-related metabolites (analogs of vitamin E) were found in higher abundance in the cancer patient's plasma. This fact could be related to the usual supplementation of tocotrienols in breast cancer treatment, as these compounds are claimed to suppress the growth of tumors cells [52].

3.3. Correspondence of Biomarkers Between Tissue and Plasma

Tissue-specific biomarkers previously reported for breast cancer detection were investigated according to their occurrence in plasma. More than half of tissue biomarkers could be found in plasma. This fact reflects how tissue injury may affect peripheral blood composition [53]. Interestingly, none of the tissue-biomarkers had a significant value for plasma differentiation. We believe that this could be related to two different factors: the dilution of specific tissue biomarkers in the peripheral blood and the different extraction methods applied to plasma and tissue samples.

Tissue-specific lipids detected by DESI-MSI, even when observed in plasma samples, were not predictive for plasma differentiation. This may reflect how specific tissue lipids reach the bloodstream and how diluted they are among other non-specific molecules. Although tissue injury may release specific biomarkers in the bloodstream, the most abundant circulating biomarkers could be secondary products of the injured metabolism. For example, the increased levels of LysoPC found in plasma samples corroborates an increased releasing of arachidonic acid, FA(20:4), also due to PLA₂ action. The increased abundance of FA(20:4) was noticed as a marker for tumor region over the tissue. However, FA(20:4) was not directly found as a highly discriminant ion for plasma samples, although this molecule is among those detected and identified in plasma extracts.

Moreover, whereas plasma samples were analyzed after exhaustive solvent extraction (i.e., liquid-liquid extraction), tissue samples were not exhaustively extracted and had only their most abundant superficial molecules desorbed/ionized by the charged droplets of the DESI-MSI spray plume. Besides that, the matrix effect in DESI-MSI analysis must be considered. Molecules that would be suppressed by other more abundant components in DESI-MS analysis may be separated in time over a chromatographic column. This results in their proper ionization, detection, and further recognition as significant components in statistical models.

In summary, our study has brought to the attention of the scientific community a comparison of the molecular signatures of breast cancer found directly over tumor tissue by DESI-MSI with those gathered from plasma extracts of the same breast cancer patients by LC-MS. As supported by the literature [4–9,28–32], both plasma lipid profiles detected by LC-MS and tissue lipid signatures detected by DESI-MSI could be used for diagnostic purposes. However, we have shown for the first time, that each one of the studied matrices has its specific molecular signatures and the interposition of these signatures was not observed across different sample types (i.e., blood or tissue). Although indicators of tissue injury do not prevail as biomarkers in peripheral blood, some of them could be found in plasma samples demonstrating relevant sensitivity and accuracy of the LC-MS method. Our study also enabled the testing of the classification model described in our previous findings [28] for the analysis of an independent sample set, comprising special type carcinomas, in an inter-laboratory experiment. Special type carcinomas had not been previously used for the building of this classification model and the achievement of 100% specificity/sensitivity rates showcases the discriminatory power of the proposed methodology. These results reinforce DESI-MSI as a robust technique to be used for breast cancer diagnosis including the correct classification of special type carcinomas according to their cancer status, and ER/PR status with remarkable specificity, sensitivity, and accuracy.

4. Materials and Methods

4.1. Subjects and Ethical Consent

The case group comprised 24 women with a confirmed diagnosis for breast cancer. The women had their EDTA-blood samples and/or core-needle biopsies and/or surgical specimens collected. Detailed information about the type of sample collected for each subject is described in Supplementary Table S1. Since not every woman presented the three types of samples, this study comprised the collection of 20 EDTA-blood samples, 16 biopsies, and 12 surgical specimens, resulting in 28 tissue samples (Figure 5). All the recruitment was done during their attendance at the Department of Gynecological and Breast Oncology, Women's Hospital (CAISM), at the State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil. The procedures were carried out according to the Helsinki Declaration and written informed consent was obtained from each study participant (CAAE # 69699717.0.0000.5404, 09/05/2017, CEP-UNICAMP). The control group comprised 22 healthy women with no evidence of any personal or family story of breast cancer, who donated their EDTA-blood samples under the same collection protocol and served to provide a representative group of the general population that seeks medical assistance in this region. Written informed consent was also obtained from the control women (CAAE # 25222619.4.0000.5514, 13/12/2019, CEP-USF). Table 3 summarizes the clinicopathologic characteristics of women from the breast cancer group.

Estrogen receptor status, progesterone receptor status and HER2 (human-epidermal-growth-factor-receptor-2) receptors status referred to tissue samples. Special Types: pleomorphic lobular breast carcinoma (N = 1), mixed invasive ductal carcinoma/squamous/metaplastic breast carcinoma (N = 1), mucinous colloid breast carcinoma (N = 4), papillary breast carcinoma (N = 1), apocrine breast carcinoma with signet ring (N = 1).

Table 3. Clinicopathologic characteristics of women with breast cancer.

Characteristics	Patients, N	Median Age (Range)
Core needle biopsy	16	60 (37–80)
Surgical specimen	12	61 (36–81)
Core needle biopsy + surgical specimen	5	63 (37–80)
Plasma	20	58 (36–81)
<i>Tumor type</i>		
Ductal NST (no special type)	16	56 (36–81)
Special Types	8	65 (37–80)
<i>Tumor stage</i>		
I	10	57 (43–77)
II	8	59 (36–81)
III	3	64 (37–80)
IV	3	61 (42–75)
<i>Estrogen receptor status</i>		
Positive	20	58 (36–81)
Negative	4	65 (42–77)
<i>Progesterone receptor status</i>		
Positive	16	56 (36–81)
Negative	8	65 (42–80)
<i>HER2 receptor status</i>		
Positive	6	47 (36–67)
Negative	18	63 (38–81)

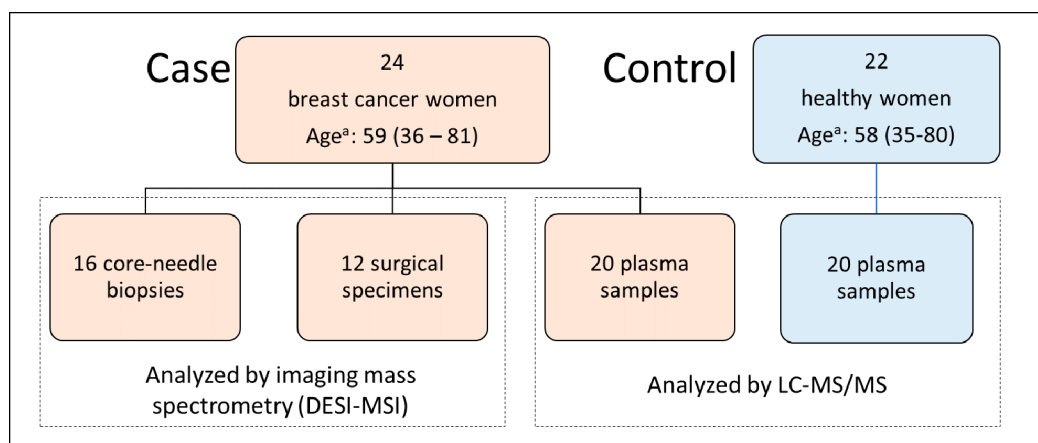


Figure 5. Distribution of samples over case and control groups and the technique of choice employed in each subset: Desorption-Electrospray-Ionization—Mass Spectrometry Imaging (DESI-MSI) for tissue samples and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) for plasma samples.

^a Age is expressed as medium age (range).

4.2. Tissue Samples Analyzed by DESI-MSI

Twenty-eight human breast tissue samples from fragments of core needle biopsy (N = 16) and surgical specimens (N = 12) were collected from women undergoing mastectomy or quadrantectomy as part of their cancer diagnosis and treatment in the Department of Gynecological and Breast Oncology, Women's Hospital (CAISM) and were later submitted to DESI-MSI analysis. For that, immediately after the removal of the surgical specimen, the tissue was macroscopically assessed, and the tumor area was identified. The presence of tumor was later confirmed through histopathology by an expert pathologist. Surgical specimens and biopsy fragments were snap-frozen using liquid nitrogen within a maximum of 4 h after the surgical removal. The samples were then stored at -80°C until they were sectioned for DESI-MSI. Tissue samples were sectioned at 16 μm thick sections using a CryoStarTM NX50 cryostat (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) and stored in a -80°C freezer.

4.3. DESI-MSI Experiments

A 2D Omni Spray DESI imaging platform (Prosolia Inc., Indianapolis, IN) coupled to a Q-Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) was used for tissue imaging. A lab-built sprayer was adapted to the commercial Omni Spray DESI imaging stage and a solution of dimethylformamide/acetonitrile (DMF/ACN) 1:1 (v/v) was sprayed at a flow rate of $1.5\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The samples were screened in negative-ion mode over the m/z range of 100–1200. The resolving power of 70,000 (at m/z 400) was used. The S-lens RF level was set to 100, the spatial resolution of 200 μm was used and the nitrogen gas pressure of the DESI source was 150 psi.

4.4. Plasma Samples Analyzed by LC-MS

Plasma samples were obtained from collected EDTA-bloods which were centrifuged up to 2 h after the collection time and then frozen until the time of extraction at -80°C . Before the extraction protocol, quality control samples were prepared by pooling together an aliquot of each sample from both groups. This pool was further spliced into different microtubes and submitted to sample extraction concomitantly with the other samples. After the extraction, all the samples were submitted to LC-MS analysis using electrospray ionization (ESI) in either positive or negative ion modes using an ACQUITY H-class liquid chromatograph coupled to XEVO-G2XS QTOF (Waters) mass spectrometer.

4.4.1. Lipid Extraction

Plasma samples (150 μL) were extracted with the addition of 600 μL of a $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ solution (2:1, v/v). Afterward, vortex (30 s) and centrifugation (12,000 RPM, 5 min, 4 $^\circ\text{C}$) were carried out and 450 μL of the bottom organic layer were collected and dried under nitrogen flow. Dried samples were stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until the analysis. For analysis, samples were reconstituted in 1 mL of a solution of isopropanol (IPA)/ACN/water (2:1:1, $v/v/v$).

4.4.2. LC-MS Analysis

An ACQUITY UPLC connected to a XEVO-G2XS quadrupole time-of-flight (QTOF) mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) equipped with an electrospray ion source was used. Liquid chromatography was performed using an Acquity UPLC CSH C18 column (2.1 $\times$ 100 mm, 1.7 μm , Waters). Mobile phase A was composed of a solution of 10 mM ammonium formate with 0.1% formic acid in ACN/water (60:40, v/v), while mobile phase B was composed of a solution of 10 mM ammonium formate with 0.1% formic acid in IPA/ACN (90:10, v/v). The flow rate was 0.4 mL min^{-1} . The column was initially eluted with 40% B, increasing to 43% B over 2 min and subsequently to 50% within 0.1 min. Over the next 3.9 min, the gradient was further ramped to 54% B, and then to 70% of B in 0.1 min. In the final part of the gradient, the amount of B was increased to 99% over 1.9 min. Solution B finally returned to 40% in 0.1 min, and the column was equilibrated for 1.9 min before the next injection. The total run time was 10 min. The injection volume was 1 μL . Positive and negative ion modes were recorded (separately) and the instrument was operated in MS^E mode in the m/z range of 50–2000, with an acquisition time of 1 s per scan. Other parameters were as follows: source temperature = 120 $^\circ\text{C}$, desolvation temperature = 600 $^\circ\text{C}$, desolvation gas flow = 800 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, capillary voltage = 2.0 kV(+)/1.5 kV(−), cone voltage = 30 V. Leucine enkephalin (molecular weight = 555.62; 200 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ in 1:1 ACN:H₂O) was used as a lock mass for accurate mass measurements, and a 0.5 mM sodium formate solution was used for calibration. Samples were randomly analyzed and quality control samples were injected every ten injections.

4.4.3. Data Extraction

LC-MS raw files were processed using Progenesis QI 2.0 software (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK), which enabled raw data import, selection of possible adducts, peak alignment, deconvolution, and compound identification based on MS^E experiments. Progenesis QI generates a table of the ions labeled according to their nominal masses and retention times as a function of their intensity for each sample. Examples of the chromatograms, raw spectra, and feature identification are shown in Figures S1–S3, for the positive and negative ion modes.

4.5. Statistical Analysis

For tissue analysis, MS data corresponding to the areas of interest were extracted from the ion images using the MSiReader software [54]. Data preprocessing was performed following Porcari et al. [28]. The previously generated logistic regression model with Lasso (least absolute shrinkage and selection operator) regularization was used to predict tissue samples according to the presence of breast cancer, estrogen receptor (ER) status, and progesterone receptor (PR) status.

For plasma analysis, the list of extracted ions chromatograms per retention time was uploaded to the MetaboAnalyst web platform (<http://www.metaboanalyst.ca>). Data were normalized by sum and auto-scaled. Ions detected in at least 10% of the samples were held for analysis. Comparisons were performed of the case against control groups. For the unsupervised analysis, principal component analysis (PCA) was used. For the supervised analysis through support vector machine (SVM), data were divided into a training set (70% of samples) and a validation set (30% of samples). The training set was composed of plasma of 14 breast cancer women and plasma of 15 healthy women, whereas the validation set was composed of plasma of 6 breast cancer women and 7 healthy women. The biomarker analysis module provided by the Metaboanalyst web platform was used and data was loaded in

the form of a table containing the list of extracted ions chromatograms per retention time and the group label for 70% of the samples. Thirty percent of the samples had no group label (test samples). The same parameters used for PCA were chosen for filtering, normalization, and scaling of the data. The classification method was linear SVM, whereas the selected feature ranking method was built-in SVM. To evaluate the test set, the top 10 features with the highest area under the ROC curve (AUC) value were selected to compose the final SVM model, which was used to classify and provide the medium probability of correct classification for each test sample.

To investigate whether the biomarkers validated as discriminatory for tissue analysis could also be predictive in plasma, the tissue biomarkers detected in plasma were used to build a PCA model. In that way, their discriminatory power regarding plasma samples of case and control groups was evaluated.

Supplementary Materials: Supplementary Materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/10/3611/s1>.

Author Contributions: Study concept and design: S.F.M.D. and A.M.P. Data collection and acquisition: A.A.R.S., M.R.C., L.M.R., M.M., D.G.P., and A.M.P. Data analysis and interpretation: M.M., J.Q.L., F.G., G.R.P.S., D.G.P., S.F.M.D., and A.M.P. Manuscript writing: F.G., A.T., M.N.E., L.S.E., S.F.M.D., and A.M.P. Manuscript editing: all authors. All authors read and approved the final version of the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from the São Paulo Research Foundation (grant 2016/07822-4 for S.F.M.D. and Grant 2019/04314-6 for A.M.P.), grants from The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grant 303742-2018-6 for S.F.M.D.) and grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [grant #001 to A.P.R.S. and M.R.C.].

Acknowledgments: We gratefully acknowledge each woman who participated in this clinical study, and all our nurses, physicians, and staff who were involved in any way.

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

Abbreviations

AUC	Area under the (ROC) curve
CAAE	Brazilian certificate of ethical appreciation approval
CAISM-UNICAMP	Center of integrated assistance to women's health of the University of Campinas
Cer	Ceramide
CL	Cardiolipin
CN:DB	Numbers of fatty acid chain carbons and double bonds in lipid species
DC	Ductal carcinoma
DCIS	In situ ductal carcinoma
DESI-MSI	Desorption-Electrospray-Ionization—Mass Spectrometry
ER	Estrogen receptor
FA	Fatty acid
H&E	Hematoxylin and eosin staining
HER2	Human-epidermal-growth-factor-receptor-2
HR	Hormone receptor status
IDC	Invasive ductal carcinoma of the breast
Lasso	Least absolute shrinkage and selection operator
LC-MS/MS	Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
LC-MS	Liquid chromatography coupled to mass spectrometry
LysoPC	Lysophosphatidylcholine
m/z	Mass-to-charge ratio
MS	Mass Spectrometry
MS ^E	MS data-independent acquisition
MSI	Mass Spectrometry Imaging
NST	no special type carcinoma of the breast
NPV	Negative predictive value
PA	Phosphatidic acid
PC	Glycerophosphocholine

PC1	Principal component 1
PC2	Principal component 2
PCA	Principal Component Analysis
PE	Glycerophosphoethanolamine
PE	Phosphatidylethanolamine
PE-Nme	Methylphosphatidylethanolamine
PG	Glycerophosphoglycerol
PI	Glycerophosphoinositol
ppm	parts per million
PPV	Positive predictive value
PR	Progesterone receptor
PS	Glycerophosphoserine
QC	Quality control sample
ROC	Receiver operating-characteristic (curves)
SVM	Support Vector Machine
TG	Triacylglycerol or Triglyceride
TIC	Total Ion Current

References

- Gogiashvili, M.; Nowacki, J.; Hergenröder, R.; Hengstler, J.G.; Lambert, J.; Edlund, K. HR-MAS NMR Based Quantitative Metabolomics in Breast Cancer. *Metabolites* **2019**, *9*, 19. [\[CrossRef\]](#)
- Hart, C.D.; Tenori, L.; Luchinat, C.; Di Leo, A. Metabolomics in Breast Cancer: Current Status and Perspectives. In *Novel Biomarkers in the Continuum of Breast Cancer*; Stearns, V., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; pp. 217–234.
- Wishart, D.S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 473. [\[CrossRef\]](#)
- Jasbi, P.; Wang, D.; Cheng, S.L.; Fei, Q.; Cui, J.Y.; Liu, L. Breast cancer detection using targeted plasma metabolomics. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2019**, *1105*, 26–37. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Huang, M.; Li, H.-Y.; Liao, H.-W.; Lin, C.-H.; Wang, C.-Y.; Kuo, W.-H.; Kuo, C.-H. Using post-column infused internal standard assisted quantitative metabolomics for establishing prediction models for breast cancer detection. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2019**, *34*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lecuyer, L.; Dalle, C.; Lyan, B.; Demidem, A.; Rossary, A.; Vasson, M.P.; Petera, M.; Lagree, M.; Ferreira, T.; Centeno, D.; et al. Plasma Metabolomic Signatures Associated with Long-term Breast Cancer Risk in the SU.VI.MAX Prospective Cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2019**, *28*, 300–3307. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zhang, Q.; Xu, H.; Liu, R.; Gao, P.; Yang, X.; Jin, W. A Novel Strategy for Targeted Lipidomics Based on LC-Tandem-MS Parameters Prediction, Quantification, and Multiple Statistical Data Mining: Evaluation of Lysophosphatidylcholines as Potential Cancer Biomarkers. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 3389–3396. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cala, M.P.; Aldana, J.; Medina, J.; Sanchez, J.; Guio, J.; Wist, J. Multiplatform plasma metabolic and lipid fingerprinting of breast cancer: A pilot control-case study in Colombian Hispanic women. *PLoS ONE* **2018**, *13*. [\[CrossRef\]](#)
- Zhang, Q.; Liu, R.; Xu, H.; Yang, X.; Zhang, Y.; Wang, Q.; Gao, P.; Bi, K.; Han, T.; Li, Q. Multifunctional isotopic standards based steroidomics strategy: Exploration of cancer screening model. *J. Chromatogr. A* **2020**, *1614*, 460723. [\[CrossRef\]](#)
- Luo, X.; Yu, H.; Song, Y.; Sun, T. Integration of metabolomic and transcriptomic data reveals metabolic pathway alteration in breast cancer and impact of related signature on survival. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234*, 13021–13031. [\[CrossRef\]](#)
- Park, J.; Shin, Y.; Kim, T.H.; Kim, D.H.; Lee, A. Plasma metabolites as possible biomarkers for diagnosis of breast cancer. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0225129. [\[CrossRef\]](#)
- Chen, X.; Chen, H.; Dai, M.; Ai, J.; Li, Y.; Mahon, B.; Dai, S.; Deng, Y. Plasma lipidomics profiling identified lipid biomarkers in distinguishing early-stage breast cancer from benign lesions. *Oncotarget* **2016**, *7*, 36622–36631. [\[CrossRef\]](#)

13. Yamashita, Y.; Nishiumi, S.; Kono, S.; Takao, S.; Azuma, T.; Yoshida, M. Differences in elongation of very long chain fatty acids and fatty acid metabolism between triple-negative and hormone receptor-positive breast cancer. *BMC Cancer* **2017**, *1*, 589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Li, L.; Zheng, X.; Zhou, Q.; Villanueva, N.; Nian, W.; Liu, X.; Huan, T. Metabolomics-Based Discovery of Molecular Signatures for Triple Negative Breast Cancer in Asian Female Population. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lin, X.; Xu, R.; Mao, S.; Zhang, Y.; Dai, Y.; Guo, Q.; Song, X.; Zhang, Q.; Li, L.; Chen, Q. Metabolic biomarker signature for predicting the effect of neoadjuvant chemotherapy of breast cancer. *Ann. Transl. Med.* **2019**, *7*, 670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Silva, C.; Perestrelo, R.; Silva, P.; Tomás, H.; Câmara, J.S. Breast Cancer Metabolomics: From Analytical Platforms to Multivariate Data Analysis. A Review. *Metabolites* **2019**, *9*, 102. [[CrossRef](#)]
17. Cardoso, M.R.; Santos, J.C.; Ribeiro, M.L.; Talarico, M.C.R.; Viana, L.R.; Derchain, S.F.M. A Metabolomic Approach to Predict Breast Cancer Behavior and Chemotherapy Response. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 617. [[CrossRef](#)]
18. McCartney, A.; Vignoli, A.; Biganzoli, L.; Love, R.; Tenori, L.; Luchinat, C.; Di Leo, A. Metabolomics in breast cancer: A decade in review. *Cancer Treat. Rev.* **2018**, *67*, 88–96. [[CrossRef](#)]
19. Leung, F.; Eberlin, L.S.; Schwamborn, K.; Heeren, R.M.; Winograd, N.; Cooks, R.G. Mass Spectrometry-Based Tissue Imaging: The Next Frontier in Clinical Diagnostics? *Clin. Chem.* **2019**, *65*, 510–513. [[CrossRef](#)]
20. Perez, C.J.; Bagga, A.K.; Prova, S.S.; Taemeh, M.Y.; Ifa, D.R. Review and perspectives on the applications of mass spectrometry imaging under ambient conditions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2019**, *33*, 27–53. [[CrossRef](#)]
21. Feider, C.L.; Krieger, A.C.; Dehoog, R.J.; Eberlin, L.S. Ambient ionization mass spectrometry: Recent developments and applications. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 4266–4290. [[CrossRef](#)]
22. Ifa, D.R.; Eberlin, L.S. Ambient Ionization Mass Spectrometry for Cancer Diagnosis and Surgical Margin Evaluation. *Clin. Chem.* **2016**, *62*, 111–123. [[CrossRef](#)]
23. Woolman, M.; Zarrine-Afsar, A. Platforms for rapid cancer characterization by ambient mass spectrometry: Advancements, challenges, and opportunities for improvement towards intrasurgical use. *Analyst* **2018**, *143*, 2717–2722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Jarmusch, A.K.; Pirro, V.; Baird, Z.; Hattab, E.M.; Cohen-Gadol, A.A.; Cooks, R.G. Lipid, and metabolite profiles of human brain tumors by desorption electrospray ionization-MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 1486–1491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Eberlin, L.S.; Ifa, D.R.; Wu, C.; Cooks, R.G. Three-Dimensional Visualization of Mouse Brain by Lipid Analysis Using Ambient Ionization Mass Spectrometry. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2010**, *49*, 873–876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Eberlin, L.S.; Gabay, M.; Fan, A.C.; Gouw, A.M.; Tibshirani, R.J.; Felsher, D.W.; Zare, R.N. Alteration of the lipid profile in lymphomas induced by MYC overexpression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 10450–10455. [[CrossRef](#)]
27. Woolman, M.; Tata, A.; Dara, D.; Meens, J.; D’Arcangelo, E.; Perez, C.J.; Saiyara Prova, S.; Bluemke, E.; Ginsberg, H.J.; Ifa, D.; et al. Rapid determination of the tumour stroma ratio in squamous cell carcinomas with desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS): A proof-of-concept demonstration. *Analyst* **2017**, *142*, 3250–3260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Porcari, A.M.; Zhang, J.; Garza, K.Y.; Rodrigues-Peres, R.M.; Lin, J.Q.; Young, J.H.; Tibshirani, R.; Nagi, C.; Paiva, G.P.; Carter, S.A. Multicenter Study Using Desorption-Electrospray-Ionization-Mass-Spectrometry Imaging for Breast-Cancer Diagnosis. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 11324–11332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Calligaris, D.; Caragacianu, D.; Liu, X.; Norton, I.; Thompson, C.J.; Richardson, A.L.; Golshan, M.; Easterling, M.L.; Santagata, S.; Dillon, D.A.; et al. Application of desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging in breast cancer margin analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 15184–15189. [[CrossRef](#)]
30. Guenther, S.; Muirhead, L.J.; Golf, O.; Strittmatter, N.; Ramakrishnan, R.; Goldin, R.D.; Jones, E.A.; Veselkov, K.; Darzi, A.; Takáts, Z.; et al. Spatially Resolved Metabolic Phenotyping of Breast Cancer by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 1828–1837. [[CrossRef](#)]

31. Tata, A.; Gribble, A.; Ventura, M.; Ganguly, M.; Bluemke, E.; Ginsberg, H.J.; Jaffray, D.A.; Ifa, D.R.; Vitkin, A.; Zarrine-Afsar, A. Wide-field tissue polarimetry allows efficient localized mass spectrometry imaging of biological tissues. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 2162–2169. [[CrossRef](#)]
32. Woolman, M.; Tata, A.; Bluemke, E.; Dara, D.; Ginsberg, H.J.; Zarrine-Afsar, A. An Assessment of the Utility of Tissue Smears in Rapid Cancer Profiling with Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry (DESI-MS). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**, *28*, 145–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Tata, A.; Woolman, M.; Ventura, M.; Bernards, N.; Ganguly, M.; Gribble, A.; Shrestha, B.; Bluemke, E.; Ginsberg, H.J.; Vitkin, A.; et al. Rapid Detection of Necrosis in Breast Cancer with Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 35374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Santoro, A.L.; Drummond, R.D.; Silva, I.T.; Ferreira, S.S.; Juliano, L.; Vendramini, P.H.; Lemos, M.B.D.C.; Eberlin, M.N.; De Andrade, V.P. In Situ DESI-MSI Lipidomic Profiles of Breast Cancer Molecular Subtypes and Precursor Lesions. *Cancer Res.* **2020**, *80*, 1246–1257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kertesz, V.; Van Berkel, G.J.; Vavrek, M.; Koeplinger, K.A.; Schneider, B.B.; Covey, T.R. Comparison of drug distribution images from whole-body thin tissue sections obtained using desorption electrospray ionization tandem mass spectrometry and autoradiography. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5168–5177. [[CrossRef](#)]
36. Wiseman, J.M.; Ifa, D.R.; Zhu, Y.; Kissinger, C.B.; Manicke, N.E.; Kissinger, P.T. Desorption electrospray ionization mass spectrometry: Imaging drugs and metabolites in tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 18120–18125. [[CrossRef](#)]
37. Vismeh, R.; Waldon, D.J.; Teffera, Y.; Zhao, Z. Localization, and quantification of drugs in animal tissues by use of desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5439–5445. [[CrossRef](#)]
38. Tata, A.; Perez, C.; Campos, M.L.; Bayfield, M.A.; Eberlin, M.N.; Ifa, D.R. Imprint Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging for Monitoring Secondary Metabolites Production during Antagonistic Interaction of Fungi. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 12298–12305. [[CrossRef](#)]
39. Abbassi-Ghadi, N.; Jones, E.A.; Romero, M.G.; Golf, O.; Kumar, S.; Huang, J.; Kudo, H.; Goldin, R.D.; Hanna, G.B.; Takáts, Z. A Comparison of DESI-MS and LC-MS for the Lipidomic Profiling of Human Cancer Tissue. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2015**, *27*, 255–264. [[CrossRef](#)]
40. Gromski, P.S.; Muhamadali, H.; Ellis, D.I.; Xu, Y.; Correa, E.; Turner, M.L.; Goodacre, R. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis—a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *879*, 10–23. [[CrossRef](#)]
41. Qiu, Y.; Zhou, B.; Su, M.; Baxter, S.; Zheng, X.; Zhao, X.; Yen, Y.; Jia, W. Mass Spectrometry-Based Quantitative Metabolomics Revealed a Distinct Lipid Profile in Breast Cancer Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 8047–8061. [[CrossRef](#)]
42. Jiang, N.; Zhang, G.; Pan, L.; Yan, C.; Zhang, L.; Weng, Y.; Wang, W.; Chen, X.; Yang, G. Potential plasma lipid biomarkers in early-stage breast cancer. *Biotechnol. Lett.* **2017**, *39*, 1657–1666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Goodacre, R.; Vaidyanathan, S.; Dunn, W.B.; Harrigan, G.G.; Kell, D.B. Metabolomics by numbers: Acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 245–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Pavlova, N.N.; Thompson, C.B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* **2016**, *23*, 27–47. [[CrossRef](#)]
45. Brglez, V.; Pucer, A.; Pungercar, J.; Lambeau, G.; Petan, T. Secreted phospholipases A (2) are differentially expressed and epigenetically silenced in human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *445*, 230–235. [[CrossRef](#)]
46. Iorio, E.; Caramujo, M.J.; Cecchetti, S.; Spadaro, F.; Carpinelli, G.; Canese, R.; Podo, F. Key Players in Choline Metabolic Reprograming in Triple-Negative Breast Cancer. *Front. Oncol.* **2016**, *6*, 747. [[CrossRef](#)]
47. Taylor, L.A.; Arends, J.; Hodina, A.K.; Unger, C.; Massing, U. Plasma lyso-phosphatidylcholine concentration is decreased in cancer patients with weight loss and activated inflammatory status. *Lipids Heal. Dis.* **2007**, *6*, 17. [[CrossRef](#)]
48. Yamashita, S.; Yamashita, J.; Ogawa, M. Overexpression of group II phospholipase A2 in human breast cancer tissues is closely associated with their malignant potency. *Br. J. Cancer* **1994**, *69*, 1166–1170. [[CrossRef](#)]
49. Yarla, N.S.; Satyakumar, K.; Srinivasu, D.; Dsvkg, K.; Aliev, G.; Dharmapuri, G. Phospholipase A2: A Potential Therapeutic Target in Inflammation and Cancer (In silico, In vitro, In vivo and Clinical Approach). *J. Cancer Sci. Therapy* **2015**, *7*, 249–252.

50. Lofterød, T.; Mortensen, E.S.; Nalwoga, H.; Wilsgaard, T.; Frydenberg, H.; Risberg, T.; Eggen, A.E.; McTiernan, A.; Aziz, S.; Wist, E.A.; et al. Impact of pre-diagnostic triglycerides and HDL-cholesterol on breast cancer recurrence and survival by breast cancer subtypes. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 654. [[CrossRef](#)]
51. Zhang, F.; Du, G. Dysregulated lipid metabolism in cancer. *World J. Biol. Chem.* **2012**, *3*, 167–174. [[CrossRef](#)]
52. Sailo, B.L.; Banik, K.; Padmavathi, G.; Javadi, M.; Bordoloi, D.; Kunnumakkara, A.B. Tocotrienols: The promising analogues of vitamin E for cancer therapeutics. *Pharmacol. Res.* **2018**, *130*, 259–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Sheth, S.A.; Iavarone, A.T.; Liebeskind, D.S.; Won, S.J.; Swanson, R.A. Targeted Lipid Profiling Discovers Plasma Biomarkers of Acute Brain Injury. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0129735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Bokhart, M.; Nazari, M.; Garrard, K.P.; Muddiman, D.C. MSiReader v1.0: Evolving Open-Source Mass Spectrometry Imaging Software for Targeted and Untargeted Analyses. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**, *29*, 8–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 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 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Multiplatform investigation of plasma and tissue lipid signatures of breast cancer using mass spectrometry tools

Alex Ap. Rosini Silva ^{1,†}, Marcella R. Cardoso ^{2,†}, Luciana Montes Resende ², John Q. Lin ³, Fernando Guimaraes ², Geisilene R. Paiva Silva ⁴, Michael Murgu ⁵, Denise Gonçalves Priolli ¹, Marcos N. Eberlin⁶, Alessandra Tata ⁷, Livia S. Eberlin ³, Sophie F. M. Derchain ² and Andreia M. Porcari ^{1,*}

¹ Postgraduate Program of Health Sciences, São Francisco University, Bragança Paulista, SP 12916-900, Brazil; alexrosinisilva@hotmail.com (A.A.R.S.); denise.priolli@usf.edu.br (D.G.P.)

² Department of Gynecological and Breast Oncology, Women's Hospital (CAISM), Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP 13083-881, Brazil; macardoso86@hotmail.com (M.C.); luciana_mrezende@hotmail.com (L.M.R.); fernando@caism.unicamp.br (F.G.); derchain@fcm.unicamp.br (S.F.M.D.)

³ Department of Chemistry, The University of Texas at Austin, Austin, TX 78712, United States; john@jqlin.com (J.Q.L.); liviase@utexas.edu (L.S.E.)

⁴ Laboratory of Molecular and Investigative Pathology – LAPE, Women's Hospital (CAISM), Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP) – Campinas, SP 13083-881, Brazil; geisi@unicamp.br (G.R.P.S.)

⁵ Waters Corporation, São Paulo, SP 13083-970, Brazil; Michael_Murgu@waters.com (M.M.)

⁶ Mackenzie Presbyterian University, School of Engineering, São Paulo, SP 01302-907, Brazil; mneberlin@gmail.com

⁷ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Chimica Sperimentale, Viale Fiume 78, Vicenza, Italy; atata@izsvenezie.it

[†] These authors contributed equally to this work

^{*} Correspondence: andreia.porcari@usf.edu.br Tel.; +55-11-2454-8047

Supplementary information contains:

- A table with the summary of the type of samples collected for each breast cancer woman
- Supplementary Figures

Supplementary Table S1: Summary of the type of samples collected for each breast cancer woman

Subject #	Type of sample			Type
	plasma	biopsy	surgical specimen	NST ¹ / ST ²
1	yes	yes	yes	ST
2	yes	yes	yes	ST
3	yes	yes	yes	NST
4	yes	yes	yes	NST
5	yes	yes	yes	ST
6	yes	yes	no	ST
7	yes	yes	no	NST
8	yes	yes	no	NST
9	yes	yes	no	NST
10	yes	yes	no	NST
11	yes	yes	no	NST
12	yes	yes	no	ST
13	yes	yes	no	NST
14	yes	yes	no	ST
15	yes	no	yes	NST
16	yes	no	yes	NST
17	yes	no	yes	ST
18	yes	no	yes	NST
19	yes	no	yes	ST
20	yes	no	no	NST
21	no	yes	no	NST
22	no	yes	no	NST
23	no	no	yes	NST
24	no	no	yes	NST

¹ST: special type ductal carcinoma of the breast. ²NST: no special type.

Note: We included 24 women with breast cancer. From them, 20 women had blood samples collected and 23 had cancer breast tissue collected. Among women who had their tissue collected, 11 of them had only biopsy, 7 had only surgical specimens and 5 had biopsy and surgical specimens.

Supplementary Figures

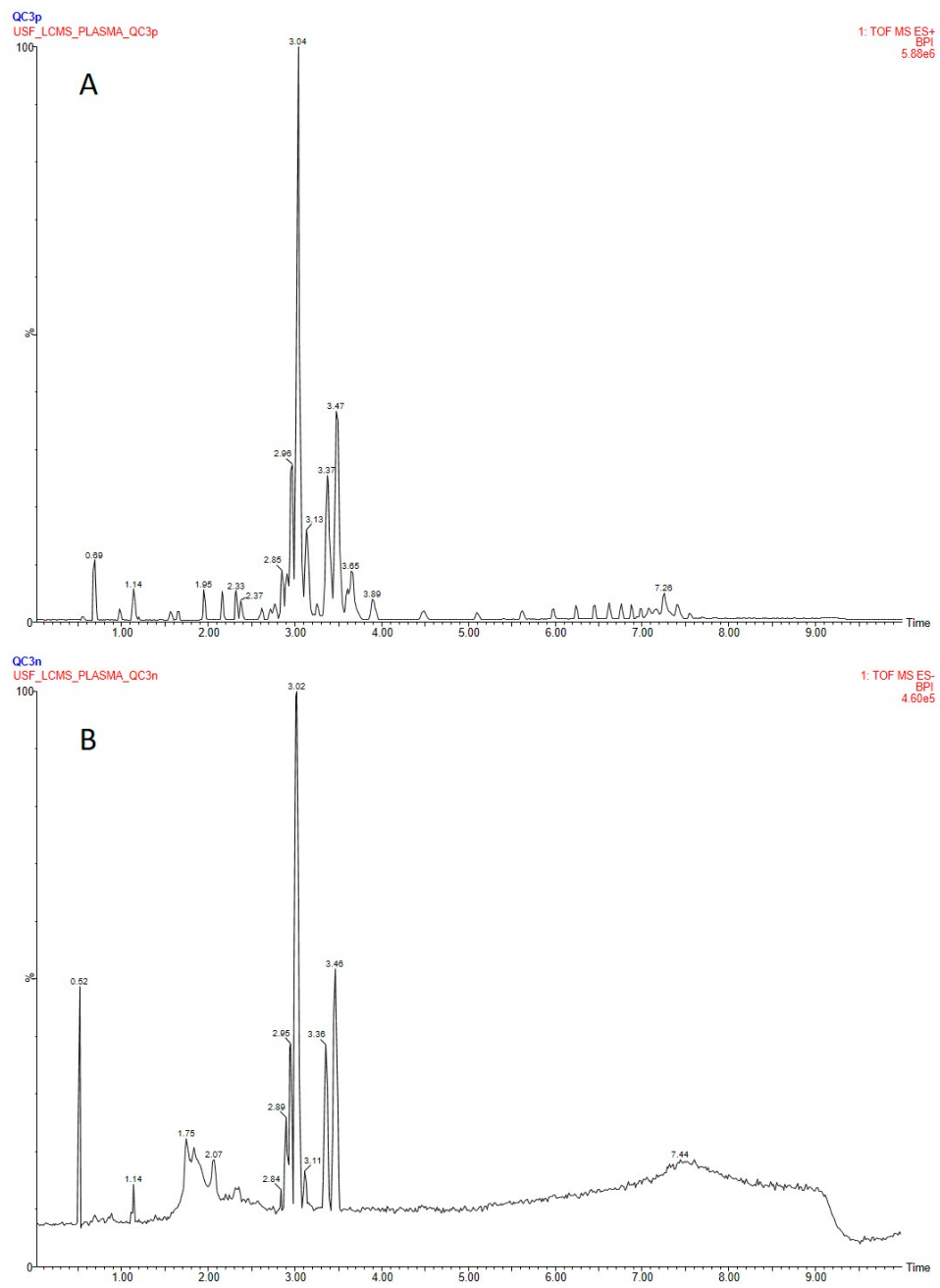


Figure S1: Base peak ion (BPI) chromatograms for a representative quality control (QC) sample acquired in (A) the positive ion mode and (B) the negative ion mode.

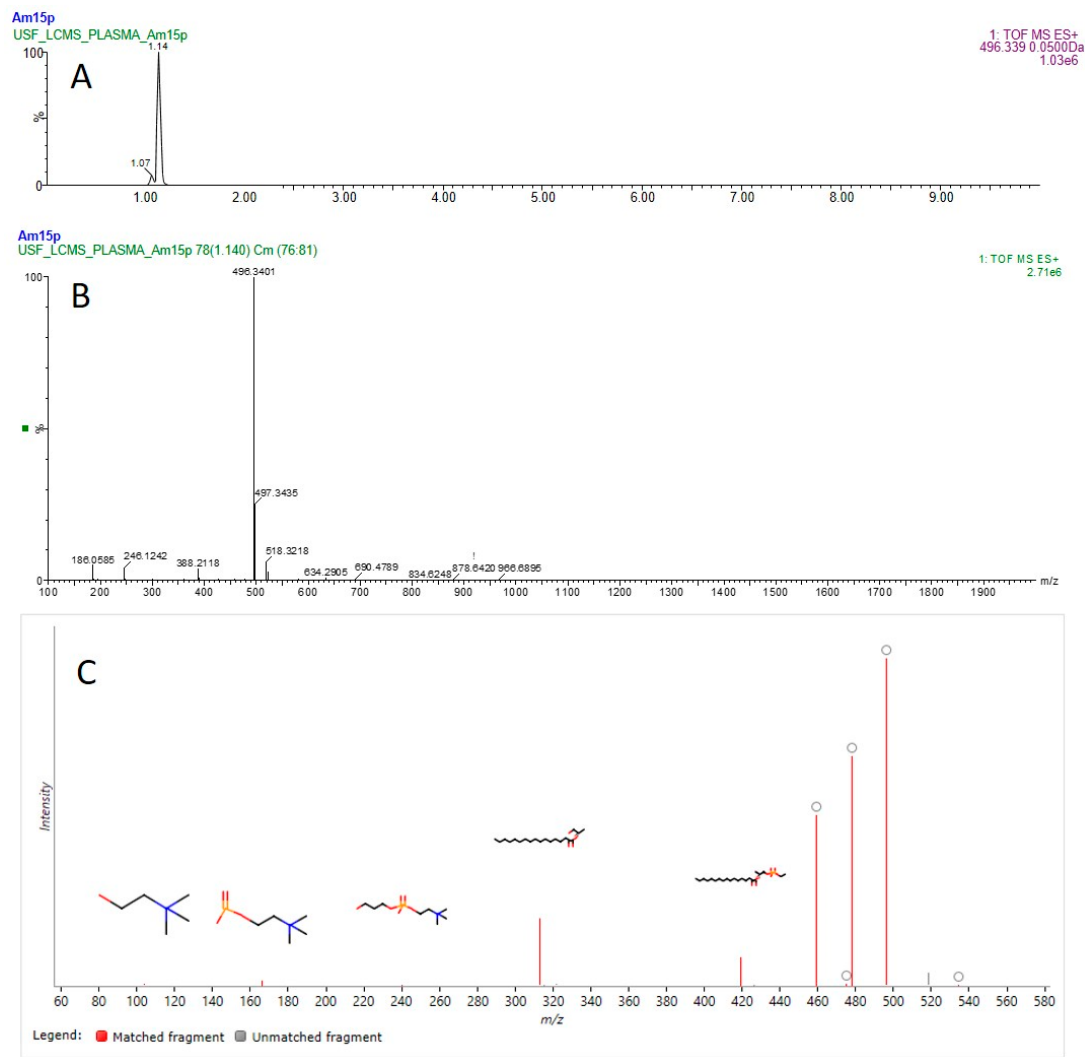


Figure S2: Data for one characteristic ion of healthy plasma samples observed in the positive ion mode. The LysoPC (16:0), observed as the $[M + H]^+$ adduct at m/z 496.3399. The extracted ion chromatogram (EIC) is shown in (A). The low-energy mass spectrum is shown in (B). The deconvoluted fragmentation spectrum obtained by Progenesis QI (Waters), showing the identifying fragments is shown in (C), where red signalizes the matched fragments, according to theoretical fragmentation.

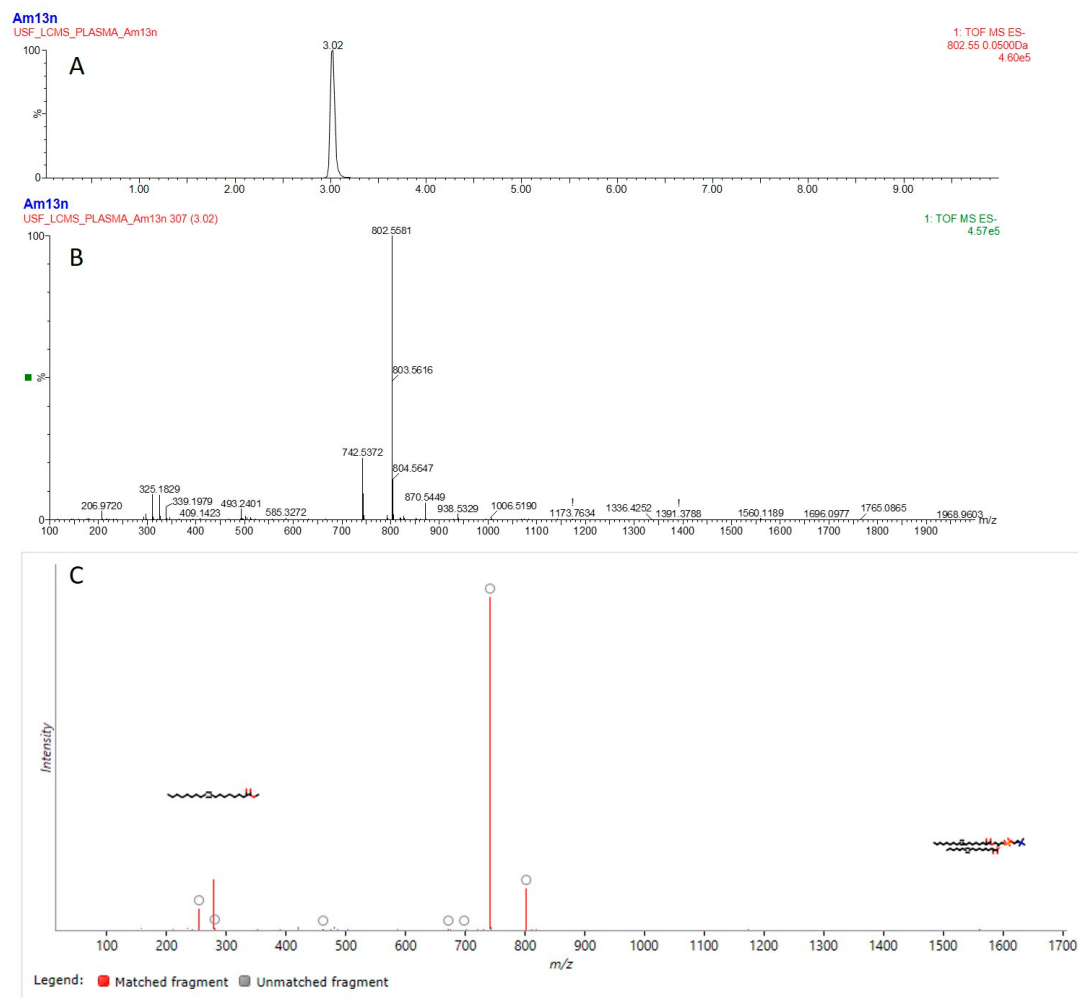


Figure S3: Data for one characteristic ion of cancer plasma samples observed in the negative ion mode. The PC(34:2)/PE-Nme(36:2), observed as the $[M + FA - H]^-$ adduct at m/z 802.5593. The extracted ion chromatogram (EIC) is shown in (A). The low-energy mass spectrum is shown in (B). The deconvoluted fragmentation spectrum obtained by Progenesis Q1 (Waters), showing the identifying fragments is shown in (C), where red signalizes the matched fragments, according to theoretical fragmentation.

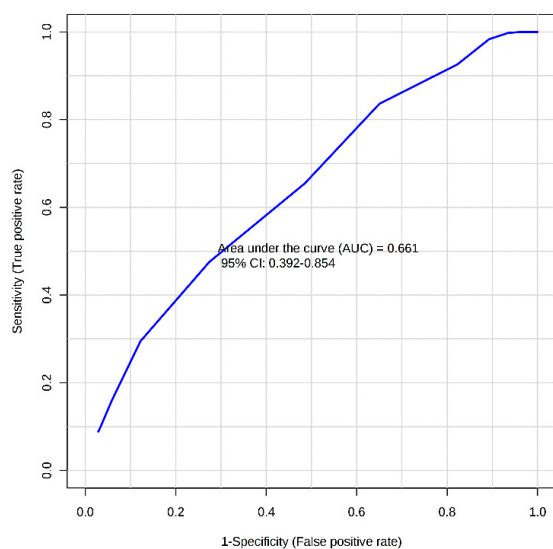


Figure S4: Receiver operator characteristics (ROC) curve for the support vector machine (SVM) model for differentiation among cancer and health status based on plasma lipids listed as molecular signatures for tissue differentiation using imaging mass spectrometry. A near to diagonal ROC curve represents an insufficient discriminatory power for the model. AUC is the area under the ROC curve and CI is the confidence interval.



Article

¹H-NMR serum metabolome combined with machine learning predicts the response to neoadjuvant chemotherapy in women with Breast Cancer

Marcella R. Cardoso^{1,2†}, Alex Ap. Rosini Silva^{3†}, Maria Cecília R. Talarico¹, Pedro H. Godoy Sanches³, Maurício L. Sforça⁴, Silvana A. Rocco⁵, Luciana M. Resende⁶, Tassia B.B.C. Costa⁷, Laís R. Viana⁸, Rafael R. Canevarolo⁹, Amanda C. Ferracini¹⁰, Suzana O. B. Ramalho¹, Junier Marrero Gutierrez³, Fernando Guimarães¹¹, Ljubica Tasic⁷, Alessandra Tata¹³, Luís O. Z. Sarian¹, Leo L. Cheng^{2,12}, Andreia M. Porcari^{3†*}, Sophie F. M. Derchain^{1†*}.

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, Division of Gynecologic and Breast Oncology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas), Campinas, São Paulo, 13083881, Brazil (M.R.C., M.C.R.T., S.R., L.O.Z.S., S.F.M.D.)

² Department of Pathology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, 02129, USA (M.R.C., L.L.C.)

³ MS4Life Laboratory of Mass Spectrometry, Health Sciences Postgraduate Program, São Francisco University, Bragança Paulista, São Paulo, 12916900, Brazil. (A.A.R.S, P.H.G.S., J.M.G., A.M.P.)

⁴ Nuclear Magnetic Resonance Laboratory of National Laboratory of Biosciences of National Center for Research in Energy and Materials, Campinas, São Paulo, 13083970, Brazil (M.L.S.)

⁵ Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, São Paulo, 13083970, Brazil (S.A.R.)

⁶ Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas – (UNICAMP), Campinas, São Paulo, 13083887, Brazil (L.M.R.)

⁷ Laboratory of Chemical Biology, Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil (T.B.B.C.C., L.T.)

⁸ Laboratory of Nutrition and Cancer, Department of Structural and Functional Biology, Biology Institute, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, 13083862, Brazil (L.R.V.)

⁹ Department of Cancer Physiology, H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, Tampa, FL, 33612, USA (R.R.C.)

¹⁰ Postgraduate Program in Medical Sciences, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, 13083970, Brazil (A.C.F.)

¹¹ Women's Hospital Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti, Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, 13083881, Brazil (F.G.)

¹² Department of Radiology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, 02129, USA (L.L.C.)

¹³ Laboratorio di Chimica Sperimentale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), Viale Fiume 78, 36100 Vicenza, Italy (A.T.)

* Correspondence: andrea.porcari@usf.edu.br; Tel.: +55 11 2454-8047 (A.M.P.); derchain@fcm.unicamp.br (S.F.M.D.)

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date
Accepted: date
Published: date

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



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Neoadjuvant chemotherapy (NACT) is offered to most operable breast cancer (BC) patients to downstage the disease and provide more conservative surgeries. These benefits are not enjoyed by NACT-resistant BC patients, who suffer the side effects and delay the start of the effective treatment. Early prediction of the response to NACT is urgently needed. Herein, nuclear magnetic resonance (NMR) was used to investigate the metabolic profiles of pre-treatment sera of 80 BC patients and correlate them with the response to NACT. The NMR metabolic panel was combined with the clinical information related to the hormonal receptors (HR), the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), and the nuclear protein Ki67, and modeled by machine learning. The resulting classification models achieved sensitivities of 83/100%, specificities of 83/75%, and accuracies of 83/90% for the training/validation sets, respectively, for predicting the response to NACT. Leucine, formate, valine, and proline, along with hormone receptor status, were discriminants of the response to NACT. The metabolism of glyoxylate and dicarboxylate was found to be the most involved in the acquisition of resistance. Our results suggest NMR as a powerful approach for rapid prediction of the response to NACT based on altered metabolic signatures of the serum.

Keywords: Amino Acids; Breast Cancer; Metabolomics; Nuclear Magnetic Resonance; Response to Treatment, Resistance.

1. Introduction

Breast cancer (BC) is the most common cancer worldwide [1]. Invasive carcinoma is responsible for almost 100% of BC cases, but the disease has several phenotypic and genotypic subtypes [2]. Molecular and immunohistochemical markers are used in research and clinical scenarios to classify BC into its currently known subtypes. Briefly, classification is based on the expression of hormonal receptors (HR) such as estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), and the nuclear protein Ki67, which is a marker of cell proliferation. These markers bear a strict relationship with prognosis and therapeutic decisions that are often taken based on their expression [3,4].

Neoadjuvant chemotherapy (NACT) has gained momentum in recent years due to its ability to upfront reduce tumor size and cancer burden, thus avoiding mutilating surgical procedures [5]. NACT is also a bench test for the tumor's sensitivity to chemotherapy. BC patients who achieved a pathological complete response (pCR) after NACT showed higher rates of disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) than women with residual disease in their surgical specimens obtained after NACT [6].

Unfortunately, patients with HR-positive tumors have a lower probability of achieving pCR after NACT compared to patients with HER2 positive and triple-negative tumors [7]. The well-known HR, HER2, and Ki67 marker triad seem to explain a substantial portion of the NACT response variability. Nevertheless, a better understanding of the mechanisms that define the response to NACT is still needed to determine which patients will gain clinical benefits from NACT. Unfortunately, many patients, undergoing NACT, only face the adverse effects of therapy without enjoying pCR, and oncologists are largely incapable to predict unsuccessful outcomes.

In order to further improve the knowledge of the molecular events leading to pCR after NACT, we designed and carried out the present metabolomic study, aiming at constructing a biomolecular and metabolic portrait of the biochemical processes in fluids and tissues of BC patients undergoing NACT [8-10]. So far a few studies have evaluated metabolites associated with better response to NACT using metabolomics [11-13]. In the present study, using nuclear magnetic resonance (NMR), we analyzed serum metabolites from patients of different molecular subtypes of BC who had undergone NACT. We created machine learning classifiers by correlating the observed metabolites with the

expression of BC markers. These models were able to predict the response to NACT using pre-treatment serum samples.

2. Results

2.1 Subjects and clinical features

Eighty BC women, undergoing NACT, were included in this study. Table 1 shows the distribution of women according to disease characteristics and response to NACT. All patients had invasive ductal carcinoma (100%), most of which were histological grade 3 (51%), ER-positive (71%), and PR-positive (65%). The evaluation of response to NACT according to the Residual Cancer Burden (RCB) guidelines resulted in the following classes: complete pathological response (pCR); RCB-I (minimum residual disease); RCB-II (moderate residual disease), and RCB-III (extensive residual disease) [14,15]. For statistical analyses, all cases were clustered into two major groups based on the response to NACT: (a) cases with a pCR and RCB-I, considered as sensitive and (b) cases with residual breast carcinoma (RCB-II to RCB-III), considered as resistant to NACT [16]. Patients with tumors of histological grade 3 had a higher probability of pCR/RCB-I (OR = 5.57 (1.439 – 21.470); $p = 0.0161$) than their counterparts whose tumors were grade 1/2. In contrast, women with HR-positive tumors were less likely to enjoy pCR/RCB-I (OR = 0.18 (0.04 – 0.670); $p = 0.005$) than their women with non-luminal tumors. Other clinical and demographic characteristics can be accessed in Supplementary Table S1 (Supplementary material).

Table 1. Women's distribution according to the characteristics of the disease.

Characteristic		N (%)	RCB II/III (resistant)	pCR/RCB I (sensitive)	OR (95% CI)	p-value
			N=64 (%)	N=16 (%)		
Histological grade	1/2	39 (49)	36 (56)	3 (19)		
	3	41 (51)	28 (44)	13 (81)	5.57(1.439 – 21.470)	0.0161
Ki67	Low	34 (42)	29 (45)	5 (31)		
	High	46 (57)	35 (55)	11 (69)	1.82(0.568 – 5.850)	0.4623
HER2	Negative	46 (58)	40 (63)	6 (38)		
	Positive*	34 (42)	24 (39)	10 (62)	2.60 (0.840 – 8.047)	0.1589
Tumor size**	T1/T2	53 (67)	41 (64)	12 (75)		
	T3/T4	26 (33)	22 (37)	4 (25)	2.78 (0.890 – 8.612)	0.1268
Regional lymph node	Negative	33 (41)	27 (42)	6 (38)		
	Positive	47 (59)	37 (58)	10 (62)	1.21 (0.394 – 3.754)	0.9547
Metastasis	M0	74 (93)	58 (91)	16 (100)		
	M1	6 (7)	6 (9)	0 (0)	0 (0 – NA)	0.4576
Hormonal Receptor	Negative	21	12 (19)	9 (56)		
	Positive	59	52 (81)	7 (44)	0.18 (0.04 – 0.670)	0.0051

Hormonal receptor: positive if ER and/or PR positive; negative if both RE and RP negative.

*Five patients had negative HER2 at core biopsy and positive HER2 in the surgical specimen.

**One patient had an occult breast tumor with axillary disease; Ki67, Ki67 protein; HER2, human epidermal growth factor receptor; T1, tumor ≤ 20 mm; T2, tumor > 20 mm and ≤ 50 mm; T3, tumor > 50 mm; T4, tumor of any size with direct extension to the chest wall and/or skin; Regional lymph node negative: no regional lymph node metastasis; positive: included N1 (mobile ipsilateral lymph node metastases, axillary levels I, II), N2 (clinically fixed or entangled lymph node metastases I, II, or ipsilateral internal mammary

lymph node metastasis) or N3 (axillary level III ipsilateral lymph node metastasis with or without axillary involvement at levels I and II, or metastasis in internal mammary lymph node with level I and II axillary involvement, or supraclavicular lymph node metastasis with or without axillary or internal mammary involvement); M0, without clinical or radiographic evidence of distant metastasis; M1, distant metastasis determined clinically and radiographically and/or histologically.

2.2 NMR-based metabolomic analysis

Untargeted NMR analysis identified and quantified the relative abundances of 28 compounds including 14 amino acids, one carnitine, and other metabolites. Table S2 (Supplementary material) lists the compounds detected by NMR. The data were interrogated by univariate analysis to assess the relative quantification of metabolites across the different NACT outcomes (Figure 1 and Table S3, Supplementary material). Leucine and formate were found to be significantly altered when comparing resistant and sensitive women (p -value < 0.05), but their predictive power, evaluated using a logistic regression model, showed to be unsatisfactory (AUC = 0.67) (data not shown).

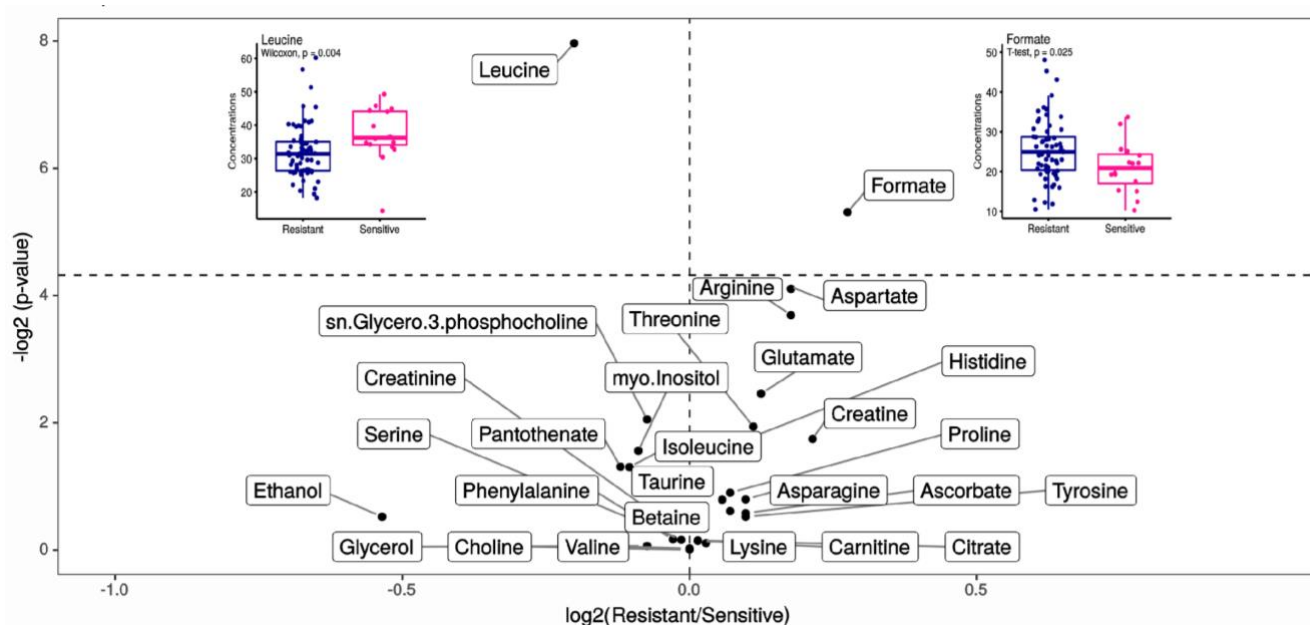


Figure 1: Volcano plot showing the metabolites variation by NACT outcomes ($\log_2(\text{Resistant/Sensitive})$) in function of their statistical significance ($\log_2(p\text{-value})$). Non-significant metabolites are plotted below the horizontal dashed line, the metabolites above this line presented significant variation (p -value < 0.05). Also, we show a boxplot for metabolites with significant variation (blue represent resistant patients and pink the sensitive ones). p -values were calculated using the Mann-Whitney-Wilcoxon test or t-test as a function of whether the data came from a normal distribution proved with the Shapiro test.

2.2.1 Classification models for predicting response to NACT

Further analyses counted on a logistic regression (LR) model aimed at classifying sensitive and resistant women based on their panel of metabolites determined by NMR and the clinical information related to the HR, Ki67, and HER2 statuses. Recursive feature elimination (RFE) was applied for continuous elimination of features (i.e. metabolites or clinical markers) with low contribution to the model [17–19]. The

combination of the clinical information and the metabolite panel resulted in eight statistical models, presented in Table 2.

Table 2. Models used for prediction of the response to treatment (RT) based on metabolites determined by NMR, the status of the hormonal receptor (HR), Ki67, and amplification of the human epidermal growth receptor type 2 (HER2) of BC patients.

Models	Equation
I	$\text{logit(RT)} = \text{Metabolites}$
II	$\text{logit(RT)} = \text{Metabolites} + \text{HR}$
III	$\text{logit(RT)} = \text{Metabolites} + \text{Ki67}$
IV	$\text{logit(RT)} = \text{Metabolites} + \text{HER2}$
V	$\text{logit(RT)} = \text{Metabolites} + \text{HR} + \text{Ki67}$
VI	$\text{logit(RT)} = \text{Metabolites} + \text{HR} + \text{HER2}$
VII	$\text{logit(RT)} = \text{Metabolites} + \text{Ki67} + \text{HER2}$
VIII	$\text{logit(RT)} = \text{Metabolites} + \text{Ki67} + \text{HER2} + \text{HR}$

Logistic regression models have supported the assessment of biomarkers in cancer [20–23], and can also be coupled with RFE [24]. By using this approach, we found formate, proline, valine, and leucine as potential markers of NACT response (Figure 2), and observed an increase in the predictive power, when compared to the results of the univariate approach, for the model using only the abundance of the metabolites (AUC=0.83 – model I, figure 2A). By combining the abundances of these metabolites with the information of HR status (Model II), HR + HER2 (Model VI), and Ki67+HER+HR (Model VIII), we obtained AUC values higher than those obtained for the model using solely metabolites.

The contributions of the metabolites were found to be more significant for the models than the contribution of the molecular markers, as presented by the observed coefficient values (Figure 2B). For the full description of the models see the Table S4 (Supplementary material). The coefficient values display the patient's chance of being resistant to NACT. A positive value means a positive correlation with NACT resistance, whereas a negative value means a positive correlation with NACT sensitivity. For example, formate, proline, valine, HR+, and HER– display positive coefficient values, thus being directly related to the NACT resistance. It means that, once any of these predictors show an increase, the patient's chance of being resistant to NACT increases as well. Oppositely, leucine, HR– and HER+ have negative coefficient values and are inversely related to NACT resistance, or directly related to NACT sensitivity. It means that an increase in leucine concentration, keeping the remaining predictors constant, decreases the patient's chances of being resistant to the treatment or, in other words, increases the patient's chance of being sensitive to the treatment, in accordance with what was previously pointed by the univariate analysis of the metabolites set. Ki67, both positive or negative, was found to have a low influence on the models that contain it.

When exploring the performances of the models based on their predictive power and agreement with the pathologic results, equivalent specificity rates were found for the eight models when considering the training set (full performances of the models are described in Table S5, Supplementary material). For the validation sets, the specificity reached 75% only for models II and V (Figure 2C) that were considered the ones with the highest efficiency in the classification. The sensitivity of the models, for both training and validation sets, was found to be higher than 70% for all the models. The results suggest that the interconnection of clinical variables (HR/Ki67/HER2) and serum metabolites can improve the prediction of the response to NACT.

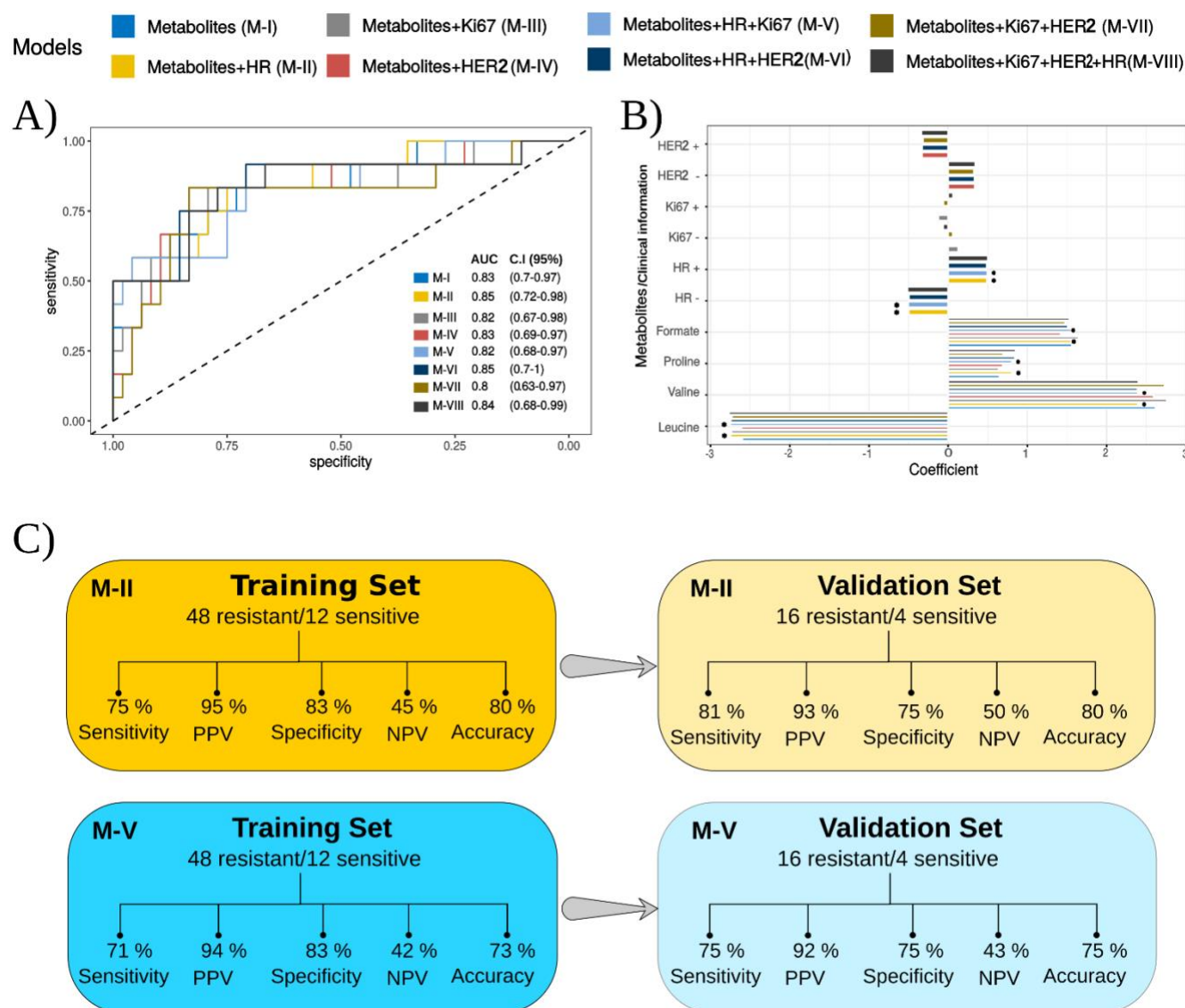


Figure 2: Classification models obtained with the combination of metabolites and clinical information. (A) The plot of the ROC curves for each model, containing the area under the curve (AUC). (B) The coefficients of the predictors and (C) performance of models II and IV for training (cross-validation) and validation sets.

To gain insights on metabolome changes associated with resistance and sensitivity to NACT, the pathway enrichment analysis was carried out with the metabolites found as discriminants for models I-VIII. Metabolism of Glyoxylate and dicarboxylate was found to be the most enrolled pathway for the acquisition of resistance (Figure S1, Supplementary material).

3. Discussion

The potential of the combination of HR, Ki67, and HER2 statuses and serum metabolites in predicting the response to NACT was evaluated in this study. The untargeted NMR analysis identified and quantified the relative abundances of 28 compounds, including 14 amino acids, carnitine, and other metabolites. When studying the serum abundance of this set of metabolites, we noticed the significant differences between the concentrations of leucine and formate. Leucine, which has been extensively

studied for its role in breast cancer, showed a lower concentration in the serum of resistant women [25-27]. Saito et al., 2019 proposed that resistance is based on the increased expression of transporters that incorporate leucine, to fuel the accelerated proliferation of cells resistant to therapy, which supports our observation of a lower concentration of this amino acid in resistant patients to NACT [28]. Formate was also found to be increased in resistant women and can be considered as a potential predictive biomarker, in agreement with several publications on cancer [11,29,30].

Subsequently, we used the recursive feature elimination (RFE) method to assist in the selection of putative biomarkers. RFE continually removed the resources with low contribution scores based on the iterative method and, then, classifies each resource in each cycle to exclude the resources with low scores [19]. Studies have proposed that RFE allows the extraction of subsets of potential biomarkers among different types of cancer [31-33]. Specifically, for breast cancer, RFE was applied to the classification of the complete pathological response and distinguished triple-negative breast cancer from other subtypes of breast cancer based on the selection of miRNA biomarkers [34,35]. Logistic regression (LR) models, following the RFE approach, are also widely used in classification problems applied to breast cancer [36-39].

In our study, RFE + LR was applied as a supervised learning machine by combining the abundance of metabolites with the clinical information on HR, Ki67, and HER2 status. The resulting classification models presented sensitivity and specificity values greater than 70% and 80%, respectively, for the training set. Remarkable performance was achieved for models II, with 75% sensitivity and 83% specificity for the training set, and 81% sensitivity and 75% specificity for the validation set. This indicates that the combination of the HR status with the metabolite panel (Leucine/Valine/Formate/Proline) can generate good classifiers of the response to NACT.

A few studies reported similar results for predicting the response to NACT in BC patients based on metabolite panels [11-13]. Lin et al. (2019) assessed the metabolic biomarker signature of serum samples of BC patients by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The authors applied partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) to build the statistical model of classification, which identified nine informative metabolites and achieved performances with specificity of 100%, and sensitivity of 81.2% [12]. Some authors recently examined serum metabolite levels during chemotherapy treatment. Debik et al. (2019) observed unfavorable changes in lipid levels during NACT. By using NMR, they observed no metabolic difference in serum samples from survivors and non-survivors, although a PLS-DA model based on their analysis of tissue achieved 72% of accuracy in predicting a 5-years survival rate. Among other metabolites, lactate, glycine, choline, and alanine were reported as the important variables useful for the model set-up [11]. Vignoli et al. (2020) also studied metabolic profiles capable to codify a complete response to NACT within the ER-positive group. After an investigation of the plasma by NMR, they built a classifier with low performance. Among other findings, branched-chain amino acids, such as valine, and isoleucine were reported as the key differentiators of their groups of study [13]. Unlike the previous studies mentioned above, the application of the RFE + LR method allowed to obtain models with successful results in terms of predicting the response to NACT that link the selected biomarkers with the clinical information of patients.

Glyoxylate and dicarboxylate metabolism was the pathway most impacted by the acquisition of resistance. This pathway has been associated with breast cancer cell metastasis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and direct infusion mass spectrometry [40]. This association was later confirmed by gene expression studies [41]. In addition, other pathways represented by our panel of metabolites are associated with

breast cancer such as the metabolism of branched-chain amino acids (BCAAs, i.e., valine, leucine, and isoleucine), the Aminoacyl-tRNA, Arginine and proline, Pantothenate and CoA [24, 42]. Together, this set of relationships highlights the metabolic alterations involved in the cellular reprogramming that provoked the BC resistance to chemotherapy.

In conclusion, NMR of serum offered rapid access to metabolic alterations in BC associated with resistance and sensitivity to NACT. The reported proof-of-principle study has attested to the power of these techniques in accelerating the definition of BC prognosis with excellent accuracy. Screening methods for predicting the response and effects of chemotherapies are much desired and would be of paramount importance for cancer patients. Despite BC being one of the most treatable cancers, a huge amount of women do not benefit from NACT pre-treatment because of BC resistance. Capitalizing on the close relationship between cancer formation and changes in serum, the analysis of the metabolites by NMR allowed gaining insights on the metabolic alterations associated with marker status and resistance to NACT. When coupled by LR + RFE to the clinical marker status, a simple metabolomic panel can be applied with success as an add-in prognosis and clinical forecasting for the response to NACT of BC patients. Although rigorous multisite validation of this untargeted approach with a larger patient pool is needed, this is the first milestone for the development of an efficient strategy for the early discovery of NACT-resistant BC patients.

4. Materials and Methods

4.1 Subjects

This is a prospective cohort study on 80 women aged between 29 and 77 years with invasive breast carcinoma who underwent NACT followed by surgery. Participants were diagnosed and treated at the Women's Hospital (*Hospital da Mulher Professor José Aristodemo Pinotti, Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher - CAISM*) of the University of Campinas (UNICAMP), Brazil between January 2017 and January 2019. The study was approved by the Research Ethics Committee of UNICAMP [CAAE: 69699717.0.0000.5404]. Biological samples were stored in CAISM's biobank (CONEP 56, Brazil). All study subjects signed the informed consent before having their biological samples removed and included in the institutional biobank. Demographic and clinical data were collected from patient's records and summarized in in Table S1 (Supplementary Material).

The diagnosis of breast carcinoma was performed with an ultrasound-guided percutaneous needle (core) biopsy. NACT was prescribed according to the standard protocols, and immunohistochemistry-based molecular subtyping of BC was used to guide treatment selection. NACT protocols included doxorubicin and cyclophosphamide, followed by paclitaxel (with carboplatin in triple-negative cases). HER2 positive patients received trastuzumab. After NACT all women underwent surgical treatment (mastectomy or quadrantectomy with sentinel lymph node biopsy or axillary lymph node dissection). Aliquots of peripheral blood, collected in dry tubes, were obtained from women before they initiated the NACT [43–47]. The samples were stored at -80°C until analysis. See the supplementary file for the complete description of the clinical, histopathologic, and immunohistochemical diagnosis for the subjects.

Response to NACT was evaluated on surgical specimens removed after NACT according to the Residual Cancer Burden (RCB) guidelines [14,15]. The RCB is an online tool for the assessment of residual disease which categorizes the response to chemotherapy into four classes: complete pathological response (pCR/RCB-0); RCB-I (minimum residual disease); RCB-II (moderate residual disease), and RCB-III (extensive residual disease). This type of evaluation provides detailed quantification of residual disease, warrants reproducibility, and is fully validated with long-term follow-up data. Pathological reports provide the final residual tumor dimensions (in mm), the percentage of the area of cancer cells in the residual tumor bed, and the proportion of *in situ*

component within the specimen, the number of positive lymph nodes, and the diameter (mm) of the largest nodal metastasis. For statistical analyses, all cases were clustered into two major groups based on the response to NACT: (a) cases with a pCR and RCB-I, and (b) cases with residual breast carcinoma (RCB-II to RCB-III) [16].

4.2 Untargeted Nuclear Magnetic Resonance (NMR) metabolomic analysis of serum samples

Serum samples were thawed at room temperature before the analysis. Then, 400 μ L of serum were slowly mixed with 200 μ L of D₂O (99.9% deuterium oxide with 0.03% of TSP) and transferred to 5 mm NMR tubes. The NMR experiments were performed at 298 K on Varian Inova® NMR spectrometer (Agilent Technologies® Inc., Santa Clara, CA USA) at the Brazilian Biosciences National Laboratory (Brazilian Center for Research in Energy and Materials, CNPEM, Campinas, SP, Brazil). The instrument was operated in a Larmor frequency of 599.887 MHz equipped with a triple resonance cryoprobe. The parameters used for 1D CPMG (Carr–Purcell–Meiboom–Gill) pulse sequence were as follows: a total of 128 free induction decays were collected with 38 K data points at a spectral sweep width of 16 ppm; total relaxation delay of 4 s; water presaturation applied during 2 s delay; T₂ filtering was obtained with an echo time of 300 μ s repeated 166 times, resulting in a total duration of effective echo time of 50 ms. This sequence removes the broad resonances associated with high molecular mass molecules and motionally constrained compounds, facilitating the observation of only free low molecular mass metabolites. Chenomx NMR® Suite 8.1 software (Chenomx® Inc., Edmonton, AB, Canada) was used for preprocessing, spectral phase and baseline corrections, metabolite identification, and quantification of relative concentrations (mmol L⁻¹).

4.3 Statistical Analysis

All statistical calculations were performed using the R Project for Statistical Computing (v3.6.2). The epitools package was used for odds ratio (OR) calculation of clinical characteristics of the women according to their response to NACT. Confidence levels of 95% and p-values < 0.05 were assumed as statistically significant [48]. The “base” functions of R were used for average comparison, using the Mann-Whitney-Wilcoxon test or the t-test as a function of being a normal distribution proved with the Shapiro test. The caret package was used for recursive feature elimination (RFE) and logistic regression implementation [49]. Data normalization, transformation, and scaling were performed using the web platform MetaboAnalyst 5.0 [50].

For the logistic regression (LR) modeling followed by RFE, data tables were normalized by sum, and variables with near-constant values were detected and removed by using interquartile range (IQR) filtering. The data table was then log-transformed, and scaled by Pareto. We generated eight classification models (Table 2, models I to VIII) for the response to NACT based on the alternative combinations of HR, Ki67, HER2 statuses, and the metabolites panel determined by NMR. Models were built based on a training set composed of 75% of the data. To evaluate the performance of the models, we performed Leave-One-Out Cross-Validation (LOOCV). The area under the curve (AUC) of the receiver operator characteristics (ROC) curve of the selected features was also used to evaluate their prediction power. A validation set comprising 25% of data was also used for performance evaluation in terms of sensitivity, specificity, and accuracy [51]. By using the MetaboAnalyst™ web platform, we further interrogated KEGG Library for quantitative Metabolite Pool enrichment and the pathways with a p-value < 0.05 were further discussed.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Pathway Enrichment Analysis for the metabolites found as discriminatory, assuming as relevant those pathways with a p-value < 0.05. Table S1: Women distribution according to sociodemographic and clinical characteristics. Table S2: Panel of metabolites detected by untargeted Nuclear Magnetic Resonance (¹H-NMR). Table S3: Average relative abundances of the serum metabolites detected by ¹H-NMR according to response to NACT. Table S4: Contribution of the HR, Ki67, HER2, and serum metabolites as predictors of the response to NACT in different models obtained with RFE+LR. Table S5: Detailed performance of the models I to VIII in predicting the response to NACT.

Author Contributions: A.M.P. and S.F.M.D. conceived and designed the study. M.R.C., A.A.R.S., M.C.R.T., P.H.G.S. collected clinical samples and data. M.R.C. and M.C.R.T. performed NMR analysis. M.L.S. and S.A.R. defined parameters for NMR analysis. T.B.B.C.C., L.R.V., L.T., R.R.C. interpreted the results for NMR. L.M.R. and A.C.F. assisted in patient recruitment. S.R., L.O.Z.S., S.F.M.D. interpreted clinical results. M.R.C. and A.A.R.S. checked the underlying data. J.M.G. and L.O.Z.S. performed the statistical analysis. M.R.C., A.A.R.S., A.M.P. drafted the manuscript. A.T., L.L.C., L.T., F.G., S.F.M.D. revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (Capes) grant #001 for MC and AARS, by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grant 303742/2018-6 for SFMD and by the São Paulo Research Foundation (FAPESP), grant #2019/04314-6 for AMP, and #2018/24069-3 for LT.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of UNICAMP (Research Ethics Committee approval CAAE# 69699717.0.0000.5404, August 06, 2017).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study before having their biological samples removed and included in the institutional biobank (CAISM's biobank – CONEP 56, Brazil). To publish this paper a written informed consent has been obtained from the patients.

Data Availability Statement: The study protocol and the datasets generated during and/or analyzed during the current study, including the identified participant data will be available with publication from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES #001 for MC and #88887.511153/2020-00 for AARS) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant #2019/04314-6 to AMP, and #2018/24069-3 to LT). Alessandra Tata thanks Dr. Andrea Massaro for the useful discussions.

Conflicts of Interest: The authors declare no other conflicts of interest.

References

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. doi: 10.3322/caac.21660
- Esserman, L. J., Berry, D. A., DeMichele, A., Carey, L., Davis, S. E., Buxton, M., Hylton, N. (2012). Pathologic complete response predicts recurrence-free survival more effectively by cancer subset: results from the I-SPY 1 TRIAL--CALGB 150007/150012, ACRIN 6657. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(26), 3242–3249. doi: 10.1200/JCO.2011.39.2779
- Cheang, M. C. U., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Nielsen, T. O. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(10), 736–750. doi: 10.1093/jnci/djp082
- Goldhirsch, A., Wood, W. C., Coates, A. S., Gelber, R. D., Thürlimann, B., Senn, H. J. (2011). Strategies for subtypes dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary

- Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 22,1736–1747. doi: 10.1093/annonc/mdr304 398
399
5. Yardley, D. A. (2013). Drug resistance and the role of combination chemotherapy in improving patient outcomes. *Int J Breast Cancer*, 2013,137414. doi:10.1155/2013/137414. 400
401
6. Haque, W., Verma, V., Hatch, S., Suzanne Klimberg, V., Brian Butler, E., Teh, B. S. (2018). Response rates and pathologic complete response by breast cancer molecular subtype following neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Research and Treatment*, 170(3), 559–567. doi: 10.1007/s10549-018-4801-3 402
403
404
7. Masoud, V., Pagès, G. (2017). Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. *World Journal of Clinical Oncology*, 8(2), 120–134. doi: 10.5306/wjco.v8.i2.120 405
406
8. Bilkey, J., Tata, A., McKee, T. D., Porcari, A. M., Bluemke, E., Woolman, M., Zarrine-Afsar, A. (2016). Variations in the abundance of lipid biomarker ions in Mass Spectrometry images correlate to tissue density. *Analytical Chemistry*, 88(24), 12099–12107. doi: 10.1021/acs.analchem.6b02767 407
408
409
9. Cardoso, M. R., Santos, J. C., Ribeiro, M. L., Talarico, M. C. R., Viana, L. R., Derchain, S. F. M. (2018). A metabolomic approach to predict breast cancer behavior and chemotherapy response. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). doi: 10.3390/ijms19020617 410
411
412
10. Silva, A. A. R., Cardoso, M. R., Rezende, L. M., Lin, J. Q., Guimaraes, F., Silva, G. R. P., Porcari, A. M. (2020). Multiplatform investigation of plasma and tissue lipid signatures of breast cancer using Mass Spectrometry tools. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10). doi: 10.3390/ijms21103611 413
414
415
11. Debik, J., Euceda, L. R., Lundgren, S., Gythfeldt, H. von der L., Garred, Ø., Borgen, E., Giskeødegård, G. F. (2019). Assessing treatment response and prognosis by serum and tissue metabolomics in breast cancer patients. *Journal of Proteome Research*, 18(10), 3649–3660. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00316 416
417
418
12. Lin, X., Xu, R., Mao, S., Zhang, Y., Dai, Y., Guo, Q., Chen, Q. (2019). Metabolic biomarker signature for predicting the effect of neoadjuvant chemotherapy of breast cancer. *Annals of Translational Medicine*, 7(22), 670. doi: 10.21037/atm.2019.10.34 419
420
421
13. Vignoli, A., Muraro, E., Miolo, G., Tenori, L., Turano, P., Di Gregorio, E., Corona, G. (2020). Effect of estrogen receptor status on circulatory immune and metabolomics profiles of HER2-positive breast cancer patients enrolled for neoadjuvant targeted chemotherapy. *Cancers*, 12(2). doi: 10.3390/cancers12020314 422
423
424
14. Bossuyt, V., Provenzano, E., Symmans, W. F., Boughey, J. C., Coles, C., Curigliano, G., Cameron, D. (2015). Recommendations for standardized pathological characterization of residual disease for neoadjuvant clinical trials of breast cancer by the BIG-NABCG collaboration. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(7), 1280–1291. doi: 10.1093/annonc/mdv161 425
426
427
428
15. Symmans, W. F., Peintinger, F., Hatzis, C., Rajan, R., Kuerer, H., Valero, V., Pusztai, L. (2007). Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(28), 4414–4422. doi: 10.1200/JCO.2007.10.6823 429
430
431
16. Provenzano, E., Bossuyt, V., Viale, G., Cameron, D., Badve, S., Denkert, C., Symmans, W. F. (2015). Standardization of pathologic evaluation and reporting of post neoadjuvant specimens in clinical trials of breast cancer: recommendations from an international working group. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 28(9), 1185–1201. doi: 10.1038/modpathol.2015.74 432
433
434
435
17. Guan, W., Zhou, M., Hampton, C. Y., Benigno, B. B., Walker, L. D., Gray, A., Fernández, F. M. (2009). Ovarian cancer detection from metabolomic liquid chromatography/mass spectrometry data by support vector machines. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 259. doi: 10.1186/1471-2105-10-259 436
437
438

18. Guyon, I., Weston, J., Barnhill, S., Vapnik, V. (2002). Gene selection for cancer classification using support vector machines. *Machine Learning*, 46(1), 389–422. doi: 10.1023/A:1012487302797 439
440
19. Sheng, J., Shao, M., Zhang, Q., Zhou, R., Wang, L., Xin, Y. (2020). Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and normal aging distinguished by multi-modal parcellation and machine learning. *Scientific Reports*, 10(1), 5475. doi: 10.1038/s41598-020-62378-0 441
442
443
20. Eberlin, L. S., Tibshirani, R. J., Zhang, J., Longacre, T. A., Berry, G. J., Bingham, D. B., Poultides, G. A. (2014). Molecular assessment of surgical-resection margins of gastric cancer by mass-spectrometric imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(7), 2436–2441. doi: 10.1073/pnas.1400274111 444
445
446
21. Hosseinnataj, A., RezaBaneshi, M., Bahrampour, A. (2020). Mortality risk factors in patients with gastric cancer using Bayesian and ordinary Lasso logistic models: a study in the Southeast of Iran. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 13(1), 31–36. 447
448
449
22. Kim, S. M., Kim, Y., Jeong, K., Jeong, H., Kim, J. (2018). Logistic LASSO regression for the diagnosis of breast cancer using clinical demographic data and the BI-RADS lexicon for ultrasonography. *Ultrasonography (Seoul, Korea)*, 37(1), 36–42. doi: 10.14366/usg.16045 450
451
452
23. Sans, M., Gharpure, K., Tibshirani, R., Zhang, J., Liang, L., Liu, J., Eberlin, L. S. (2017). Metabolic markers and statistical prediction of serous ovarian cancer aggressiveness by ambient ionization Mass Spectrometry imaging. *Cancer Research*, 77(11), 2903–2913. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3044 453
454
455
24. Yang, L., Wang, Y., Cai, H., Wang, S., Shen, Y., Ke, C. (2020). Application of metabolomics in the diagnosis of breast cancer: a systematic review. *Journal of Cancer*, 11(9), 2540–2551. doi: 10.7150/jca.37604 456
457
25. Bae, H., Kim, B., Lee, H., Lee, S., Kang, H. S., Kim, S. J. (2017). Epigenetically regulated Fibronectin leucine rich transmembrane protein 2 (FLRT2) shows tumor suppressor activity in breast cancer cells. *Scientific Reports*, 7(1), 272. doi: 10.1038/s41598-017-00424-0 458
459
460
26. Shennan, D. B., Thomson, J., Gow, I. F., Travers, M. T., Barber, M. C. (2004). L-leucine transport in human breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231): kinetics, regulation by estrogen and molecular identity of the transporter. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1664(2), 206–216. doi: 10.1016/j.bbamem.2004.05.008 461
462
463
27. Speers, C., Zhao, S. G., Kothari, V., Santola, A., Liu, M., Wilder-Romans, K., Feng, F. Y. (2016). Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase (MELK) as a Novel Mediator and Biomarker of Radioresistance in Human Breast Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 22(23), 5864–5875. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2711 464
465
466
467
28. Saito, Y., Li, L., Coyaude, E., Luna, A., Sander, C., Raught, B., Muthuswamy, S. K. (2019). LLGL2 rescues nutrient stress by promoting leucine uptake in ER(+) breast cancer. *Nature*, 569(7755), 275–279. doi: 10.1038/s41586-019-1126-2 468
469
29. Delbrouck, C., Pozdeev, V. I., Oudin, A., Grzyb, K., Neises, L., Kiweler, N., Meiser, J. (2021). FSMP-09. Formate promotes cancer cell invasion and metastasis via calcium signaling. *Neuro-Oncology Advances*, 3(Suppl 1), i18–i18. doi: 10.1093/noajnl/vdab024.073 470
471
472
30. Pietzke, M., Arroyo, S. F., Sumpton, D., Mackay, G. M., Martin-Castillo, B., Camps, J., Vazquez, A. (2019). Stratification of cancer and diabetes based on circulating levels of formate and glucose. *Cancer & Metabolism*, 7, 3. doi: 10.1186/s40170-019-0195-x 473
474
475
31. Chen, Z., Dai, Y., Huang, X., Chen, K., Gao, Y., Li, N., Mao, W. (2020). Combined metabolomic analysis of plasma and tissue reveals a prognostic risk score system and metabolic dysregulation in esophageal squamous cell carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 10, 1545. doi: 10.3389/fonc.2020.01545 476
477
478

32. Ge, C., Luo, L., Zhang, J., Meng, X., Chen, Y. (2021). FRL: An integrative feature selection algorithm based on the Fisher Score, Recursive Feature Elimination, and Logistic Regression to identify potential genomic biomarkers. *BioMed Research International*, 2021,4312850. doi: 10.1155/2021/4312850
33. Han, Y., Huang, L., Zhou, F. (2021). A dynamic recursive feature elimination framework (dRFE) to further refine a set ofOMIC biomarkers. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 37(15), 2183–2189. doi: 10.1093/bioinformatics/btab055
34. Sutton, E. J., Onishi, N., Fehr, D. A., Dashevsky, B. Z., Sadinski, M., Pinker, K., Veeraraghavan, H. (2020). A machine learning model that classifies breast cancer pathologic complete response on MRI post-neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Research*, 22(1), 57. doi: 10.1186/s13058-020-01291-w
35. Lopez-Rincon, A., Mendoza-Maldonado, L., Martinez-Archundia, M., Schönhuth, A., Kraneveld, A. D., Garssen, J., Tonda, A. (2020). Machine learning-based ensemble recursive feature selection of circulating miRNAs for cancer tumor classification. *Cancers*,12(7), 1785. doi: 10.3390/cancers12071785
36. Liu, L. (2018). Research on logistic regression algorithm of breast cancer diagnose data by machine learning. 2018 *International Conference on Robots & Intelligent System (ICRIS)*, 157–160. doi: 10.1109/ICRIS.2018.00049
37. Pfob, A., Sidey-Gibbons, C., Lee, H. B., Tasoulis, M. K., Koelbel, V., Golatta, M., Heil, J. (2021). Identification of breast cancer patients with pathologic complete response in the breast after neoadjuvant systemic treatment by an intelligent vacuum-assisted biopsy. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 143, 134–146. doi: 10.1016/j.ejca.2020.11.006
38. Tahmassebi, A., Wengert, G. J., Helbich, T. H., Bago-Horvath, Z., Alaei, S., Bartsch, R., Pinker, K. (2019). Impact of machine learning with Multiparametric Magnetic Resonance Imaging of the breast for early prediction of response to neoadjuvant chemotherapy and survival outcomes in breast cancer Patients. *Investigative Radiology*, 54(2), 110–117. doi: 10.1097/RLI.0000000000000518
39. Zhang, J., Xiao, L., Pu, S., Liu, Y., He, J., Wang, K. (2021). Can we reliably identify the pathological outcomes of neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer? Development and validation of a logistic regression nomogram based on preoperative factors. *Annals of Surgical Oncology*, 28(5), 2632– 2645. doi: 10.1245/s10434-020-09214-x
40. Kim, H. Y., Lee, K. M., Kim, S. H., Kwon, Y. J., Chun, Y. J., Choi, H. K. (2016). Comparative metabolic and lipidomic profiling of human breast cancer cells with different metastatic potentials. *Oncotarget*, 7(41), 67111– 67128. doi: 10.18632/oncotarget.11560
41. Chen, W.Y., Wu, F., You, Z.Y., Zhang, Z.M., Guo, Y.L., Zhong, L.X. (2015). Analyzing the differentially expressed genes and pathway cross-talk in aggressive breast cancer. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 41(1), 132–140. doi: 10.1111/jog.12495
42. Peng, H., Wang, Y., Luo, W. (2020). Multifaceted role of branched-chain amino acid metabolism in cancer. *Oncogene*, 39(44), 6747–6756. doi: 10.1038/s41388-020-01480-z
43. Lakhani, S., Ellis I. O, Schnitt S. J, Tan, P. H, Van De Vijver, M. J. Breast tumours, WHO Classification of tumours, 5th Edition, Volume 2. Edited by WHO/IARC, 2019.
44. Allison, K. H, Dowsett, M., Mckernin, S. E; Carey, L. A, Fitzgibbons, P. L, Hayes, D. F, Lakhani, S. R., Chavez-Macgregor, M., Perlmutter, J., Perou, C. M, Regan, M. M, Rimm, D. L, Torlakovic, E. E, Varella, L., Viale, G., Weisberg, T. F, Mcshane, L. M, Wolff, A. C. (2020). Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline update. *Arch Pathol Lab Med*, 144, 545–563, doi10.5858/arpa.2019-0904-SA.
45. Dowsett, M., Nielsen, T. O; A'hern, R., Bartlett, J., Cuzick, J., Ellis, M., Hugh, J. C., Lively, T., Mcshane, L., Paik, S., Penault-Llorca, F., Prudkin, L., Regan, M., Salter, J., Sotiriou, C., Smith, I. E; Viale, G., Zujewski, J. A., Hayes, D. F. (2011). International Ki-67 in Breast Cancer Working Group. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst*, 103, 1656-1664, doi:10.1093/jnci/djr393.

-
46. Wolff, A. C., Allison, K. H., Harvey, B. E., Mcshane, L. M., Dowsett, M. (2018). HER2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline focused update summary. *J Oncol Pract*, 14, 437-441, doi:10.1200/JOP.18.00206. 521-523
47. Robertson, S., Rönnlund, C., de Boniface, J., Hartman, J. (2019). Re-testing of predictive biomarkers on surgical breast cancer specimens is clinically relevant. *Breast Cancer Res Treat*, 174, 795-805, doi:10.1007/s10549-018-05119-2. 524-525
48. Brown, L. D., Cai, T. T., DasGupta, A. (2001). Interval estimation for a binomial proportion. *Statistical Science*, 16(2), 101–133. doi: 10.1214/ss/1009213286 526-527
49. Kuhn, M., Wing, J., Weston, S., Williams, A., Keefer, C., Engelhardt, A., Hunt, T. (2021). Classification and regression training. R package version 6.0-88. Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=caret> 528-529
50. Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., de Lima Morais, D. A., Chang, L., Barrette, M., Xia, J. (2021). MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W388– W396. doi: 10.1093/nar/gkab382 530-532
51. Murata, T., Yanagisawa, T., Kurihara, T., Kaneko, M., Ota, S., Enomoto, A., Tomita, M., Sugimoto, M., Sunamura, M., Hayashida, T., Kitagawa, Y., Jinno, H. (2019). Salivary metabolomics with alternative decision tree-based machine learning methods for breast cancer discrimination. *Breast Cancer Res Treat*, 177(3):591-601. doi: 10.1007/s10549-019-05330-9 533-535-536

1H-NMR SERUM METABOLOME COMBINED WITH MACHINE LEARNING PREDICTS THE RESPONSE TO NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY IN WOMEN WITH BREAST CANCER

Marcella R. Cardoso^{1,2†}, Alex Ap. Rosini Silva^{3†}, Maria Cecília R. Talarico¹, Pedro H. Godoy Sanches³, Maurício L. Sforça⁴, Silvana A. Rocco⁵, Luciana M. Resende⁶, Tassia B.B.C. Costa⁷, Laís R. Viana⁸, Rafael R. Canevarolo⁹, Amanda C. Ferracini¹⁰, Suzana O. B. Ramalho¹, Junier Marrero Gutierrez³, Fernando Guimarães¹¹, Ljubica Tasic⁷, Alessandra Tata¹³, Luís O. Z. Sarian¹, Leo L. Cheng^{2,12}, Andreia M. Porcari^{3†*}, Sophie F. M. Derchain^{1†*}.

[†]Equally contributed to this study

Supplementary Materials

List of contents:

1. Supplementary methods:

Clinical and histopathologic diagnosis of breast cancer.

2. Supplementary tables:

Table S1: Women distribution according to sociodemographic and clinical characteristics.

Table S2: Panel of metabolites detected by untargeted Nuclear Magnetic Resonance (¹H-NMR).

Table S3: Average relative abundances of the serum metabolites detected by NMR according to response to NACT.

Table S4: Contribution of the HR, Ki67, HER2, and serum metabolites as predictors of the response to NACT in different models obtained with RFE+LR.

Table S5: Detailed performance of the models I to VIII in predicting the response to NACT.

3. Supplementary figures

Figure S1: Pathway Enrichment Analysis for the metabolites found as discriminatory, assuming as relevant those pathways with a p -value < 0.05.

1. Supplementary methods

1.1 Clinical, histopathologic, and immunohistochemical diagnosis of breast cancer

All histological diagnoses were determined according to the World Health Organization (WHO) criteria [43]. Tissue samples were formalin-fixed and paraffin-embedded, collected either at biopsy (pre-treatment specimens) or during surgical resection after NACT (post-treatment specimens). Hematoxylin-eosin stained sections were reviewed to confirm the histologic diagnosis. For BC subtype classification, a conventional manual immunohistochemical technique was used. Primary antibodies used for the evaluation of molecular subtypes of BC were: anti-estrogen receptor (ER, clone 1D5, diluted at 1:1000 v/v), anti-progesterone receptor (PR, clone PR636, diluted at 1:800 v/v), anti-HER2 (Clone PN2A, diluted at 1:1100 v/v), and proliferation marker Ki67 (clone MIB1, diluted at 1:500 v/v). All antibodies and the detection system Envision Flex were provided by Dako (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Evaluation of ER and PR was performed according to, on the diagnostic (pre-treatment) specimens [44]. Cases were considered positive if 1% or more tumor cells were positive. For Ki67, we scored the percentage of positive tumor cells in a minimum of 500 cells in randomly selected representative fields [45]. The mean Ki67 percentage of stained cells was calculated. When the mean percentage of stained cells was higher than the median (40%), cases were assigned as Ki67 high. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) staining was scored as 0+/1+ (negative), 2+ (equivocal), or 3+ (positive). Equivocal (2+) cases were further confirmed by *in situ* hybridization, according to the recommendations of the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP) [46]. Due to tumor heterogeneity, hormone receptor-negative cases, and/or HER2 had the immunohistochemistry repeated in the surgical specimen of women with a residual disease for subtype confirmation [47].

The following BC features were evaluated: histological type; grade as per Nottingham classification; ER, PR, Ki67 and HER2 expressions; tumor size classified into T1 (≤ 20 mm), T2 (> 20 mm and ≤ 50 mm), T3 (> 50 mm) and T4 (any size with direct extension to the chest wall and/or skin); lymph node involvement classified as: N0 (no regional lymph node metastasis), N1 (mobile ipsilateral lymph node metastases, axillary levels I, II), N2 (clinically fixed or entangled lymph node metastases I, II, or ipsilateral internal mammary lymph node metastasis) or N3 (axillary level III ipsilateral lymph node metastasis with or without axillary involvement at levels I and II, or metastasis in internal mammary lymph node with level I and II axillary involvement, or supraclavicular lymph node metastasis with or without axillary or internal mammary involvement); distant metastasis by clinical description during outpatient follow-up, taking into consideration the period of diagnosis, being classified as: M0 (without clinical or radiographic evidence of distant metastasis) or M1 (distant metastasis determined clinically and radiographically and/or histologically proven greater than 0.2 mm); clinical stage according to tumor size, axillary involvement and presence of distant metastasis; treatment: drug used; surgery performed on the breast (mastectomy or quadrantectomy) and armpit (axillary dissection or sentinel lymph node biopsy); response to NACT, based on the RCB (Residual Cancer Burden)

calculation, in which women with pCR or RCB-I were considered responsive to chemotherapy and women with RCB-II and -III were considered resistant.

2. Supplementary tables:

Table S1: Women distribution according to sociodemographic and clinical characteristics.

Characteristic		N° (%)	Resistant N=64 (%)	Sensitive N=16 (%)	OR (95% CI)	p value
Ethnicity	White	69(86)	54(84)	15(94)		
	Brown	9 (11)	9(14)	0 (0)	(0-0)	0.2684
	Black	2(3)	1(2)	1(6)	3.60 (0.212 – 61.017)	0.9326
Age of menarche	< 12	17 (21)	15 (23)	2 (12)	-	
	≥ 12	63 (79)	49 (77)	14 (88)	2.14(0.437-10.513)	0.5386
Menopause	Yes	44 (55)	37 (58)	7 (44)		
	No	36 (45)	27 (42)	9 (56)	1.76 (0.583 – 5.321)	0.4652
Hormone therapy	Yes	12 (15)	11 (17)	1 (6)	-	
	No	68 (85)	53 (83)	15 (94)	3.11 (0.372 – 26.089)	0.4811
Pregnancy	Yes	73 (91)	58 (91)	15 (94)		
	No	7 (9)	6 (9)	1 (6)	0.64 (0.071- 5.769)	1.0000
Births	Yes	69 (86)	55 (86)	14 (88)	-	
	No	11 (14)	9 (14)	2 (12)	0.873 (0.169 – 4.504)	1.0000
Abortions	Yes	21 (26)	19 (30)	2 (12)		
	No	59 (74)	45 (70)	14 (88)	2.96 (0.611 – 14.283)	0.2802
Lactation*	Yes	63 (86)	50 (78)	13 (87)	-	
	No	10 (14)	8 (12)	2 (13)	0.962 (0.182 – 5.084)	1.0000
Smoking	Yes	17 (21)	13 (20)	4 (25)		
	No	63 (79)	51 (80)	12 (75)	0.765 (0.212 – 2.764)	0.9455
Chronic alcoholism	Yes	1 (1)	1 (2)	0 (0)	-	
	No	79 (99)	63 (98)	16 (100)	Inf (NA- NA)	1.0000
BMI	Normal weight	25 (31)	18 (28)	7 (44)		
	Overweight	21 (26)	19 (30)	2 (12)	0.271 (0.050 – 1.480)	0.2300
	Obese	34 (43)	27 (42)	7 (44)	0.667 (0.200 – 2.226)	0.7251
Hypertension	Yes	33 (41)	29 (45)	4 (25)	-	
	No	47 (59)	35 (55)	12 (75)	2.49 (0.724- 8.538)	0.2331
Diabetes	Yes	9 (11)	8 (12)	1 (6)		
	No	71 (89)	56 (88)	15 (94)	2.14 (0.248 – 18.498)	0.7907
Hypothyroidism	Yes	9 (11)	8 (12)	1 (6)	-	
	No	71 (89)	56 (88)	15 (94)	2.14 (0.248 – 18.498)	0.7907
Family history of breast or ovarian cancer	Yes	20 (25)	13 (20)	7 (44)		
	No	60 (75)	51 (80)	9 (56)	0.33 (0.103- 1.045)	0.1066

Legend: BMI, body mass index; *, women who had no pregnancies. The following demographic and clinical data were obtained: self-declared ethnicity; age at diagnosis; age of menarche; menopausal status (premenopausal and postmenopausal); hormone therapy history; number of pregnancies, births, and miscarriages; lactation regardless of the number of pregnancies or duration; smoking; chronic alcoholism; body mass index before the beginning of neoadjuvant chemotherapy (NACT); hypertension, diabetes mellitus and hypothyroidism; family history of breast and/or ovarian cancer.

Table S2: Panel of metabolites detected by untargeted Nuclear Magnetic Resonance (^1H -NMR).

Detected Metabolites			
Aminoacids		Others	
Arginine	Lysine	Ascorbate	Ethanol
Asparagine	Phenylalanine	Betaine	Formate
Aspartate	Proline	Carnitine (C0)	Glycerol
Glutamate	Serine	Choline	Pantothenate
Histidine	Threonine	Citrate	Taurine
Isoleucine	Tyrosine	Creatine	Myo Inositol
Leucine	Valine	Creatinine	sn.Glycero.3.phosphocholine (Glycero-3PC)

Table S3: Average relative abundances of the serum metabolites detected by ^1H -NMR according to response to NACT.

Metabolites	Resistant Mean(Sd)	Sensitive Mean(Sd)	p-value	Fold-Change	Variation
Arginine	38.57 (9.47)	34.03 (8.63)	0.0774	1.13	Up
Aspartate	24.37 (7.07)	21.49 (4.7)	0.0581	1.13	Up
Betaine	18.95 (6.01)	18.03 (7.54)	0.6546	1.05	Up
Carnitine	19.42 (5.45)	19.28 (3.91)	0.9055	1.01	Up
Choline	11.93 (3.12)	11.92 (2.92)	0.9959	1	Down
Citrate	31.28 (8.99)	30.96 (9.27)	0.9003	1.01	Up
Formate	25.4 (7.68)	20.98 (6.38)	0.0252	1.21	Up
Glutamate	47.72 (10.82)	43.93 (9.63)	0.1819	1.09	Up
Histidine	28.98 (7.34)	26.71 (7.53)	0.2904	1.08	Up
Isoleucine	31.02 (8.1)	33.28 (9.86)	0.4052	0.93	Down
Pantothenate	8.85 (2.24)	9.65 (3.57)	0.4037	0.92	Down
Phenylalanine	8.44 (3.55)	8.6 (3.98)	0.8903	0.98	Down
Serine	52.78 (12.91)	53.24 (12.29)	0.8947	0.99	Down
Taurine	50.9 (16.49)	48.77 (12.75)	0.578	1.04	Up
Valine	113.59 (22.75)	113.43 (26.24)	0.9825	1	Down
Ascorbate	17.07 (8.5)	15.91 (7.8)	0.6694 (W)	1.07	Up
Asparagine	17.2 (5.03)	16.08 (6.45)	0.576 (W)	1.07	Up
Creatine	19.21 (8.84)	16.55 (7.86)	0.2981 (W)	1.16	Up
Creatinine	18.94 (5.83)	19.92 (6.98)	0.6347 (W)	0.95	Down
Ethanol	52.96 (49.35)	76.4 (108.14)	0.6959 (W)	0.69	Down
Glycerol	60.39 (21.17)	63.43 (25.03)	0.9568 (W)	0.95	Down
Leucine	32.19 (8.16)	37.01 (8.2)	0.004 (W)	0.87	Down
Lysine	35.81 (6.89)	35.18 (8.25)	0.9281 (W)	1.02	Up
Proline	126.16 (36.54)	119.63 (35.4)	0.5356 (W)	1.05	Up
Threonine	44.87 (10.81)	41.73 (11.96)	0.2607 (W)	1.08	Up
Tyrosine	22.71 (6.63)	21.25 (6.02)	0.6959 (W)	1.07	Up
Myo Inositol	17.62 (5.4)	18.69 (4.54)	0.339 (W)	0.94	Down
Glycero 3-PC	22.68 (4.57)	23.92 (4.92)	0.2409 (W)	0.95	Down

Table S4: Contribution of the HR, Ki67, HER2, and serum metabolites as predictors of the response to NACT in different models obtained with RFE+LR.

Models			Intercept	Leucine	Formate	Proline	Valine	HR-	HR+	Ki67-	Ki67+	HER2-	HER2+
Logit (RT-Res/Sens-)	I	Metabolites	2.32	-2.6	1.56	0.65	2.62	-	-	-	-	-	-
	II	Metabolites + HR	2.42	-2.75	1.55	0.8	2.39	-0.5	0.49	-	-	-	-
	III	Metabolites + Ki67	2.4	-2.74	1.64	0.64	2.76	-	-	0.13	-0.12	-	-
	IV	Metabolites + HER2	2.48	-2.61	1.42	0.69	2.59	-	-	-	-	0.34	-0.33
	V	Metabolites + HR + Ki67	2.42	-2.75	1.55	0.81	2.39	-0.5	0.49	-0.02	0.01	-	-
	VI	Metabolites + HR + HER2	2.6	-2.74	1.51	0.84	2.39	-0.5	0.48	-	-	0.33	-0.33
	VII	Metabolites + Ki67 + HER2	2.54	-2.73	1.48	0.7	2.73	-	-	0.06	-0.06	0.33	-0.32
	VIII	Metabolites + Ki67 + HER2 + HR	2.62	-2.77	1.53	0.85	2.4	-0.51	0.5	-0.06	0.06	0.34	-0.34

RFE recursive elimi-tion features
 LR logistic regression

Table S5: Detailed performance of the models I to VIII in predicting the response to NACT.

Model Performance in Train Set (48 resistant/12 sensitive)									
		Resistant	Sensitive	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Acc (%)	CI.95
I	Metabolites	Resistant	35	2					
		Sensitive	13	10	73	83	95	43	75 0.62-0.85
II	Metabolites + HR	Resistant	36	2					
		Sensitive	12	10	75	83	95	45	77 0.64-0.87
III	Metabolites + Ki67	Resistant	38	2					
		Sensitive	10	10	79	83	95	50	80 0.68-0.89
IV	Metabolites + HER2	Resistant	40	2					
		Sensitive	8	10	83	83	95	56	83 0.71-0.92
V	Metabolites + HR + Ki67	Resistant	34	2					
		Sensitive	14	10	71	83	94	42	73 0.6-0.84
VI	Metabolites + HR + HER2	Resistant	40	2					
		Sensitive	8	10	83	83	95	56	83 0.71-0.92
VII	Metabolites + Ki67 + HER2	Resistant	40	2					
		Sensitive	8	10	83	83	95	56	83 0.71-0.92
VIII	Metabolites + Ki67 + HER2 + HR	Resistant	37	2					
		Sensitive	11	10	77	83	95	48	78 0.66-0.88
Model Performance in Validation Set (16 resistant/4 sensitive)									
		Resistant	Sensitive	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Acc (%)	CI.95
I	Metabolites	Resistant	14	3					
		Sensitive	2	1	88	25	82	33	75 0.51-0.91
II	Metabolites + HR	Resistant	13	1					
		Sensitive	3	3	81	75	93	50	80 0.56-0.94
III	Metabolites + Ki67	Resistant	15	4					
		Sensitive	1	0	94	0	79	0	75 0.51-0.91
IV	Metabolites + HER2	Resistant	15	3					
		Sensitive	1	1	94	25	83	50	80 0.56-0.94
V	Metabolites + HR + Ki67	Resistant	12	1					
		Sensitive	4	3	75	75	92	43	75 0.51-0.91
VI	Metabolites + HR + HER2	Resistant	16	2					
		Sensitive	0	2	100	50	89	100	90 0.68-0.99
VII	Metabolites + Ki67 + HER2	Resistant	15	3					
		Sensitive	1	1	94	25	83	50	80 0.56-0.94
VIII	Metabolites + Ki67 + HER2 + HR	Resistant	15	2					
		Sensitive	1	2	94	50	88	67	85 0.62-0.97

PPV: positive predict value/NPV: negative predict value/Acc:accuracy
 RFE recursive elimi-tion features
 LR logistic regression

3. Supplementary figures

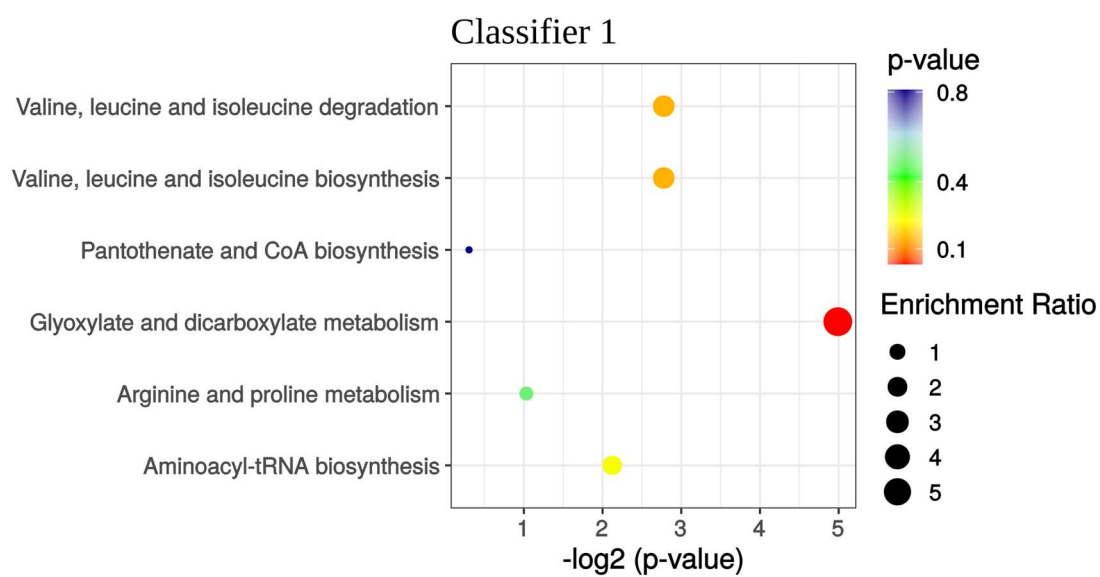


Figure S1. Pathway Enrichment Analysis for the metabolites found as discriminatory, assuming as relevant those pathways with a p -value < 0.05 .

5. DISCUSSÃO

Como já bem explorado na introdução dessa tese, após o câncer de pele não melanoma que apresenta baixa letalidade, o câncer de mama é a neoplasia maligna mais prevalente no mundo. A mortalidade por câncer de mama depende do acesso ao tratamento, mas também do estágio ao diagnóstico, expressão dos marcadores imunohistoquímicos e resposta ao tratamento. Assim, marcadores diagnósticos bem como marcadores preditivos da resposta à quimioterapia, são hoje alvos de muitas pesquisas, pois tem uma grande implicação na prática clínica. Por isso, nesta tese, optamos por inicialmente realizar uma revisão da literatura onde observamos que os autores utilizaram as técnicas de RMN e EM em modelos animal e humano, além dos experimentos *in vitro* com linhagens celulares de diferentes subtipos de CM. Concluímos nesta revisão que estes estudos podem fornecer evidências para uso em práticas clínicas, enquanto a identificação de diferentes perfis metabólicos pode sugerir novos alvos moleculares e biomarcadores metabólicos que contribuirão para a estratificação de pacientes com diferentes subtipos de câncer de mama. Além disso, o conhecimento de vias metabólicas específicas pode impactar na avaliação de novos fármacos com possíveis repercussões na sobrevida de pacientes com câncer de mama. A pronta identificação de tumores resistentes à quimioterapia ajudaria na estratificação mais precoce e precisa dos pacientes, e na escolha de regimes terapêuticos específicos. Nossa revisão, publicada em 2018, recebeu até a presente data, 15 citações no *Web of Science* o que mostra a importância do tema.

Recentemente, Vignoli *et al.* (2021) em uma revisão relacionada a metabólitos e lipoproteínas detectados por RMN em soro e plasma de pacientes concluíram que a metabolômica reflete o metabolismo do tumor, e pode fornecer uma imagem sistêmica do equilíbrio preciso entre o tumor e o metabolismo do hospedeiro, considerando as condições fisiológicas e imunológicas globais de cada paciente com CM. Além disso, demonstraram ter potencial de distinguir pacientes com CM em relação a controles saudáveis com alta precisão de discriminação e ainda, discerniram entre os pacientes com câncer de mama precoce com alto risco de recorrência e aqueles que podem ser curados apenas pela terapia loco-regional. Na era atual da medicina de precisão, isso representaria uma ferramenta inestimável para os médicos, que podem, por sua vez, oferecer terapias adjuvantes mais agressivas ao primeiro grupo e poupar o último de tratamentos cuja relação risco-benefício é baixa. Mostraram também que a aplicação da metabolômica para o estudo dos efeitos e da resposta a drogas (os chamados farmacometabolômicos) pode contribuir para a terapia medicamentosa personalizada, com

exemplos relevantes de suas aplicações no cenário do CM. Por fim, relataram que a lipidômica representa um complemento relativamente novo e promissor para a metabolômica de RMN mais clássica. Nesse cenário específico, a EM tem sido por muito tempo a tecnologia preferida, no entanto, avanços recentes na análise de RMN de plasma sanguíneo e soro permitiram seu uso mais amplo. A análise das lipoproteínas via RMN foi capaz de fornecer mais informações sobre as alterações metabólicas do hospedeiro induzidas por diferentes fatores clínico-patológicos.

Para os artigos 2 e 3 nós utilizamos as amostras estocadas no Biobanco do CAISM. O Biobanco 056 foi aprovado pela CONEP em 2016, sendo que até então não fazia parte da rotina do serviço do hospital. Desde então, todas as pacientes com CM quando atendidas no CAISM são convidadas a conceder material para o biobanco, após serem informadas, aceitarem e assinarem o TCLE, na primeira consulta ou no momento da biópsia. Para todas as mulheres submetidas à biópsia, um fragmento suplementar de tecido é coletado em um criotubo para armazenamento no biobanco.

Neste estudo os prontuários foram preenchidos detalhadamente de uma forma prospectiva tanto das pacientes que entraram no segundo como no terceiro artigo. Dessa forma, planilhas e bancos de dados foram organizadas para que toda a coleta, extração e armazenamento possibilitasse esta pesquisa. Assim, esta pesquisa contribuiu de forma significativa para que o material de mulheres com câncer de mama começasse a ser coletado e armazenado de uma maneira rotineira e organizada.

Inicialmente, estabelecemos uma parceria com o laboratório de Espectrometria de Massas da Universidade São Francisco comandado pela Prof.^a Dr.^a Andréia Porcari, a coorientadora nacional desta tese. Em seu laboratório foi realizada toda a parte experimental do artigo dois com EM.

Foi estabelecida também, uma parceria com o Laboratório Nacional de Biociências que foi imprescindível para o processamento e aquisição destas amostras no aparelho de RMN. O LNBio se dedica à pesquisa e inovação de ponta com foco em biotecnologia e desenvolvimento de medicamentos. Seu laboratório é equipado com o aparelho de RMN e está estrategicamente organizado para encorajar o compartilhamento de infraestrutura e habilidades com os setores acadêmico e industrial. Assim, o LNBio otimiza e direciona seus recursos para as atividades de ciência, tecnologia e inovação.

E por fim, estabelecemos uma parceria fundamental com o laboratório “*Cheng Lab*” focado em metabolômica por RMN, durante o período de cotutela, compondo a segunda metade do programa de doutorado. O laboratório do Dr. Cheng pertence ao Departamento de Patologia

do *Massachusetts General Hospital – Harvard Medical School*, e a *expertise* do coorientador internacional, permitiu amadurecer os resultados obtidos no artigo 3. A permanência em seu laboratório ocorreu de maneira presencial durante aproximadamente 2 anos e este período internacional foi fundamental para intercâmbio de informações, enriquecimento das análises dos dados por meio do aprendizado de técnicas experimentais de última geração e desenvolvimento de novas habilidades, sobretudo em experimentos *in silico*.

Assim, no artigo 2, publicado em 2020, comparamos plasma e tecido de mulheres com carcinoma de mama, assim como plasma de mulheres com carcinoma e sem carcinoma. O principal achado foi a capacidade de metabólitos plasmáticos de identificação de mulheres com CM comparados a mulheres sem CM, mesmo incluindo tipos especiais e não especiais. Por outro lado, houve uma grande diferença entre os metabólitos detectados no tecido e no plasma. Trata-se de um estudo translacional, onde observamos que a metabolômica não direcionada acoplada a algoritmos de biologia de sistemas, além da abordagem convencional, pode potencializar a captura do metaboloma alterado em câncer de mama. Long *et al.* 2021, avaliando tumor e tecido adjacente por EM, observaram que a meta-análise realizada capturou com precisão as alterações nos componentes do metaboloma do câncer de mama. Os metabolismos do carbono central, da glutamina oxidativa, da purina, dos aminoácidos não essenciais e da glutatona se mostraram alterados. Houve também alterações substanciais de espécies de acilcarnitina e processos de oxidação de ácidos graxos. Segundo os autores, estas diversas vias contribuem para o início, progressão, metástase e resistência aos medicamentos do câncer de mama, sendo que a técnica de análise dos dados é extremamente importante para esta identificação. A utilização de um método computacional confiável para auxiliar na interpretação funcional de dados gerados a partir de estudos metabolômicos não direcionados exploratórios foi mais precisa. Ao realizar a análise de via metabólica usando apenas metabólitos previamente identificados, algumas vias metabólicas associadas com câncer em geral e ou câncer de mama foram identificadas. No entanto, o número de vias estatisticamente significativas foi reduzido substancialmente. Concluimos que além da detecção de metabólitos ser diferente em cada estudo, a maneira de analisar os resultados é fundamental. Essa divergência de resultados nos faz pensar na dificuldade de aplicação prática da metabolômica no diagnóstico do câncer de mama.

No artigo 3, avaliamos marcadores de quimiorresistência, utilizando uma amostra de mulheres submetidas à QTNeo. O estudo desta tese contribuiu para identificar por RMN metabólitos obtidos antes do tratamento, presentes no soro de pacientes com CM que foram associados com a expressão de receptores hormonais e com a resposta patológica, grandes

preditores de sobrevida dessas mulheres. Em nosso estudo, descrevemos o uso potencial de metabolômica baseada em RMN na identificação de metabólitos séricos para prever a resposta à quimioterapia neoadjuvante, especialmente quando alinhada a outras informações clínicas relevantes, como RH, Ki67 e HER-2. Nosso estudo também contribui na compreensão do comportamento dos metabólitos em relação à resposta à QTNeo. Observamos que as técnicas analíticas metabolômicas são diferenciadas pelo nível de sensibilidade, volume do material a ser analisado e métodos de preparação da amostra. As melhorias da plataforma analítica permitiram a coleta de alto rendimento de diferentes níveis moleculares com grandes quantidades de dados. A metabolômica é, portanto, uma abordagem atraente para fornecer informações sobre a biologia do câncer, pois é obtida por meio de um perfil metabólico e está associada a métodos complementares (Haukaas *et al.*, 2017). Como claramente explicitado na discussão do Artigo 3, vários metabólitos aumentam e diminuem segundo a quimiorresistência. Diferentes vias metabólicas justificam essas mudanças. Estudos recentes têm se concentrado em abordagens *in vitro* e *in vivo*. No entanto, poucos correlacionaram as duas abordagens para validar a metodologia. Além disso, poucos avaliaram os diferentes subtipos de câncer de mama com relação às funções de tempo, estágio, drogas e duração do tratamento. É importante destacar que dados ômicos permitem uma visão mais clara dos sistemas biológicos a serem obtidos. Dada a natureza complementar dos diferentes níveis moleculares, os dados ômicos podem preencher lacunas entre genótipo e fenótipo, proporcionando assim uma compreensão abrangente das vias celulares, como as envolvidas no câncer de mama. Conforme muito bem explicitado na revisão de Menyhart *et al.* (2021) existe uma enorme diversidade na forma de abordar dados ômicos integrados e multidimensionais. Essas técnicas integram métodos de fusão multi-ômicas ideais para amostras combinadas, comparando abordagens integrativas supervisionadas, semi-supervisionadas e não supervisionadas, examinando o desenvolvimento de vias analíticas padronizadas ou destacando questões críticas relacionadas ao uso de estratégias simples *versus* multi-ômicas. Assim, acreditamos que nosso estudo com metabolômica, possa gerar dados importantes a serem integrados com outras metodologias ômicas. Apesar de suas grandes vantagens, os dados metabolômicos demoram a entrar na prática clínica. Um grande obstáculo é a diferença das abordagens metabolômicas e lacuna entre a geração de grandes volumes de dados em comparação com a capacidade de processamento. Iniciativas progressivas para impor a padronização do processamento de amostras e treinamento multidisciplinar de especialistas para análise e interpretação de dados são vitais para facilitar a tradução dos achados teóricos (Menyhart *et al.* 2021).

6. CONCLUSÃO

• Artigo 1: A análise metabólica de fluidos e tecidos de pacientes com câncer de mama contribuiu para a compreensão da reprogramação da via metabólica envolvida na transformação neoplásica, prognóstico e resistência aos medicamentos. Vários estudos têm sido propostos para avaliar a reprogramação da via metabólica na quimiorresistência e identificar pacientes resistentes à quimioterapia. No entanto, existe a necessidade latente de pesquisas que analisem as vias metabólicas e sua conexão à resposta à quimioterapia. Isto poderia nortear a identificação de diferentes perfis metabólicos e a sugestão de novos alvos moleculares e biomarcadores metabólicos, permitindo uma estratificação de pacientes de diferentes subtipos de câncer de mama. Dessa forma, a elaboração e avaliação de novos fármacos de acordo com o conhecimento de vias metabólicas específicas poderiam repercutir positivamente na sobrevida de pacientes com câncer de mama. A pronta identificação de tumores resistentes à quimioterapia ajudaria em uma estratificação mais precoce e precisa dos pacientes e na escolha de regimes terapêuticos ajustados.

• Artigo 2: Tanto o perfil lipídico do plasma detectado por CL-EM quanto o perfil lipídico do tecido detectado por *DESI-MSI*, puderam ser utilizados como métodos diagnósticos. Alguns indicadores de lesão tecidual não foram representados no plasma nas diferentes metodologias. Assim, este estudo mostrou, nas amostras de tecido e plasma concedidos por mulheres com carcinoma de mama que não foram submetidas anteriormente a nenhum tipo de tratamento, que cada matriz tem sua assinatura molecular própria, e que não há interposição dessas assinaturas do plasma e do tecido na mesma paciente.

• Artigo 3: A análise metabolômica do soro das pacientes ofereceu acesso rápido às alterações metabólicas associadas à resistência e sensibilidade ao tratamento. Quando associamos ao *status* do marcador as técnicas de *RFE* e de regressão logística, foi obtido um painel metabolômico simples, que pôde ser usado para auxiliar no prognóstico e na previsão clínica da resposta à QTNeo de pacientes com CM. O estudo de prova de princípio relatado atestou o poder dessas técnicas em acelerar a definição do prognóstico do CM com excelente precisão. Embora a validação mais rigorosa dessa abordagem não direcionada com um grupo maior de pacientes seja necessária, este é o primeiro passo para o desenvolvimento de uma estratégia eficiente para a descoberta precoce de pacientes com CM resistentes à QTNeo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Badu-Tawiah, A. K.; Eberlin, L. S.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G. Chemical aspects of the extractive methods of ambient ionization Mass Spectrometry. *Annu Rev Phys Chem.* 2013 Jan;64:481-505.
- Bemis, K. D.; Harry, A.; Eberlin, L. S.; Ferreira, C.; van de Ven, S. M.; Mallick, P.; Stolowitz, M.; Vitek, O. Cardinal: An R package for statistical analysis of Mass Spectrometry-Based Imaging experiments. *Bioinformatics.* 2015 Jul 15;31(14):2418-20.
- Bokhart, M. T.; Nazari, M.; Garrard, K. P.; Muddiman, D. C. MSiReader v1.0: Evolving open-source Mass Spectrometry Imaging software for targeted and untargeted analyses. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2018 Jan;29(1):8-16.
- Bossuyt, V.; Provenzano, E.; Symmans, W. F.; Boughey, J. C.; Coles, C.; Curigliano, G.; Dixon, J. M.; Esserman, L. J.; Fastner, G.; Kuehn, T.; Peintinger, F.; von Minckwitz, G.; White, J.; Yang, W.; Badve, S.; Denkert, C.; MacGrogan, G.; Penault-Llorca, F.; Viale, G.; Cameron, D. Breast International Group-North American Breast Cancer Group (BIG-NABCG) collaboration. Recommendations for standardized pathological characterization of residual disease for neoadjuvant clinical trials of breast cancer by the BIG-NABCG collaboration. *Ann Oncol.* 2015 Jul;26(7):1280-91.
- Brown, L. D.; Cai, T. T.; DasGupta, A. Interval estimation for a binomial proportion. *Statist. Sci.* 2001 Apr;16 2, 101–133.
- Cancello, G.; Maisonneuve, P.; Rotmensz, N.; Viale, G.; Mastropasqua, M. G.; Pruneri, G.; Montagna, E.; Iorfida, M.; Mazza, M.; Balduzzi, A.; Veronesi, P.; Luini, A.; Intra, M.; Goldhirsch, A.; Colleoni, M. Progesterone receptor loss identifies Luminal B breast cancer subgroups at higher risk of relapse. *Ann Oncol.* 2013 Mar;24(3):661-8.
- Cardoso M. R.; Santos, J. C.; Ribeiro, M. L.; Talarico, M. C. R.; Viana, L. R.; Derchain, S. F. M. A metabolomic approach to predict breast cancer behavior and chemotherapy response. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 21;19(2):617.
- Cheang, M. C.; Chia, S. K.; Voduc, D.; Gao, D.; Leung, S.; Snider, J.; Watson, M.; Davies, S.; Bernard, P. S.; Parker, J. S.; Perou, C. M.; Ellis, M. J.; Nielsen, T. O. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with Luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009 May 20;101(10):736-50.
- Clendinen, C. S.; Monge, M. E.; Fernández, F. M. Ambient Mass Spectrometry in metabolomics. *Analyst.* 2017 Aug 21;142(17):3101-3117.
- Denkert, C.; Bucher, E.; Hilvo, M.; Salek, R.; Orešič, M.; Griffin, J.; Brockmöller, S.; Klauschen, F.; Loibl, S.; Barupal, D. K.; Budczies, J.; Iljin, K.; Nekljudova, V.; Fiehn, O. Metabolomics of human breast cancer: New approaches for tumor typing and biomarker discovery. *Genome Med.* 2012 Apr 30;4(4):37.

Dettmer, K.; Aronov, P.A.; Hammock, B. D. Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Mass Spectrom Rev.* 2007 Jan-Feb;26(1):51-78.

Esserman, L. J.; Berry, D. A.; DeMichele, A.; Carey, L.; Davis, S.E.; Buxton, M.; Hudis, C.; Gray, J. W.; Perou, C.; Yau, C.; Livasy, C.; Krontiras, H.; Montgomery, L.; Tripathy, D.; Lehman, C.; Liu, M. C.; Olopade, O. I.; Rugo, H. S.; Carpenter, J. T.; Dressler, L.; Chieng, D.; Singh, B.; Mies, C.; Rabban, J.; Chen, Y. Y.; Giri, D.; van 't Veer, L.; Hylton, N. Pathologic complete response predicts recurrence-free survival more effectively by cancer subset: Results from the I-SPY 1 TRIAL--CALGB 150007/150012, ACRIN 6657. *J Clin Oncol.* 2012 Sep 10;30(26):3242-9.

Germano, S.; O'Driscoll, L. Breast cancer: Understanding sensitivity and resistance to chemotherapy and targeted therapies to aid in personalized medicine. *Curr Cancer Drug Targets.* 2009 May;9(3):398-418.

Goldhirsch, A.; Wood, W. C.; Coates, A. S.; Gelber, R. D.; Thürlimann, B.; Senn, H. J.; Panel members. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011 Aug;22(8):1736-47.

Gorochategui, E.; Lacorte, S.; Tauler, R.; Martin, F. L. Perfluoroalkylated substance effects in *Xenopus laevis* A6 kidney epithelial cells determined by ATR-FTIR spectroscopy and chemometric analysis. *Chem Res Toxicol.* 2016 May 16;29(5):924-32.

Gowda, G. A.; Djukovic, D. Overview of Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Opportunities and challenges. *Methods Mol Biol.* 2014 Feb;1198:3-12.

Guan, W.; Zhou, M.; Hampton, C. Y.; Benigno, B. B.; Walker, L. D.; Gray, A.; Fernández, F. M. Ovarian cancer detection from metabolomic Liquid Chromatography/Mass Spectrometry data by support vector machines. *BMC Bioinformatics.* 2009 Aug 22;10:259.

Guyon, I.; Weston, J.; Barnhill, S.; Vapnik, V. Gene selection for cancer classification using support vector machines. *Machine learning.* 2002 Sep;46,1-3:389-422.

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74.

Hanahan, D. Rethinking the war on cancer. *Lancet.* 2014 Feb 8;383(9916):558-63.

Hart, C. D.; Vignoli, A.; Tenori, L.; Uy, G. L.; Van To, T.; Adebamowo, C.; Hossain, S. M.; Biganzoli, L.; Risi, E.; Love, R. R.; Luchinat, C.; Di Leo, A. Serum metabolomic profiles identify ER-Positive early breast cancer patients at increased risk of disease recurrence in a multicenter population. *Clin Cancer Res.* 2017 Mar 15;23(6):1422-1431.

Haukaas, T. H.; Euceda, L.R.; Giskeødegård, G. F.; Bathen, T. F. Metabolic portraits of breast cancer by HR MAS MR spectroscopy of intact tissue samples. *Metabolites.* 2017 May 16;7(2):18.

Instituto Nacional do Câncer, INCA 2020. Tipos de cancer: Cancer de mama, [Internet], [cited 15 December 2020]. Available from <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>.

Jeselson, R.; Buchwalter, G.; Angelis, C.; Brown, M.; Schiff, M. ESR1 mutations as a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2015 Oct;12(10):573–583.

Jove, M.; Collado, R.; Quiles, J. L.; Ramírez-Tortosa, M. C.; Sol, J.; Ruiz-Sanjuan, M.; Fernandez, M.; de la Torre Cabrera, C.; Ramírez-Tortosa, C.; Granados-Principal, S.; Sánchez-Rovira, P.; Pamplona, R. A plasma metabolomic signature discloses human breast cancer. *Oncotarget.* 2017 Mar 21;8(12):19522-19533.

Kuhn, M.; Wing, J.; Weston, S.; Williams, A.; Keefer, C.; Engelhardt, A.; Hunt, T. Classification and regression training. R package version 6.0-88 (2021). Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=caret>.

Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. Metabonomics in pharmaceutical R&D. *FEBS J.* 2007 Mar;274(5):1140-51.

Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. So what's the deal with metabonomics? *Anal Chem.* 2003 Sep 1;75(17):384A-391A.

Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Everett, J. R. Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids. *Conc in Mag Res.* 2000 Jul;12,(5):289-320.

Long, N. P.; Heo, D.; Kim, H. Y.; Kim, T. H.; Shin, J. G.; Lee, A.; Kim, D. H. Metabolomics-guided global pathway analysis reveals better insights into the metabolic alterations of breast cancer. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2021 Aug;202:0731-7085.

Marchiq, I.; Pouysségur, J. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H(+) symporters. *J Mol Med (Berl).* 2016 Feb;94(2):155-71.

Menyhart, O.; Gyorffy, B. Multi-Omics approaches in cancer research with applications in tumor subtyping, prognosis, and diagnosis. *Comput Struct Biotechnol* 2021 Jan 22:949–60.

Mishra, P.; Ambs, S. Metabolic signatures of human breast cancer. *Mol Cell Oncol.* 2015 Jul-Sep;2(3):e992217.

Morrison, D. H.; Rahardja, D.; King, E.; Peng, Y.; Sarode, V. R. Tumour biomarker expression relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer. *Br J Cancer.* 2012 Jul 10;107(2):382-7.

Murata, T.; Yanagisawa, T.; Kurihara, T.; Kaneko, M.; Ota, S.; Enomoto, A.; Tomita, M.; Sugimoto, M.; Sunamura, M.; Hayashida, T.; Kitagawa, Y.; Jinno, H. Salivary

metabolomics with alternative decision tree-based machine learning methods for breast cancer discrimination. *Breast Cancer Res Treat.* 2019 Oct;177(3):591-601.

Nicholson, J. K.; Lindon, J. C.; Holmes, E. 'Metabonomics': Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica.* 1999 Nov;29(11):1181-9.

Pang, Z.; Chong, J.; Zhou, G.; de Lima Morais, D. A.; Chang, L.; Barrette, M.; Xia, J. *MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights.* *Nucleic Acids Research,* 2021 Oct;49(W1),W388–W396.

Parker, J. S.; Mullins, M.; Cheang, M. C.; Leung, S.; Voduc, D.; Vickery, T.; Davies, S.; Fauron, C.; He, X.; Hu, Z.; Quackenbush, J. F.; Stijleman, I. J.; Palazzo, J.; Marron, J. S.; Nobel, A. B.; Mardis, E.; Nielsen, T. O.; Ellis, M. J.; Perou, C. M., Bernard, P. S. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009 Mar 10;27(8):1160-7.

Partridge, A. H.; Hughes, M. E.; Warner, E. T.; Ottesen, R. A.; Wong, Y. N.; Edge, S. B.; Theriault, R.; Blayney, D. W.; Niland, J. C.; Winer, E.P.; Weeks, J.C.; Tamimi, R. M. Subtype-dependent relationship between young age at diagnosis and breast cancer survival. *J Clin Oncol.* 2016 Sep 20;34(27):3308-14.

Penkert, J.; Ripperger, T.; Schieck, M.; Schlegelberger, B.; Steinemann, D.; Illig, T. On metabolic reprogramming and tumor biology: A comprehensive survey of metabolism in breast cancer. *Oncotarget.* 2016 Oct 11;7(41):67626-67649.

Peterson, A. L.; Walker, A. K.; Sloan, E. K.; Creek, D. J. Optimized method for untargeted metabolomics analysis of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Metabolites.* 2016 Sep 22;6(4):30.

Porcari, A. M.; Negrão, F.; Tripodi, G. L.; Pitta, D. R.; Campos, E. A.; Montis, D. M.; Martins, A. M. A.; Eberlin, M. N.; Derchain, S. F. M. Molecular signatures of high-grade cervical lesions. *Front Oncol.* 2018 Apr 12;8:99.

Porcari, A. M.; Zhang, J.; Garza, K. Y.; Rodrigues-Peres, R. M.; Lin, J. Q.; Young, J. H.; Tibshirani, R.; Nagi, C.; Paiva, G. R.; Carter, S. A.; Sarian, L. O.; Eberlin, M. N.; Eberlin, L. S. Multicenter study using Desorption-Electrospray-Ionization-Mass-Spectrometry Imaging for breast-cancer diagnosis. *Anal Chem.* 2018 Oct 2;90(19):11324-11332.

Scalbert, A.; Brennan, L.; Fiehn, O.; Hankemeier, T.; Kristal, B. S.; van Ommen, B.; Pujos-Guillot, E.; VeHReij, E.; Wishart, D.; Wopereis, S. Mass-Spectrometry-Based Metabolomics: Limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. *Metabolomics.* 2009 Dec;5(4):435-458.

Shajahan-Haq, A. N.; Cheema, M. S.; Clarke, R. Application of metabolomics in drug resistant breast cancer research. *Metabolites.* 2015 Feb 16;5(1):100-18.

Sheng, J.; Shao, M.; Zhang, Q.; Zhou, R.; Wang, L.; Xin, Y. Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and normal aging distinguished by multi-modal parcellation and machine learning. *Sci Rep.* 2020 Mar 25;10(1):5475.

Steding, C. E. Creating chemotherapeutic-resistant breast cancer cell lines: Advances and future perspectives. *Future Oncol.* 2016 Jun;12(12):1517-27.

Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249.

Symmans, W. F.; Peintinger, F.; Hatzis, C.; Rajan, R.; Kuerer, H.; Valero, V.; Assad, L.; Poniecka, A.; Hennessy, B.; Green, M.; Buzdar, A. U.; Singletary, S. E.; Hortobagyi, G. N.; Pusztai, L. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2007 Oct 1;25(28):4414-22.

Vignoli, A.; Muraro, E.; Miolo, G.; Tenori, L.; Turano, P.; Di Gregorio, E.; Corona, G. Effect of estrogen receptor status on circulatory immune and metabolomics profiles of HER2-Positive breast cancer patients enrolled for neoadjuvant targeted chemotherapy. *Cancers.* 2020 Mar;12(2):314.

Wang, Y.; Yin, Q.; Yu, Q.; Zhang, J.; Liu, Z.; Wang, S.; Liv, S.; Niu, Y. A retrospective study of breast cancer subtypes: The risk of relapse and the relations with treatments. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Nov;130(2):489-98.

Warburg, O.; Wind, F.; Negelein, E. The Metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol.* 1927 Mar 7;8(6):519-30.

Wei, S.; Liu, L.; Zhang, J.; Bowers, J.; Gowda, G. A.; Seeger, H.; Fehm, T.; Neubauer, H. J.; Vogel, U.; Clare, S. E.; Raftery, D. Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Mol Oncol.* 2013 Jun;7(3):297-307.

Yardley, D. A. Drug resistance and the role of combination chemotherapy in improving patient outcomes. *Int J Breast Cancer.* 2013;2013:137414.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO I



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Abordagem metabólica para predição da resposta à quimioterapia neoadjuvante em mulheres com diferentes subtipos de câncer de mama

Pesquisador: Marcella Regina Cardoso

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 69699717.0.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.203.692

Apresentação do Projeto:

O câncer de mama é um problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. É o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres contabilizando 230 mil novos casos e 40mil mortes no ano de 2015 no mundo(1). No Brasil, o câncer de mama teve uma incidência de 57.960 casos em 2016, com uma mortalidade de 14.388 em 2013 (2). A taxa de mortalidade por câncer de mama varia nas diversas regiões do mundo se justifica pelo estágio ao diagnóstico, qualidade do tratamento, prevalência dos diversos subtipos e pela resposta à terapia (3). O tratamento do câncer de mama inclui cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e terapia-alvo (4). O câncer de mama é uma doença heterogênea classificada em diversos subtipos biológicos, moleculares e histológicos que conferem uma variabilidade de prognóstico e resposta à quimioterapia (5). Geneticamente, foram classificados em clusters hierárquicos nos subtipos basal like, Luminal A, Luminal B, Erb-B2+ (HER2 hiperexpresso) e normal like sendo que esses subtipos genéticos associados a características tumorais e evolução clínica: por exemplo, mulheres com carcinoma basal like tem uma sobrevida menor que mulheres com carcinomas Luminal A (6)(7). Diversos testes comercialmente disponíveis, como o PAM50, podem ser utilizados para classificar o carcinoma de mama nesses cinco subtipos intrínsecos (8). Entretanto, outros métodos biológicos permitem classificar os carcinomas de mama: o reverse phase protein array (RPPA),

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.203.692

baseado na expressão de 171 proteínas, define os subtipos de câncer de mama em basal, HER2, Luminal A, Luminal A/B. Acrescenta, porém, dois novos subgrupos, denominados reativo I e reativo II, relacionados à expressão de proteínas possivelmente produzidas pelo microambiente em torno do carcinoma (9). Na prática clínica, o “padrão-ouro” para classificação dos carcinomas de mama é a aferição da presença por imunohistoquímica dos receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RPg) e do Ki67, e a expressão por imunohistoquímica e Fluorescence in situ Hybridization (FISH) do receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2) (10). Os receptores hormonais, presentes em cerca de 70% dos carcinomas de mama, diferenciam os carcinomas Luminais e não Luminais. O subtipo Luminal A, expressa fortemente RE e RPg, não expressa o HER2 e tem baixa expressão do Ki67. São mais frequentes em mulheres com idade mais avançada, têm melhor prognóstico, respondem a hormonioterapia e possuem resposta intermediária à quimioterapia (11)(12)(13). O subtipo Luminal B, embora expresse RE, pode ou não expressar os receptores de RPg, ou de HER2, bem como ter ou não Ki67 elevado. Entre os Luminais B, os HER2 positivos possuem o pior prognóstico e se manifestam em mulheres mais jovens que os HER2 negativos (14)(15). O tratamento dos carcinomas Luminais B HER2 negativos é baseado em quimioterapia com associação de antracíclicos e taxanos e hormonioterapia com Tamoxifeno ou inibidores da aromatase. Carcinomas Luminais B possuem pior resposta ao Tamoxifeno por expressar genes envolvidos com resistência a esta droga (16). Os tumores não luminais se caracterizam por não expressarem receptores, podendo ou não expressarem receptores para HER2 (13)(17). São mais frequentes em mulheres jovens, possuem pior prognósticos apesar da boa resposta inicial à quimioterapia. Os denominados triplo-negativos, que correspondem aos carcinomas RE negativo, RPg negativo e HER2 negativo, são carcinomas indiferenciados, detectados em estádios avançados com linfonodos comprometidos e biologicamente mais agressivos. Embora apresentem altas taxas de resposta patológica completa após quimioterapia neoadjuvante com antracíclicos e taxanos, apresentam também maior taxa de recorrência e menor sobrevida (17). Estudos pré-clínicos e clínicos sugerem que, mulheres com carcinomas triplo-negativos possam se beneficiar com quimioterapia baseada em platina. Vários estudos randomizados estão sendo conduzidos em pacientes com carcinoma triplo-negativo inicial ou avançado, essencialmente relacionados com sobrevida de longo prazo (18). Nos tumores não luminais HER2-positivos, são utilizadas terapias alvo, com drogas anti-HER2 (Trastuzumab), anti-HER2/HER3 (Pertuzumab) ou anti HER2 e EGFR (Lapatinibe) (16). Embora a classificação dos carcinomas de mama em subtipos moleculares ou imunohistoquímicos tenha contribuído para a melhor estratificação das pacientes em diversos regimes terapêuticos (19), um número expressivo

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.203.692

de mulheres com câncer de mama progride ou recidiva, apesar da terapia sistêmica. Independentemente do subtipo de carcinoma de mama, a resistência à droga permanece um problema crítico e não resolvido. A resistência a drogas pode ser inerente à quimioterapia ou hormonioterapia de primeira linha, ou o paciente pode desenvolver resistência e progressão anos após o tratamento inicial (20). A resistência a drogas talvez seja o principal fator de morte associada ao câncer e traz um significativo prejuízo às intervenções terapêuticas. A quimioterapia, principal ferramenta para o tratamento sistêmico do câncer de mama, beneficia apenas 50% das usuárias devido à resistência à múltiplas drogas(21). Por exemplo, mais de 30% das mulheres com câncer de mama metastático não respondem à quimioterapia de primeira linha com antracíclicos e taxanos, e mesmo com a adição de agentes biológicos, a doença progride em geral em menos de 1 ano (20)(22). Em relação à hormonioterapia, cerca de 40% a 50% das mulheres com carcinomas Luminais tratadas com terapia endócrina irão evoluir com hormônio-resistência. As vias ER-regulatórias que poderiam contribuir para um fenótipo hormônio-resistente ainda não são bem conhecidas (23). As interações entre a célula tumoral e o estroma ao redor, contribuem para resposta ou resistência à terapia. A resistência à quimioterapia pode ser inata ou adquirida. A resistência que parece existir antes do tratamento é chamada resistência inata, intrínseca, primária ou de novo e depende essencialmente do subtipo de câncer e de uma variedade de fatores que influenciam o microambiente tumoral. Já a resistência adquirida se justifica pela seleção, pela droga em uso, de clones de células resistentes ou pelo acúmulo de mutações em células inicialmente sensíveis. A resistência adquirida pode ser categorizada em farmacológica (metabolismo, excreção, acesso transporte das drogas); aumento da atividade ou expressão de genes (vias sinalizadoras de sobrevivência, oncogênese e amplificação gênica); diminuição da atividade ou expressão de genes (controle do ciclo celular e proteínas check point, apoptose, proteínas inibidores de quinase); alterações nas moléculas alvo (mutações ou mudanças na disponibilidade) e outros (20)(22). Independentemente do subtipo de carcinoma, a resistência adquirida, é um desafio clínico de grande relevância. Para o surgimento do câncer é necessário um acúmulo de fatores que, em conjunto, contribuam para uma evolução clonal. Esses fatores poderiam ser agrupados em duas grandes categorias: ativação de proto-oncogenes (MYC, RAS, e/ou via do PI3K-AKT-mTOR, entre outros) que estimulam a proliferação celular e; mutação/inativação de genes supressores de tumor envolvidos na supressão de crescimento (RB, TP53), no controle do ciclo celular (CHEK2), reparo do DNA (BRCA1/2), ou sinalização de restrição de proliferação (PTEN). Quando essas alterações estão presentes nas células germinativas o indivíduo afetado tem maior predisposição ao câncer. Entretanto, além dessas alterações

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.203.692

genéticas, é necessária uma reprogramação metabólica das células cancerosas e do estroma adjacente. O modelo biológico atual da carcinogênese e resistência a drogas considera várias vias como proliferação celular, evasão dos mecanismos envolvidos na supressão de crescimento celular, resistência à morte celular, instabilidade genômica e mutações, replicação de células imortalizadas, indução da angiogênese, ativação da invasão e metástases, inflamação promovida pelo tumor, escape do sistema imunológico, atribuindo à reprogramação do metabolismo energético um papel preponderante (24)(25). A avaliação das vias metabólicas permite uma maior compreensão dos modelos bioenergéticos das células tumorais. O perfil metabólico das células do câncer de mama é diferente do das células epiteliais mamárias normais, assim como o perfil metabólico das células do câncer de mama sensíveis a drogas é diferente do das resistentes (26). As células humanas normais utilizam a glicose como fonte de energia: na presença de oxigênio. A glicose metabolizada no citosol resulta na produção de piruvato que, após entrar na mitocôndria, onde é oxidado pelo ciclo de Krebs e culmina na geração de adenina tri-fosfato (ATP), principal fonte de armazenamento da energia celular. Entretanto, nas células cancerosas, mesmo em condições aeróbicas, a maior parte do piruvato é desviada da mitocôndria e, sob a ação da desidrogenase láctica (LDH/LDHA), gera lactato, processo tipicamente reservado para ambientes com pouco oxigênio. A produção de lactato na presença de oxigênio é denominada “efeito Warburg” ou glicólise aeróbica (27)(28)(29). De fato, observa-se que muitos cânceres humanos possuem um aumento da absorção e utilização da glicose (29). Esse consumo aumentado de glicose está associado com ativação de oncogenes (RAS e MYC) interferindo assim na proliferação e, mutação de genes supressores (TP53), na inativação da supressão do crescimento e atenuação da apoptose. Durante o crescimento neoplásico ocorre uma progressiva hipóxia resultante da ineficiência da neovascularização, levando a expressão de múltiplas enzimas relacionadas com a via glicolítica (24). Além de fornecer energia e biomoléculas para as células cancerosas, o desvio glicolítico contribui para a comunicação célula a célula e assim, reforça a hipótese de uma simbiose entre as células cancerosas e o estroma adjacente (microambiente tumoral). No câncer, o lactato funciona como fonte de energia e de sinalização molecular, mimetizando mecanismos fisiológicos de alta performance anaeróbia. A complexidade do microambiente tumoral assim como as interconexões entre diferentes tipos de células dificultam a compreensão do circuito do lactato nos tumores (30). Metabolômica é o estudo quantitativo de processos metabólicos em sistemas biológicos baseado em dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e análise estatística multivariada. Os dados bioquímicos obtidos e interpretados utilizando essa abordagem fornecem uma perspectiva mais abrangente dos processos patológicos do que aquela obtida com

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.203.692

base em marcadores biológicos isolados. A metabolômica vem contribuir no diagnóstico ou tratamento do câncer de mama como ensaio composto ou derivado de medidas moleculares e interpretadas por modelos computacionais específicos de maneira a produzir um resultado clinicamente relevante: um teste baseado em metabolômica deverá estar associado com fenótipo de interesse, tais como os diferentes subtipos de câncer de mama, evolução clínica ou avaliação pré-clínica da terapêutica a ser utilizada (30). A metabolômica utiliza essencialmente duas abordagens: uma determinada target e outra untarget. A metabolômica target objetiva identificar uma via ou um metabólito de interesse, baseado no conhecimento prévio do envolvimento de determinada via ou metabólito na composição do metaboloma da amostra investigada. Já a abordagem untargeted procura identificar e quantificar o maior número possível de metabólitos em uma amostra e é esta abordagem que será utilizada neste projeto. Dentre as principais técnicas empregadas em estudos metabolômicos, estão a espectrometria de massas (EM) que pode estar acoplada a técnicas de separação como a cromatografia líquida (EM-CL) ou gasosa (EM-CG), assim como a ressonância magnética nuclear (RMN) (31). A RMN apresenta como principais vantagens ser altamente reprodutível, quantitativa, custo relativamente baixo, e traz informações estruturais que permitem a identificação acurada do metabólito. Além disso, não necessita de tratamentos físicos ou químicos antecedentes à análise, evitando perda de alguns metabólitos e não utiliza radiação ionizante, conferindo grande vantagem para aplicações em amostras sensíveis ou em organismos vivos (32)(33). Recentemente, vários estudos in vitro, ex vivo e in vivo foram realizados com objetivo de compreender as vias metabólicas envolvidas na resistência a drogas em câncer de mama. Entre os principais estudos in vitro, Ryu e colaboradores (2011) observaram que a glicólise, a produção de lactatos e ATP estariam associados a resistência à adriamicina em cultura de células MCF-7 sensíveis e MCF-7 resistentes. Os resultados deste estudo sugerem que a regulação do metabolismo dos aminoácidos de enxofre pode ser um possível alvo terapêutico para as células quimiorresistentes (34). Cao e colaboradores (2013) observaram que a adriamicina desacelerou várias vias metabólicas, dentre as quais, vias de síntese de purinas, pirimidinas, glutatona e glicólise em células MCF-7 (RE+), além de agravar o estresse oxidativo. Os resultados obtidos sugeriram que a metabolômica celular e a medição quantitativa dos marcadores metabólicos podem potencialmente ser utilizadas para avaliar os efeitos antitumorais e para a pesquisa de agentes candidatos antitumorais (35). Morvan (2013) observou um aumento de citrato, gluconato, ácidos graxos polinsaturados, além de diminuição do glicerofosfolina e etanilamina associados a estresse oxidativo severo in vitro, em células MCF-7 expostas a ascididemia. Conclui que as alterações metabólicas centrais em células de câncer de mama são

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.203.692

essencialmente repostas ao estresse oxidativo e anti-inflamatórias(36). Bayet –Robert& Morvan (2013) e Morvan (2013) reportaram mudança nos metabolismos da glutatona e dos lipídeos assim como na utilização glicose em células MCF-7 e MDA MB- 231 expostas à curcumina e docetaxel (36)(37). Stewart e colaboradores (2016) comparando as vias metabólicas em linhagens celulares de carcinoma de mama Luminal A (BT474 e MCF-7) e triplo-negativo (MDA-MB-231 e MDA-MB-468) observaram que essas linhagens celulares apresentam diferentes respostas metabólicas ao tratamento com paclitaxel. Por exemplo, tanto nos luminais A quanto nos triplo-negativos, colina e seus metabólitos aumentaram na presença do paclitaxel. Já a colina, acetilcolina, fosfocolina e sn-glicero-3-fosfocolina aumentaram durante o tratamento na linhagem triplo-negativa MDA-MB-468 mas não na MDA-MB-231 (com exceção da sn-glicero-3-fosfocolina). O nível de mio-inositol foi maior nas células Luminais A quando comparadas com triplo-negativo e aumentou durante o tratamento nas linhagens Luminal A(38).A partir destes estudos foi possível notar que as vias da glicólise e da glutatona foram as mais impactadas quando as pacientes foram submetidas ao tratamento com adriamicina e docetaxel, de modo que um novo olhar deverá se voltar agora para estas vias bioquímicas de maneira a expandir a compreensão dos efeitos destes quimioterápicos, bem como de possíveis mecanismos de resistência até então inexplorados.Em modelo ex vivo Astene colaboradores (2015) observaram que tecidos de câncer de mama de camundongos singênicos (K14cre;Brca1F/Fp53F/F) resistentes e sensíveis a docetaxel apresentam diferentes modificações das vias metabólicas durante o tratamento. Avaliando tumores sensíveis a docetaxel, os autores observaram que o perfil metabólico após 48 horas de tratamento foi caracterizado pelo alto nível de fosfocolina quando comparado com tumores não tratados. Nessas primeiras 48 horas, em tumores sensíveis, a proporção da colina total, glicerofosfocolina + fosfocolina, colina e creatinina aumentou significativamente. Concluíram que em tumores sensíveis à docetaxel, o aumento de metabólitos contendo colina observados com 1-2 dias após do início da terapia, corresponde ao período de maior atividade apoptótica. Já nos tumores resistentes à docetaxel, os metabólitos derivados da colina não aumentaram durante o tratamento. Entretanto, as concentrações relativas de componentes de colina são maiores no pré-tratamento em tumores resistentes à docetaxel do que em tumores sensíveis (39). São poucos os estudos que avaliaram o perfil metabólico sérico em mulheres com câncer de mama. Wei e colaboradores (2013) avaliaram o perfil metabólico sérico de 28 mulheres com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante com epirrubucina e ciclofosfamida seguido de doxorubicina a associado a trastuzumab nos casos HER2 positivo. Compararam o perfil metabólico das 8 mulheres com resposta patológica completa (pCR), com as 14 mulheres com resposta parcial (RP)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.203.692

e as 6 mulheres com doença estacionária (DE). Identificaram um aumento progressivo de treonina, glutamina e ácido linoléico em pacientes com pCR, seguindo daquelas com RP e DE com diminuição progressiva da isoleucina. O mecanismo relacionado à diminuição da regulação em pacientes resistentes à quimioterapia quando comparado com pacientes com resposta patológica completa não é bem compreendido(40). As análises in vivo mostram que a via do ácido linoléico foi a que mais sofreu alteração após o tratamento das pacientes com a doxorubicina. Jové e colaboradores (2017) compararam o perfil metabólico das amostras de soro de 20 mulheres saudáveis com 91 pacientes com câncer de mama independente do subtipo. Foram encontrados 1269 metabólitos com diferentes concentrações no soro em ambos os grupos e 354 metabólitos pertencentes à biossíntese de aminoacil-tRNA, metabolismo da arginina e prolina e vias de biossíntese do ácido biliar primário. No grupo de pacientes com câncer, os metabólitos que estavam associados com a doença foram o ácido capríco, staramida, taurina e o ácido linoléico. Estes metabólitos podem promover a oncogênese pela mudança de grau de diferenciação do tumor, por induzir fenótipo metastático ou tornar os tumores mais viáveis em condição de estresse oxidativo. Os autores sugerem que, em qualquer caso, os estudos metabolômicos utilizando soro de pacientes com câncer de mama podem ser úteis para descrever biomarcadores de diagnóstico e/ou prognóstico, bem como para monitorizar o tratamento (41). Hart e colaboradores (2017) compararam o soro de 590 pacientes com câncer de mama inicial RE negativo com aquele de 109 pacientes com câncer metastático também RE negativos, utilizando amostras de soro coletadas antes do tratamento armazenadas em um biobanco. As pacientes com câncer metastático apresentaram níveis séricos aumentados de citrato, colina, acetato, formato, lactato, glutamato, fenilalanina, glicina, alanina, prolina, tirosina, isoleucina, creatina, creatinina e metatona quando comparadas com mulheres com câncer inicial. Já, os níveis séricos de glicose e glutamina se mostraram diminuídos em mulheres com câncer metastático. As pacientes com câncer inicial apresentaram níveis séricos aumentados de colina, tirosina, valina, lactato, isoleucina e, níveis diminuídos de glutamato. Os autores defendem que as diferenças no estado de expressão do gene tumoral também se refletem no metaboloma, contribuindo para o perfil metabólico, caso em que os sinais metabolômicos correlacionados com a recidiva podem ser dependentes do perfil de expressão gênica (42). O presente estudo aborda o papel da metabolômica em fornecer informações prognósticas independentes e relevantes no contexto da estratificação do risco genômico. Análises metabolômicas nos fluidos e tecidos de pacientes com câncer contribuem para a compreensão das reprogramações das vias metabólicas envolvidas na transformação neoplásica, prognóstico ou resistência à drogas (24)(29). Vários estudos têm sido propostos para avaliar a

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.203.692

reprogramação das vias metabólicas na quimiorresistência com o objetivo de identificar pacientes resistentes à quimioterapia. A identificação antecipada dos tumores resistentes à quimioterapia poderá contribuir para a estratificação mais precoce e precisa das pacientes, com regimes terapêuticos mais bem ajustados à sua condição (40)(43). Hipótese: A resistência ao tratamento quimioterápico está associada à alteração metabólica subjacente; A alteração metabólica subjacente é específica para cada droga; A resistência ou sensibilidade a drogas podem determinadas por meio de bioindicadores, Vias bioquímicas e metabólicas são impactadas em diferentes intensidades durante a indução de resistência; Metodologia Proposta: Análises in vitro: Linhagens celulares Serão usadas as linhagens celulares MCF-7(RE+) sensível e MCF-7Adr(RE+) resistente a adriamicina e taxol e MDA-MB-231 (RE-) sensível. As linhagens serão obtidas do Cell Bank-Rio Janeiro e serão cultivadas no meio DMEM acrescentado de 10% de soro fetal bovino e 1% penicilina e estreptomicina (GIBCO-BRL, Gaithersburg, USA) e 2 mM/ L- glutamina em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂a 37°C. Dez mil células destas linhagens serão semeadas em placas de 96 wells de fundo arredondado em 80 L de meio de cultura e deixadas 24h em cultura para que façam aderência no fundo e iniciam a proliferação, atingindo uma confluência de 70 a 80 %. Após isso, serão adicionados 20 L do quimioterápico. Cada tratamento será feito em triplicata. Após 1 à 4 dias de cultura à 37°C e 5% CO₂, adicionaremos 20 L de solução MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (5 mg/mL) e as placas serão incubadas por 4h a 37°C e 5% CO₂. Após estas 4 h serão adicionados 100 L de solução SDS(dodecilsulfato de sódio 10%). Durante estas 4h o MTT (composto de coloração amarelada) é metabolizado em sal de formazan (de coloração azul escuro) pelas células vivas. Após uma incubação overnight em estufa a 37 °C, o SDS fará a dissolução dos cristais de formazan que terão sido formados pelas células vivas a partir do MTT. As placas serão centrifugadas, o meio descartado e as células ressuspensas em 100 L de isopropanol ácido (0,04 N HCl-isopropylalcohol). Após isto, leitura de absorbância será efetuada a 570 nm. O número de células sobreviventes aos tratamentos será calculado em relação ao número de células sobreviventes no meio sem adição de quimioterápico. A leitura será realizada em leitor de placa de ELISA (LabTech LT4000). A medida da proliferação celular será realizada em comparação aos poços onde os veículos serão adicionados no lugar do composto testado. A viabilidade das células tratadas com os compostos será expressa em porcentagem relativa ao controle somente tratado com meio de cultura. A determinação do IC₅₀(concentração que inibe 50% da proliferação das células) será realizada utilizando-se o software GraphPadPrism 6.0(44). Análises in vivo: Células e Tecido Tumoral Amostras das células (20 milhões de células) e tecido tumoral (30 mg) serão

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.203.692

homogeneizadas em metanol e clorofórmio, seguindo o protocolo proposto por Le Belle (47). Brevemente, às amostras serão adicionados metanol (1,66 mL) e clorofórmio (833 L). Após vortexação, as amostras serão centrifugadas a 3.400 g por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, duas fases irão se formar: uma fase superior, contendo os metabólitos polares diluídos em metanol e uma fase inferior, com os metabólitos apolares diluídos no clorofórmio. Ambas as fases serão coletadas e liofilizadas. O liofilizado da fase do metanol será ressuspensionado em 0,6 mL de água deuterada (D₂O) contendo tampão fosfato a 100 mM (estoque a 1 M, contendo com $2,8 \times 10^{-1}$ mol/L de NaH₂PO₄ e $7,2 \times 10^{-1}$ mol/L de Na₂HPO₄) e 0,5 mM de TSP (ácido 3-(trimetilsilil)-2,2',3,3'- tetradeuteropropiônico ou TMSP-d₄, Cambridge Isotope Laboratories, MA), para referência interna. O liofilizado da fase do clorofórmio será ressuspensionado em clorofórmio deuterado (Chloroform-D) e 0,1% de TSP. As amostras de soro serão filtradas em colunas Microcon 3YM (Amicon Ultra 0.5mL, Sigma-Aldrich®), para exclusão de moléculas com massa molecular acima de 3 kDa, como proteínas. Ao soro filtrado (540 L) serão adicionados 60 L de tampão fosfato (a 1 mM) em água deuterada (D₂O), contendo 5 mM TSP sendo essa solução transferida para tubo de RMN (Norell® Standard Series TM 5 mm, Sigma-Aldrich®) para aquisição espectral. Aquisição dos espectros de ¹H-RMNA análise metabolômica será realizada por meio da ressonância magnética nuclear (RMN). Os espectros serão adquiridos em um espectrômetro Agilent Inova (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EUA) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). Critério de Inclusão: Luminal A em mulheres na pós- menopausa: Hormonioterapia por 2 meses Luminal A em mulheres na pré- menopausa: 2 ciclos de quimioterapia com adriamicina + ciclofosfamida Luminal B HER 2 positivo pré ou pós-menopausa e Não luminal HER2 positivo: 2 ciclos de quimioterapia com adriamicina + ciclofosfamida Triplo-negativo: 2 ciclos de quimioterapia com adriamicina + ciclofosfamida Critério de Exclusão: Serão utilizadas somente as amostras de mulheres que optarem no momento da aplicação do Termo de Consentimento Livre Esclarecido do Biobanco por não serem reconsentidas a cada nova pesquisa. Vide TCLE do Biobanco anexo, final da página 2. Metodologia de Análise de Dados: A análise da variância entre os múltiplos grupos será realizada pelo teste two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni e os valores de p inferiores a 0,05 serão considerados significativos. Os testes estatísticos serão realizados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 6.0. Para análise dos dados provenientes da metabolômica, serão realizadas análises multivariadas como a técnica de análise por componentes principais (PCA) e a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) com o auxílio da plataforma on-line MetaboAnalyst utilizando as ferramentas Pathway Analysis e Enrichment Analysis (www.metaboanalyst.ca) (48). Desfecho Primário: Análise do mapa

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.203.692

metabólico e levantar hipóteses de quais as possíveis vias são moduladas pelo efeito da droga, o perfil metabólico em células, no soro e no tumor através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar a reprogramação das vias metabólicas envolvidas na resistência à droga in vitro, em linhagem celulares e in vivo, em soro e tecido de mulheres com diferentes subtipos histológicos de câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante com protocolos incluindo adriamicina e taxol.

Objetivo Secundário:

Determinar o perfil metabólico do plasma e do tumor de pacientes com câncer de mama. Comparar o metaboloma intracelular das linhagens de câncer de mama MCF-7 (RE+ sensíveis) e MCF-7adr (RE+ resistente a adriamicina) e MDA-MB-231 (RE-) durante o tratamento com adriamicina e taxol, que estejam correlacionados com a resistência as drogas, como, por exemplo, as vias da glicólise e da glutatona. Averiguar se subtipos de carcinoma de mama (Luminal A, Luminal B, não luminal HER2 hiperexpresso e triplo-negativo) apresentam perfis metabólicos característicos. Identificar as vias metabólicas impactadas entre linhagens resistentes e sensíveis in vitro com auxílio da plataforma MetaboAnalyst, utilizando as ferramentas Pathway Analysis e Enrichment Analysis. Apontar metabólitos que possam ser utilizados como possíveis candidatos a biomarcadores de resistência à adriamicina e ao taxol.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme orientação do colegiado, o campo foi alterado e agora se encontra da seguinte forma:

Riscos: Não existem riscos previsíveis para esta pesquisa.

Benefícios: Não se Aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa intitulado "Abordagem metabolômica para predição da resposta à quimioterapia neoadjuvante em mulheres com diferentes subtipos de câncer de mama", é um projeto de doutorado da médica Marcella Regina Cardoso, devidamente matriculada no curso de doutorado do programa de pósgraduação em tocoginecologia da FCM UNICAMP. Sua orientadora será a Profa. Dra. Sophie Derchain. A pesquisa será feita com células e tecidos armazenados no Biobanco do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas (CAISM-UNICAMP) (CONEP B-056). O biobanco aplica um TCLE para o armazenamento do material

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.203.692

biológico. Não haverá contato com as pacientes e nenhum procedimento extra em decorrência da pesquisa. Por isso a pesquisadora solicita a dispensa do TCLE.

Serão avaliadas amostras de 80 mulheres em tratamento para o câncer de mama, refratárias ao tratamento com quimioterapia com duas drogas, adriamicina + ciclofosfamida, divididas em quatro grupos de acordo com a classificação genética do tumor: Luminal A pós-menopausa; Luminal A pré-menopausa; Luminal B HER2 positivo; triplo negativo. O objetivo é levantar hipóteses de quais as possíveis vias são moduladas pelo efeito da droga, avaliando o perfil metabólico nas células, no soro e no tumor, através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear. O projeto foi autorizado pelo superintendente do CAISM-UNICAMP, Prof Dr Luis Otavio Zanatta Sarian, que assina a folha de rosto.

O orçamento previsto é de R\$ 60.000,00. Os recursos serão utilizados em despesas com materiais de consumo e reserva técnica de benefícios complementares e custo de infraestrutura direta do Projeto financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) (Processo 2016/07822-4).

O projeto deverá durar 8 semestres, com início previsto para o segundo semestre de 2017.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram analisados os seguintes documentos:

- 1) PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_872430.pdf postado em 03/07/2017
- 2) Documentobiobanco.pdf postado em 03/07/2017
- 3) Cartarespostafinal.pdf postado em 03/07/2017
- 4) ProjetoMarcellaCardosoversaofinal.pdf postado em 03/07/2017
- 5) TCLEbiobancoCEP.pdf postado em 03/07/2017

Vide o campo Conclusões, pendências e lista de inadequações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pesquisador apresenta:

- carta resposta (Cartarespostafinal.pdf de 03/07/2017) onde esclarece as pendências;
- apresenta o TCLE do do biobanco onde se encontra destacado o campo onde a participante concorda ou não em ser re consentida caso seu material cedido seja usado para novas pesquisas
- realiza adequação dos riscos e benefícios.

Conclusão.

As pendências foram acatadas e respondidas adequadamente. PROJETO APROVADO.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.203.692

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido e enviar notificação ao CEP junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Relatórios parciais e final, em formulário próprio do CEP, devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_872430.pdf	03/07/2017 16:37:36		Aceito
Outros	Documentobiobanco.pdf	03/07/2017 16:36:26	Marcella Regina Cardoso	Aceito
Outros	Cartarespostafinal.pdf	03/07/2017 16:35:36	Marcella Regina Cardoso	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	ProjetoMarcellaCardosoversaofinal.pdf	03/07/2017 16:34:23	Marcella Regina Cardoso	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.203.692

Investigador	ProjetoMarcellaCardosoversaofinal.pdf	03/07/2017 16:34:23	Marcella Regina Cardoso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEbiobancoCEP.pdf	03/07/2017 16:31:07	Marcella Regina Cardoso	Aceito
Outros	ParecerConsustanciadoMarcella.pdf	06/06/2017 19:39:00	Marcella Regina Cardoso	Aceito
Outros	AtestadoMatricula.pdf	06/06/2017 19:19:40	Marcella Regina Cardoso	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoMarcella.pdf	30/05/2017 22:48:48	Marcella Regina Cardoso	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

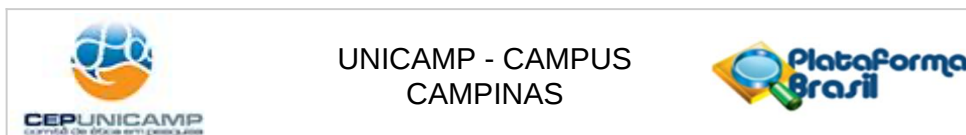
Não

CAMPINAS, 06 de Agosto de 2017

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

8.2. ANEXO II



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Abordagem metabólica para predição da resposta à quimioterapia neoadjuvante em mulheres com diferentes subtipos de câncer de mama

Pesquisador: Marcella Regina Cardoso

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 69699717.0.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.008.079

Apresentação do Projeto:

A pesquisadora responsável apresentou a emenda ao projeto original acrescentando uma nova pesquisadora ao grupo de pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Manteve os mesmos do projeto original.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Manteve os mesmos do projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma emenda ao projeto original, adicionando uma nova pesquisadora ao grupo de pesquisa que é Andreia de Melo Porcari.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os seguintes documentos foram apresentados: a) Folha de rosto devidamente assinada, b) Informações básicas do projeto, c) Projeto de pesquisa, d) Regulamento do biobanco, e) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, f) Vínculo da pesquisadora com a universidade.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.008.079

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda APROVADA.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.008.079

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

-Lembramos que segundo a Resolução 466/2012 , item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

-O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1229819_E1.pdf	01/10/2018 11:27:58		Aceito
Outros	Documentobiobanco.pdf	03/07/2017 16:36:26	Marcella Regina Cardoso	Aceito
Outros	Cartarespostafinal.pdf	03/07/2017 16:35:36	Marcella Regina Cardoso	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoMarcellaCardosoversaofinal.pdf	03/07/2017 16:34:23	Marcella Regina Cardoso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEbiobancoCEP.pdf	03/07/2017 16:31:07	Marcella Regina Cardoso	Aceito
Outros	ParecerConsustanciadoMarcella.pdf	06/06/2017 19:39:00	Marcella Regina Cardoso	Aceito
Outros	AtestadoMatricula.pdf	06/06/2017 19:19:40	Marcella Regina Cardoso	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoMarcella.pdf	30/05/2017 22:48:48	Marcella Regina Cardoso	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.008.079

CAMPINAS, 08 de Novembro de 2018

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

8.3. ANEXO III



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização genômica e metabolômica comparativa em pacientes com câncer e voluntários saudáveis

Pesquisador: Andréia de Melo Porcari

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 25222619.4.0000.5514

Instituição Proponente: Universidade São Francisco-SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.769.923

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional (sem intervenção), analítico, com coleta prospectiva. Serão usadas as amostras de sangue de voluntários adultos saudáveis de ambos os sexos, de 18 a 70 anos (n=400), clinicamente saudáveis, recrutados para os estudos de bioequivalência realizados na UNIFAG.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o perfil genômico e metabolômico em amostras de sangue periférico de voluntários adultos saudáveis (grupo controle) como comparativo para a validação de dados obtidos em projetos previamente aprovados pelo CEP que versam sobre caracterização genômica e metabolômica de processos relacionados às neoplasias de mama, glioblastoma e colorretal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não existem riscos e benefícios descritos pela pesquisadora.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão incluídos somente voluntários saudáveis já recrutados pela Unifag para estudo de bioequivalência. Não será necessário realizar novas coletas, uma vez que o volume de sangue residual, não utilizado nas análises de rotina para triagem já atende as necessidades. Não será realizada nenhuma mudança no protocolo da Unidade quanto à coleta e volume de amostra a ser

Endereço: Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 12.916-900

UF: SP

Município: BRAGANCA PAULISTA

Telefone: (11)2454-8302

E-mail: comiteetica@usf.edu.br



UNIVERSIDADE SÃO
FRANCISCO-SP



Continuação do Parecer: 3.769.923

coletada. O sangue utilizado pelo estudo seria descartado pela Unifag após as análises de rotina.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termo de consentimento livre e esclarecido está devidamente escrito e claro para o entendimento do voluntário.

Os termos de anuência das pesquisadoras colaboradoras foram incluídos nesta versão do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não aplicável

Considerações Finais a critério do CEP:

APÓS DISCUSSÃO EM REUNIÃO DO DIA 12/12/2019, O COLEGIADO DELIBEROU PELA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISAS. APÓS A CONCLUSÃO DO PROJETO É OBRIGATÓRIO O ENVIO DO RELATÓRIO FINAL PARA ENCERRAMENTO DO PROJETO.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1467098.pdf	28/11/2019 11:06:26		Aceito
Outros	Versaoll_CartaResposta.pdf	28/11/2019 11:06:00	Andréia de Melo Porcari	Aceito
Outros	Versaoll_Termo_Compromisso_Manoel a.pdf	28/11/2019 11:01:39	Andréia de Melo Porcari	Aceito
Outros	Versaoll_TERMO_Compromisso_Patricia a.pdf	28/11/2019 11:01:21	Andréia de Melo Porcari	Aceito
Outros	TermoDeConfidencialidade.pdf	07/11/2019 14:12:38	Andréia de Melo Porcari	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoDeCompromisso.pdf	07/11/2019 14:12:10	Andréia de Melo Porcari	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	07/11/2019 14:11:11	Andréia de Melo Porcari	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	07/11/2019 14:07:12	Andréia de Melo Porcari	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCompleto.pdf	07/11/2019 14:06:48	Andréia de Melo Porcari	Aceito
Outros	CartaAnuenciaUNIFAG.pdf	07/11/2019 13:58:45	Andréia de Melo Porcari	Aceito

Endereço: Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 12.916-900

UF: SP

Município: BRAGANCA PAULISTA

Telefone: (11)2454-8302

E-mail: comiteetica@usf.edu.br



UNIVERSIDADE SÃO
FRANCISCO-SP



Continuação do Parecer: 3.769.923

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRAGANCA PAULISTA, 13 de Dezembro de 2019

Assinado por:
CARLOS EDUARDO PULZ ARAUJO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 12.916-900

UF: SP

Município: BRAGANCA PAULISTA

Telefone: (11)2454-8302

E-mail: comiteetica@usf.edu.br

8.4. ANEXO IV

MDPI Open Access Information and Policy

All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. This means:

- everyone has free and unlimited access to the full-text of *all* articles published in MDPI journals;
- everyone is free to re-use the published material if proper accreditation/citation of the original publication is given;
- open access publication is supported by the authors' institutes or research funding agencies by payment of a comparatively low [Article Processing Charge \(APC\)](#) for accepted articles.

Permissions

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. Reuse of an article does not imply endorsement by the authors or MDPI.