

**ANÁLISES *IN SITU* DOS PERFIS LIPÍDICOS DE
AMOSTRAS DE CARCINOMA DE MAMA POR
ESPECTROMETRIA DE MASSAS UTILIZANDO
*DESORPTION ELECTROSPRAY IONIZATION MASS
SPECTROMETRY IMAGING* (DESI-MSI)**

ADRIANA LEANDRA SANTORO

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Victor Piana de Andrade

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Santoro, Adriana Leandra

Análises in situ dos perfis lipídicos de amostras de carcinoma de mama por espectrometria de massas utilizando *desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging* (DESI-MSI) /

Adriana Leandra Santoro – São Paulo, 2017.

99p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Victor Piana de Andrade

Descritores: 1. Neoplasias da mama/Breast Neoplasms. 2. Carcinoma/Carcinoma. 3. Imageamento Molecular por Espectrometria de Massas/Mass Spectrometry Imaging.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho.

Ao meu orientador, Dr. Victor Piana de Andrade, pela oportunidade e pela confiança depositada, e por tudo que me ensinou não só na parte científica, mas também como pessoa. Foi um imenso prazer poder trabalhar com alguém como o sr.

Ao Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin pela colaboração e por ter nos recebido em seu laboratório de braços abertos.

Aos colegas e parceiros do Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, da UNICAMP, principalmente à Daniele Fernanda de Oliveira Rocha, que nos estendeu a mão quando estávamos literalmente perdidos. Ao Nicolas Vilczaki Schwab, Celio Fernando Figueiredo Angolini e ao Pedro Henrique Vendramini, pelas muitas horas dedicadas às nossas análises e por tudo que me ensinaram.

Ao Biobanco, ao centro Internacional de pesquisa (CIPE), à biblioteca, à pós-graduação e aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center, em especial ao Severino Ferreira pelo perfeito trabalho que efetua no preparo das lâminas, ao Israel Tojal da Silva e ao Rodrigo Drummond que nos ajudaram muito no tratamento dos dados.

Ao meu chefe, Daniel Perrone, que permitiu que eu realizasse o doutorado sem me desvincular da empresa. Aos meus colegas de trabalho, em especial à minha amiga Syrlei Lima, pelo apoio e compreensão nos momentos em que precisei me ausentar para estudar.

A toda minha família, em especial minha mamis que ouvia todas as minhas conclusões por telefone com muito interesse e vibrava cada vez que eu concluía alguma etapa, como se fosse ela mesmo que tivesse se dedicado horas a fio em frente ao computador, ao meu papis que ficava torcendo para eu acabar logo e poder ir visitá-los e a todos os meus amigos.

RESUMO

Santoro AL. **Análises *in situ* dos perfis lipídicos de amostras de carcinoma de mama por espectrometria de massas utilizando *desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging* (DESI-MSI).** São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O câncer de mama é um grupo heterogêneo de tumores que variam em relação ao prognóstico e as resposta às terapias. Atualmente, apesar do avanço tecnológico em diagnósticos nos estágios iniciais da doença, a existência de casos com comportamento biológico desfavorável sugere a necessidade de novos fatores e combinações de biomarcadores para quantificar o risco individual e adicionar novas estratégias de tratamento. Esforços significativos vêm sendo feitos para decifrar a etiologia do câncer de mama no nível genômico, porém a nível proteômico e lipidômico estes estudos ainda são limitados. Neste trabalho utilizamos espectrometria de massas (MS) para gerar imagens moleculares 2D dos lipídios presentes em diferentes subtipos de câncer de mama em comparação com amostras normais pareadas. Os dados obtidos pelas análises de MS, nas quais utilizamos ionização ambiente por dessorção via *electrospray* (DESI) diretamente nas amostras de tecidos, foram correlacionados com os dados histológicos. Os espectros de massas de cada tecido foram convertidos em imagens moleculares 2D nas quais foi possível observar cerca de 140 íons diferencialmente presentes em regiões de interesse dos tecidos. Amostras de tumores dos subtipos Luminais A e B apresentaram maior concentração e complexidade lipídica do que as amostras dos subtipos HER 2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) e triplo negativo. As buscas nos bancos de dados (www.lipidmaps.org e www.metabolomicsworkbench.org), considerando um erro de massas de 5ppm, classificaram 80 íons sendo que destes 5 são provenientes de moléculas de xenobióticos (substância química que é absorvida pelo organismo por meio de alimentação ou exposição ao meio), 10 são provenientes de metabólitos e os demais são provenientes de lipídios. Os xenobióticos apresentam maior concentração nas regiões de tecidos normais, e moléculas de metabólitos na forma reduzida encontram-

se mais concentradas nas regiões tumorais. As principais categorias lipídicas presentes nos tecidos tumorais são os glicerofosfolídeos e os ácidos graxos insaturados, incluindo os eicosanóides. Adicionalmente análises estatísticas, utilizando o método Lasso, diferenciaram regiões de tumor do tecido normal por meio da concentração de 18 íons sendo que 3 são provenientes de xenobióticos (mais concentrados em regiões de tecido normal, resultado que coincide com os dados das imagens moleculares 2D), 4 de metabólitos (mais concentrados no tumor, todos na forma reduzida) e 11 de lipídios. As concentrações de quatro íons (1 xenobiótico, 1 esteróide e 2 glicerofosfolídeos) foram capazes de diferenciar carcinoma invasor de carcinoma ductal *in situ*, sendo que todos apresentaram maior concentração em regiões de CDIS. Um dos glicerofosfolídeos selecionados pelo modelo pertence a classe das glicerofosfoserinas (íon de m/z 812.5440) categoria que está diretamente envolvida em processos celulares apoptóticos. Até onde sabemos este é o primeiro estudo que apresenta a distribuição topográfica de lipídios e metabólitos para regiões de tecidos normais, tecidos contendo CDIS e tumores invasivos de diferentes subtipos moleculares de câncer de mama e permite observar que em nível lipidômico o câncer de mama também é um grupo heterogêneo de tumores com perfis característicos em diferentes subtipos moleculares. Adicionalmente os resultados indicam que lipídios com menor grau de insaturação são mais concentrados em regiões tumorais, se essa hipótese for confirmada pode representar mecanismos importantes na tumorigênese uma vez que as diferenças foram encontradas tanto em lipídios constituintes das membranas biológicas como em lipídios que apresentam papéis de mensageiros secundários em vias de sinalização. Descrever a heterogeneidade lipídica e metabólica em diferentes subtipos de tumores de mama pode ajudar na compreensão do desenvolvimento e progresso da doença com potencial de novas vias a serem utilizadas a fim de beneficiar os pacientes.

SUMMARY

Santoro AL. **[In situ analysis of the lipid profiles from breast carcinoma samples by mass spectrometry using desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging (DESI-MSI)]**. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Breast cancer is a heterogeneous group of tumors with variable response to therapies and prognosis. Despite technological advances in diagnostics at early stages, the existence of cases with unfavorable biological behavior suggests the need for new factors and combinations of biomarkers to quantify the individual risk to add new treatment strategies. Significant efforts have been made to decipher the etiology of breast cancer at the genomic level, but little is known at the proteomic and lipidomic levels. We aimed to use mass spectrometry (MS) to generate 2D molecular maps of the lipids and metabolites in different subtypes of breast cancer. The data was obtained by MS analysis, performed using electrospray desorption ionization (DESI) applied directly to normal and tumor samples. After correlating the molecular maps to histological data in all breast molecular subtypes we observe about 140 ions with different concentrations between normal and tumor tissues, yet, Luminal A and B tumor samples had much higher lipid concentration and complexity than HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) and triple negative samples. Databases (www.lipidmaps.org and www.metabolomicsworkbench.org) classified 80 ions, considering a mass error of 5ppm, where 5 were from xenobiotics, 10 from metabolites and the others were from lipids. Xenobiotics are more concentrated in regions of normal tissues and the reduced molecules of metabolites seems to be more concentrated in tumor regions. Main lipid categories present in tumor tissues are glycerophospholipids and unsaturated fatty acids, including eicosanoids. Statistical analysis performed by the Lasso method additionally discriminated normal tissue from tumor by the concentration of 18 ions with 3 derived from

xenobiotics (more concentrated in regions of normal tissue, result that agrees with data of 2D molecular images), 4 from metabolites (most concentrated in the tumor, all in reduced form) and 11 from lipids. Four ions were able to discriminate visually and statistically invasive carcinoma from paired in situ ductal carcinoma, represented by 1 xenobiotic, 1 steroid and 2 glycerophospholipids, including a glycerophosphoserine molecule (ion of m/z 812.5440). Glycerophosphoserine molecules are directly involved in apoptotic cellular processes and were less concentrated in invasive tumors. To our knowledge, this is the first study to present the lipid and metabolite topographical distribution of normal, ductal carcinoma in situ and invasive tumors of distinct molecular subtypes of breast cancer. Breast cancer is also heterogeneous at lipidomic level, with intrinsic profiles in different molecular subtypes of breast cancer. We also observed a characteristic profile that suggests lower insaturations levels in tumoral tissues overall. This information, if confirmed by tandem mass spectrometer analysis, could represent an important mechanism in tumorigenesis as differences are found lipid from membranes and second messengers of signaling pathways. Describing the lipidic and metabolic heterogeneity in the different subtypes of breast cancer, may help better understand breast cancer development and progress with potential of new avenues to pursue in order to benefit patients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo clássico de progressão do carcinoma ductal de mama.....	4
Figura 2	Imagens representativas das possíveis variantes arquiteturais presentes no CDIS.....	5
Figura 3	Ilustrações de diferentes graus de CDIS.....	5
Figura 4	Representação da expressão imunoistoquímica da proteína HER2 e da proteína receptor de estrógeno.....	6
Figura 5	Alterações essenciais na fisiologia de uma célula normal na progressão para tumores malignos e potenciais metástases.....	9
Figura 6	Reprogramação metabólica em células tumorais.....	9
Figura 7	Representação das principais categorias lipídicas e de algumas de suas funções nas células.....	16
Figura 8	Representação da resolução espacial e faixas de massas características dos diferentes métodos de ionização, MALDI.....	21
Figura 9	Processo de ionização que ocorre na ionização por electrospray (ESI-electrospray) - produção da gota na interface do electrospray.....	23
Figura 10	Representação esquemática do funcionamento de DESI (<i>Desorption electrospray ionization</i>).....	25

Figura 11	Fluxograma representando as etapas efetuadas no trabalho.....	29
Figura 12	Seleção das regiões tumorais na A2, usando H&E sobreposto às imagens moleculares 2D obtidas com os dados de DESI MSI.....	33
Figura 13	Imagens de H&E das amostras de tumores separadas por subtipos.....	36
Figura 14	Espectro de massas médio obtido por DESI MSI no modo negativo para a amostra A2.....	39
Figura 15	Espectros de massas obtidos no modo negativo por análises de DESI MSI na faixa de m/z 100–200 para uma amostra de tecido de mama (Amostra A2).....	41
Figura 16	Espectros de massas obtidos por DESI MSI de 4 amostras de câncer de mama de diferentes subtipos, e suas respectivas imagens moleculares 2 D para o íon (M-H-) da glutathione (m/z 306.0775).....	42
Figura 17	Distribuição das diferentes categorias lipídicas nas amostras analisadas por DESI MSI e H&E e faixas de massas características.....	49
Figura 18	Espectro de massas, obtido por DESI MSI no modo negativo para a amostra A2 na região de m/z entre 186 e 190 e simulação da distribuição isotópica para a molécula de niqueloceno deprotonada.....	51
Figura 19	Espectro de massas obtidos nas análises de DESI MSI, modo negativo.....	54

Figura 20	Possíveis estruturas para os íons de m/z 758.4967 PS(34:2) e 760.5132 PS(34:1).....	54
Figura 21	Imagens moleculares 2D representando uma possível redução no grau de insaturação em ácidos graxos e eicosanoides para os diferentes subtipos tumorais estudados.....	55
Figura 22	Imagens moleculares 2D representando uma possível redução no grau de insaturação em glicerofosfolipídeos (PC- <i>Phosphatidylcholine</i> , e PE- <i>phosphatidylethanolamine</i>) para os diferentes subtipos tumorais estudados.....	56
Figura 23	Imagens moleculares 2D representando uma possível redução no grau de insaturação em glicerofosfolipídeos.....	57
Figura 24	Espectros de massas obtidos por DESI MSI, modo negativo, de um pixel da região tumoral da amostra A2 e de um pixel da região de tecido normal da amostra A2, respectivamente.....	60
Figura 25	Espectros de massas obtidos por DESI MSI, modo negativo, de um pixel da região tumoral da amostra A2 e imagens moleculares 2D correspondentes para os íons de m/z	61
Figura 26	Análise de PCA de dados de DESI-MSI para os 42 casos analisados.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínicas e biológicas de cada subtipo molecular de câncer de mama.....	3
Tabela 2	Características das amostras analisadas.....	34
Tabela 3	Resultado das buscas nas bases de dados de metabólitos encontrados nas análises de imagens moleculares.....	44
Tabela 4	Valores de m/z que apresentaram imagens moleculares 2D para as amostras analisadas mas não foram encontrados em bancos de dados.....	48
Tabela 5	Valores de m/z de moléculas que apresentaram diferentes graus de insaturação e presença (X) nas imagens moleculares dos subtipos tumorais analisados.....	53
Tabela 6	Íons selecionados pelo método Lasso e seus respectivos pesos estatísticos em cada subtipo tumoral para as comparações: (a) Tumor vs Normal; (b) Carcinoma Mamário Invasivo (CMI) vs Carcinoma Ductal in situ (CDIS).....	64
Tabela 7	Íons selecionados pelo método Lasso e seus respectivos pesos estatísticos em cada subtipo tumoral, considerando todos os subtipos: Carcinoma Ductal <i>in situ</i> (CDIS), HER2, Luminal A, Luminal B e Triplo Negativo (TN).....	64
Tabela 8	Íons selecionados pelo método Lasso e seus respectivos pesos estatísticos considerando a comparação entre os tumores do tipo Triplo Negativo (TN) com os demais tipos de tumores invasivos.....	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CDIS	Carcinoma Ductal <i>In Situ</i>
CER	Ceramida
CMI	Carcinoma Mamário Invasivo
DESI MSI	<i>Desorption electrospray ionization</i>
DHA	Ácido Docosaheptaenoico
ESI	<i>Electrospray</i>
FA	<i>Fatty Acid</i>
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
GL	<i>Glycerolipid</i>
GP	<i>Glycerophosphate</i>
GPAM	Glicerol-3-Fosfato Aciltransferase
H&E	<i>Haematoxylin and Eosin</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IIQ	Imuno-histoquímica
LA	Luminal A
LASSO	<i>Multiclass-Logistic Regression with L1 Penalty</i>
LB	Luminal B
m/z	Razão massa/carga
MB	Membrana Basal
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MSI	<i>Mass Spectrometry Imaging</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PC	<i>Phosphocholine</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PE	<i>Phosphoethanolamines</i>
PG	<i>Phosphoglycerols</i>
PI	<i>Phosphoinositol</i>
PS	<i>Phosphoserine</i>
RE	Receptor de Estrogeno
ROIs	Regiões de Interesse

ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RP	Receptor de Progesterona
SOD	Superóxido Dismutase
SP	<i>Sphingolipids</i>
ST	<i>Sterol lipids</i>
TG	<i>Triacylglycerols</i>
TN	Triplo Negativo
TOF	<i>Time of Flight</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	
1.1	Câncer de Mama	1
1.2	Progressão do carcinoma ductal da mama	3
1.3	Reprogramação metabólica de células tumorais	8
1.4	Lipidômica Aplicada ao Câncer	10
1.5	Imageamento Químico – DESI-MSI	20
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo Geral.....	27
2.2	Objetivos Específicos	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Materiais	29
3.2	Preparo das Amostras	30
3.3	Análises DESI-MSI	31
3.3.1	DESI-MSI e Processamento da Imagem.....	31
3.3.2	Análises Estatísticas.....	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Análises de DESI MSI	38
4.2	Análises Estatísticas.....	61
4.2.1	Modelo Lasso: Tumor vs Normal.....	65
4.2.2	Modelo Lasso: CMI vs CDIS.....	67
4.2.3	Modelo Lasso: todos os subtipos	68
4.2.4	TN vs demais CMIs	69
4.3	Vantagens e limitações da técnica de DESI MSI nas análises de tumores de mama de diferentes subtipos moleculares	70
5	CONCLUSÃO	72

6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
----------	---	-----------

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Material Suplementar

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma doença com enorme diversidade na apresentação clínica (idade, estágio da doença ao diagnóstico), na morfologia do tumor ao microscópio, agressividade biológica do tumor e na resposta aos tratamentos. Alguns fatores são determinantes para a sobrevida em câncer de mama, tais como idade ao diagnóstico, grau histológico e grau nuclear (SOERJOMATARAM et al. 2008), tamanho do tumor (WARWICK et al. 2004), tipo histológico (FISHER et al. 2001; GREENE 2002), atividade mitótica, envolvimento linfonodal axilar, expressão de receptores hormonais e expressão de HER-2. O câncer de mama pode ser esporádico (90% dos casos), ou hereditário (10%) (TIEZZI 2009, VOGEL 2008).

A incidência da doença cresce dramaticamente com a idade (SIEGEL et al. 2013) e está associada à obesidade, dieta hipercalórica, nuliparidade ou gestação tardia. O Câncer de mama é o mais comum nas mulheres com incidência global de 44 em cada 100.000 mulheres diagnosticadas anualmente, totalizando 1.6 milhões de casos no mundo (Globocan 2012). No Brasil são diagnosticados cerca de 58.000 casos da doença por ano (Ministério da Saúde 2016).

A maior eficiência nos programas de rastreamento, na melhor definição das imagens ao diagnóstico e o uso adequado de terapias medicamentosas adjuvantes melhoraram a sobrevida das pacientes nas últimas décadas, porém o aumento da incidência dos tumores de mama ainda é uma realidade (SMIGAL et al. 2006). Uma das explicações para esse cenário é a falta da compreensão completa da heterogeneidade dos cânceres de mama com respeito à sensibilidade ao tratamento, composição celular e às alterações moleculares (PRAT e PEROU 2011).

Em 2000 um avanço na compreensão das características moleculares do câncer de mama foi obtido por PEROU et al. Nesse trabalho uma classificação molecular para tumores mamários invasivos foi proposta baseando-se em resultados obtidos por análises de cluster hierárquicas aplicadas em dados de perfil de expressão genica, sendo que os tumores foram classificados em pelo menos 4 subtipos moleculares (Luminal A, Luminal B, HER2 e Tipo Basal) com características clínicas e biológicas distintas (PEROU et al. 2000), tabela 1.

A classificação dos tumores de mama em diferentes subtipos moleculares proporcionou uma maior especificidade nas terapias utilizadas para o tratamento da doença, porém ainda existem muitos casos de câncer de mama com evolução desfavorável com as opções atuais de tratamento. A inclusão de novos fatores preditivos certamente proporcionará avanços que conduzirão a uma seleção ainda melhor dos pacientes para terapias adjuvantes e até mesmo à individualização da conduta terapêutica (BUIRAGO et al. 2011).

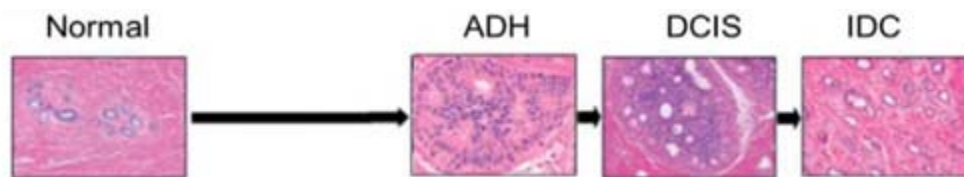
Tabela 1. Características clínicas e biológicas de cada subtipo molecular de câncer de mama.

	Luminal A	Luminal B	Her2	Triplo Negativo
% Câncer mama	55%	15%	12-18%	10-15%
Idade	Idosas	Jovens	Jovens	Jovens
SBR	I ou II	II ou III	II ou III	III
Receptor de Estrógeno	Positivo Forte	Positivo Fraco	Negativo	Negativo
Receptor de Progesterona	Positivo Forte	Positivo Fraco/ Negativo	Negativo	Negativo
HER2	-	40% +	+	-
Ki67	<10%	>15%	>20%	>50%
Historia Natural	Indolente	Intermediário	Agressivo	Agressivo
Tamoxifeno	Responde	Alguma Resposta	Não Responde	Não Responde
Quimioterapia	Não Responde	Resposta CMF	Resposta Doxorubicina	Resposta Antracíclicos

SBR – Graduação histológica baseada no método Scarff-Bloom e Richardson-SBR

1.2 PROGRESSÃO DO CARCINOMA DUCTAL DA MAMA

O modelo clássico de progressão do carcinoma ductal da mama sugere uma progressão contínua, mas não obrigatória, através de uma série de etapas. O processo inicia-se em um tecido normal, progredindo para hiperplasia ductal atípica, avançando para o carcinoma ductal *in situ* e culminando em carcinoma mamário invasivo, que pode resultar em doença metastática (Figura 1) (WELLINGS e JENSEN 1973; BOMBONATI e SGROI 2011).



Fonte: Adaptado de BOMBONATI e SGROI (2011).

Figura 1 - Modelo clássico de progressão do carcinoma ductal de mama.

Abreviações: ADH, *Atypical ductal hyperplasia*; DCIS, *Ductal carcinoma in situ*; IDC, *Invasive ductal carcinoma*.

O câncer de mama invasivo e suas variantes histológicas são bem estabelecidos. A dificuldade maior é a classificação de lesões pré-invasivas, carcinoma ductal *in situ* (CDIS), as quais estão sendo cada vez mais detectadas pela mamografia, com um aumento de detecção desses casos de 5 para 20% com a prática desse diagnóstico (PINDER et al. 2010). O CDIS é uma proliferação clonal de células malignas que crescem no sistema ducto-lobular sem evidências de invasão para o estroma adjacente.

O CDIS é classificado com base no padrão da arquitetura de proliferação incluindo comedo (com necrose central), cribriforme, micropapilar, sólido ou uma mistura dos subtipos (Figura 2) (PINDER et al. 2010) e apresenta-se em diferentes graus. O CDIS de baixo grau é formado por células regulares espaçadas uniformemente, com núcleos monótonos e polarizados, o de alto grau é formado por grande pleomorfismo, muitas vezes com múltiplos núcleos proeminentes, alta taxa de mitose e necrose central e o de grau intermediário ocorre quando a lesão não se enquadra como alto ou baixo grau (PINDER et al. 2010). A Figura 2 apresenta as características morfológicas mais relevantes em cada grau histológico do

CDIS e a Figura 3 e 4 apresentam exemplos de análises de imunohistoquímica para CDIS com diferentes graus.

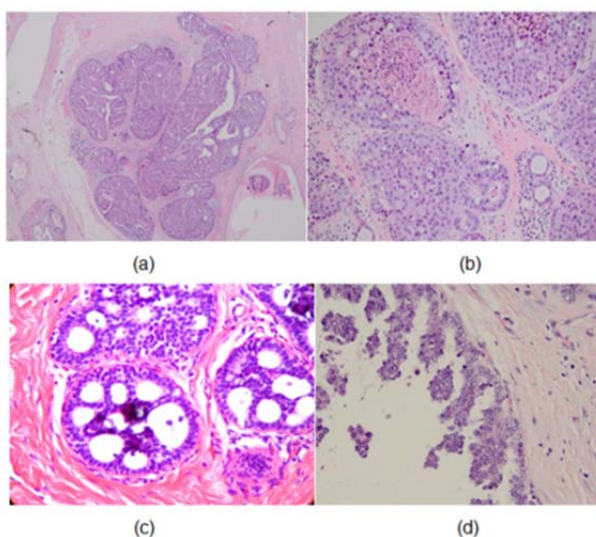
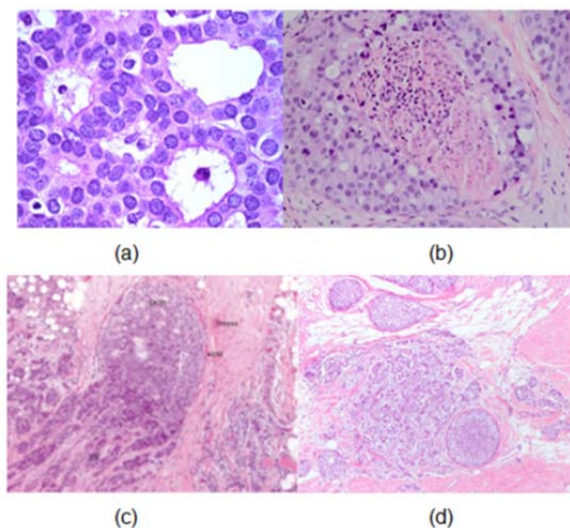


Figura 2 - Imagens representativas das possíveis variantes arquiteturais presentes no CDIS. (a) CDIS papilífero comprometendo um conglomerado de ductos; (b) dilatados CDIS sólido com focos de necrose; (c) CDIS cribriforme; (d) CDIS micropapilar. CDIS: Carcinoma Ductal *in situ*.



Fonte: CARRARO et al. (2014)

Figura 3 - Ilustrações de diferentes graus de CDIS: (a) CDIS com núcleos monótonos e polarizados (baixo grau); (b) CDIS sólido com pleomorfismo nuclear, mitose e necrose central (alto grau); Ilustrações de CDIS com invasão: (c) CDIS com componente

invasor adjacente; (d) CDIS sólido com componente invasor adjacente (Hematoxilina, ampliação $\times 200$). CDIS, Carcinoma Ductal *in situ*.

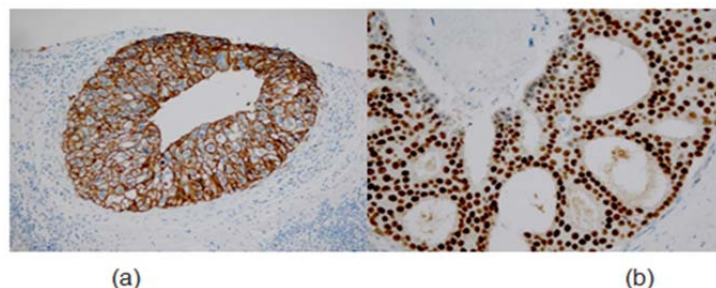


Figura 4 - Representação da expressão imunoistoquímica da proteína HER2 e da proteína receptor de estrógeno: (a) Carcinoma ductal *in situ* de alto grau com expressão imunoistoquímica da proteína HER2. A marcação observada é membranosa, forte e completa (3+). (b) Carcinoma ductal *in situ* cribriforme de baixo grau nuclear com expressão imunoistoquímica da proteína receptor de estrógeno. A marcação é nuclear, forte e difusa.

O potencial maligno do CDIS é variável podendo progredir de CDIS para CMI rápida ou lentamente (PORTER et al. 2003). Algumas evidências moleculares e patológicas sugerem que o CDIS pode ser precursor do CMI: O CMI raramente é visto sem o CDIS adjacente (WONG et al. 2010; CARRARO et al. 2014); as mulheres diagnosticadas com CDIS possuem um risco 10 vezes maior de desenvolver CMI ipsilateral se não tratada (CARRARO et al. 2014); CDIS e CMI, da mesma paciente, compartilham as mesmas características genéticas (BUERGER et al. 1999; CARRARO et al. 2014) e anormalidades moleculares (ZAJCHOWSKI et al. 2001; SCHUETZ et al. 2006; ABBA et al. 2007; CASTRO et al. 2008; WU et al. 2010; VARGAS et al. 2012; CARRARO et al. 2014); modelos animais progridem da doença *in situ* para invasivo (POLYAK 2008); análises de microscópio mostram a ruptura da membrana basal permitindo que o CMI se difunda com

um componente intra-ductal (Figura 3c, CARRARO et al. 2014); e os fatores de risco para ambos, CDIS e CMI, são similares (ALLRED et al. 2010).

A capacidade de identificar quais lesões de CDIS apresentam maior probabilidade de progredir para CMI e predizer em qual intervalo de tempo essa progressão ocorreria contribuiria na seleção do tratamento (CASTRO et al. 2008). Entretanto não é claro quais populações celulares progridem para a doença invasiva e quais propriedades moleculares conferem essa característica (CASTRO et al. 2008). Considerando a prevalência da alta taxa de incidência do câncer de mama, apesar de todo o desenvolvimento já adquirido na compreensão e tratamento da doença, o estudo cada vez mais detalhado das características moleculares vem sendo feito.

A metabolômica, estudo de metabólitos envolvidos em processos químicos, é uma das ferramentas para o estudo de características moleculares que tem sido cada vez mais utilizada para o melhor entendimento da tumorigenesis. Isso porque, para suportar a rápida proliferação celular as células de câncer frequentemente exibem uma reprogramação metabólica que suporta o aumento de produção de intermediários para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Dentro deste contexto que a reprogramação metabólica de células tumorais é considerada como uma das dez características mais importante de todas as células tumorais HANAHAN e WEINBERG , et al 2011), Figura 5.

1.3 REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA DE CÉLULAS TUMORAIS

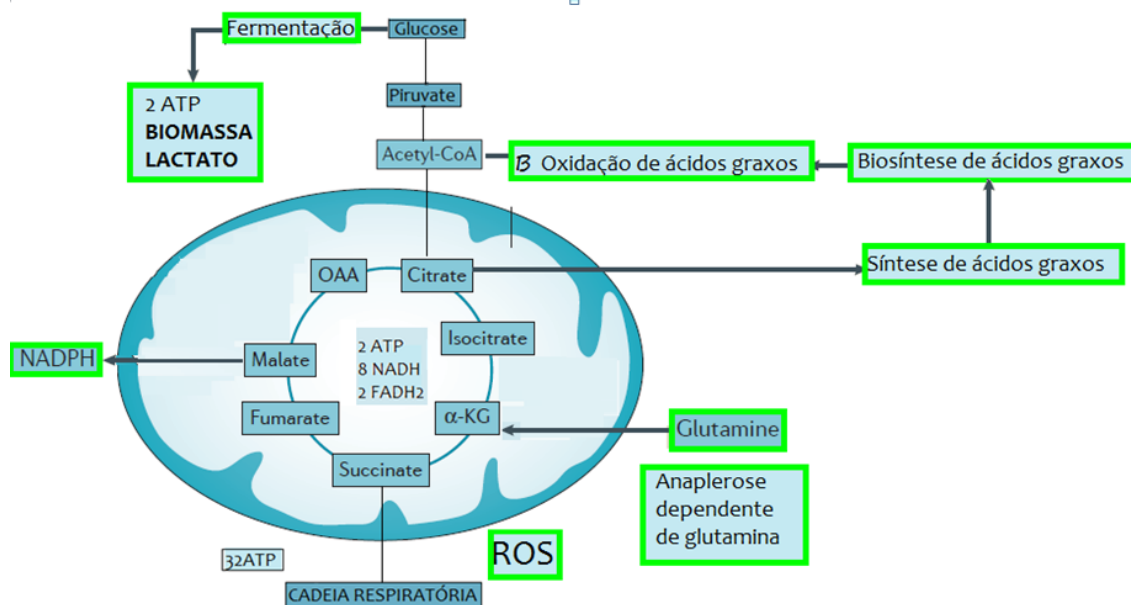
A primeira observação de reprogramação metabólica em células tumorais foi feita há quase um século por Warburg quem observou o aumento da taxa de glicólise seguida pela fermentação do ácido láctico no citosol (ALFAROUK et al. 2014, 2016), ao invés da baixa taxa de glicólise seguida por oxidação do piruvato na mitocôndria como ocorre em células normais (KIM e DANG 2006; ALFAROUK et al. 2011), essa alteração metabólica é conhecida como efeito de Warburg (BAENKE et al. 2013).

Diversos estudos sobre o metabolismo de células tumorais evidenciam que a reprogramação metabólica vai muito além da fermentação aeróbica e inclui: anaplerose dependente de glutamina (ALTMAN et al. 2016), o excesso de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS) e de moléculas antioxidantes (Panieri et al. 2016), assim como o aumento na biossíntese de ácidos graxos (Banerjee et al. 2017), FIGURA 6.



Fonte: Adaptado de HANAHAN et al. (2011).

Figura 5 - Alterações essenciais na fisiologia de uma célula normal na progressão para tumores malignos e potenciais metástases.



Fonte: Adaptado de Altman et al. (2016).

Figura 6 – Reprogramação metabólica em células tumorais.

A biossíntese de ácidos graxos é o ponto de partida para a obtenção de diversas categorias lipídicas que estão diretamente envolvidas em inúmeras atividades celulares. Os lipídios constituem importante classe de biomoléculas já que são os últimos controladores e reguladores dos processos corporais, e são as chaves dos eventos de sinalização celular. O desequilíbrio lipídico é encontrado em muitas doenças, como doenças do coração, artrite, mal de Alzheimer e câncer (MARTINDALE 2003, HILVO et al. 2011) e para assegurar a homeostase lipídica mecanismos celulares robustos têm sido observados em células tumorais (ORESIC et al. 2008).

1.4 LIPIDÔMICA APLICADA AO CÂNCER

A elevada produção de lipídios em tumores foi demonstrada pela primeira vez por MEDES et al. em 1953 onde demonstraram que tecidos tumorais apresentavam níveis de lipídios que são equivalentes aos níveis encontrados no fígado, o qual apresenta elevada taxa de biossíntese. Apesar de MEDES et al. (1953) observarem que os tecidos tumorais também utilizavam os lipídios do ambiente tumoral eles concluíram que *de novo* lipogêneses fornecia a maior parte dos lipídios necessária para a rápida proliferação das células de câncer.

A lipidômica, estudo do perfil estrutural e funcional de lipídios, pode elucidar a composição molecular lipídica das células de câncer e fornecer informações essenciais sobre o mecanismo contido atrás da homeostase lipídica celular (HAN e GROSS 2003; LAGARDE et al. 2003; ORESIC et al. 2008). A composição molecular dos lipídios em tumores permanece pouco

caracterizada, porém nos últimos anos estudos de processos metabólicos envolvidos na biossíntese e na regulação de lipídios tem ganhado atenção neste contexto. Para a compreensão do metabolismo lipídico em câncer é importante medir seus produtos finais, lipídios celulares, a nível molecular como vem sendo feito para câncer de próstata (FAN et al. 2011; BANERJEE et al. 2017), câncer de ovário (CHEN J et al. 2011; GARCIA et al. 2011) e câncer de mama (FRICKENSCHMIDT et al. 2008; CHEN et al. 2009; NAM et al. 2009).

Em resposta à considerável atenção e necessidades dos pesquisadores de lipídios ao redor do mundo em diversas áreas de atuação, um sistema de classificação compreensível para lipídios foi desenvolvido em 2005 pelo *International Lipid Classification and Nomenclature Committee* sob patrocínio do LIPID MAPS. Essa classificação foi baseada em princípios químicos e bioquímicos bem definidos, é compatível com bases de dados atuais, tem sido adotada internacionalmente (FAHY et al. 2009) e foi adotada também nesse trabalho. O LIPID MAPS ([http:// www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org)) apresenta uma base de dados de 10000 lipídios, com nomenclatura, e representação estrutural junto com dados de espectrometria de massas, quando existentes.

De forma geral os lipídios são considerados como qualquer molécula solúvel em solventes orgânicos e insolúvel em água. Geralmente contêm moléculas de ácidos graxos com cadeias de hidrocarbonos compostas de 4 a 36 carbonos, sendo que os ácidos graxos mais comuns possuem número par de carbonos, entre 12 e 24, e podem ser saturados (não apresentarem

duplas ligações) ou insaturados (contêm duplas ligações). Os lipídios são divididos em oito categorias: ácidos graxos (FA, do inglês *fatty acid*), glicerolípídeos (GL), glicerofosfolípídeos (GP, do inglês *glycerophospholipids*), esfingolípídeos (SP, do inglês *sphingolipids*), esteróides (ST), prenóis (PR), sacarolípídeos e policetídeos (FAHY et al. 2009).

Os ácidos graxos é um grupo diverso de moléculas sintetizadas pela elongação de acetil-CoA com malonil-CoA (ou metilmalonil-CoA) onde o ponto final geralmente é a produção do ácido palmítico (Figura 7). O ácido palmítico passa por processos de extensão e desaturação para gerar ácidos graxos, saturados e insaturados, sintetizados por células mamárias. Os ácidos graxos podem conter uma funcionalidade cíclica e/ou serem substituídos com heteroátomos e representam o principal bloco para a construção dos lipídios complexos. Um exemplo de FA polinsaturado são os eicosanóides, os quais apresentam importantes funções como sinalizadores em células e tecidos (WYMAN e SCHNEITER 2008). Nas membranas os ácidos graxos polinsaturados também apresentam importante efeito nas propriedades físicas assim como modulam atividades enzimáticas de transportadores e receptores.

Os glicerolípídeos são compostos principalmente de gliceróis (mono-, di- e tri- substituídos) sendo que os mais conhecidos são os triacilgliceróis (TG), também denominados como triglicerídeos. Os TGs são gerados pela via glicerol fosfato a qual utiliza o intermediário glicolítico glicerol-3-fosfato

para obter a estrutura de glicerol. Os TGs são usados principalmente para armazenamento de energia na forma de gotas lipídicas (Figura 7b).

Os glicerofosfolipídeos, também designados como fosfolipídeos, são encontrados na natureza e são os principais componentes das bicamadas lipídicas das células, assim como estão envolvidos em metabolismo e sinalização. Servem como componentes primários das membranas celulares e como sítios de interação para proteínas intra e intercelular. Alguns glicerofosfolipídeos em células eucarióticas, como fosfatidilinositol e ácido fosfatídico, agem como mensageiros secundários derivados da membrana (VANHAESEBROECK et al. 2001; WYMAN e SCHNEITER 2008).

Os esfingolipídios possuem uma cadeia acil ligada a serina e um grupo polar derivado de etanolamina, serina ou colina. A ceramida (Cer), precursor de esfingolipídeos mais complexos, é a principal subclasse derivada de bases esfingóides e contém uma amida ligada a um ácido graxo (Figura 7a). O principal fosfoesfingolipídeo de mamíferos são as esfingomielinas que são compostas por ceramidas fosfocolinas. Adicionalmente, esfingolipídios como a ceramida ou esfingosina-1-fosfato, possuem importantes funções como sinalizadores em células e tecidos (WYMAN e SCHNEITER 2008; MORAD e CABOT 2013).

Os esteróides (STs do inglês *steroids*) são importantes componentes da membrana biológica e apresentam diferentes funções como moléculas sinalizadoras e hormônios. São compostos de uma estrutura central de dezessete carbonos distribuídos em quatro anéis com configuração molecular específica (três ciclohexano e um anel de ciclopentano). Os

esteróides com dezoito carbonos incluem a família dos estrógenos, com dezenove carbonos compreendem os andrógenos, tais como testosterona e androesterona, e com vinte e um carbonos incluem as progesteronas. Quando apresentam uma hidroxila na posição três do ciclohexano (Figura 7 a) formam os esteróis, incluindo o colesterol.

Prenóis são sintetizados a partir de precursores com cinco carbonos, isopentenil difosfato e dimetilalil difosfato, que são produzidos principalmente pela via do ácido mevalônico. As sucessivas adições de cinco unidades de carbono dão origem aos isoprenóides. Um exemplo de isoprenóides são os carotenóides que funcionam como antioxidante e como precursores de vitamina A (Figura 7 a).

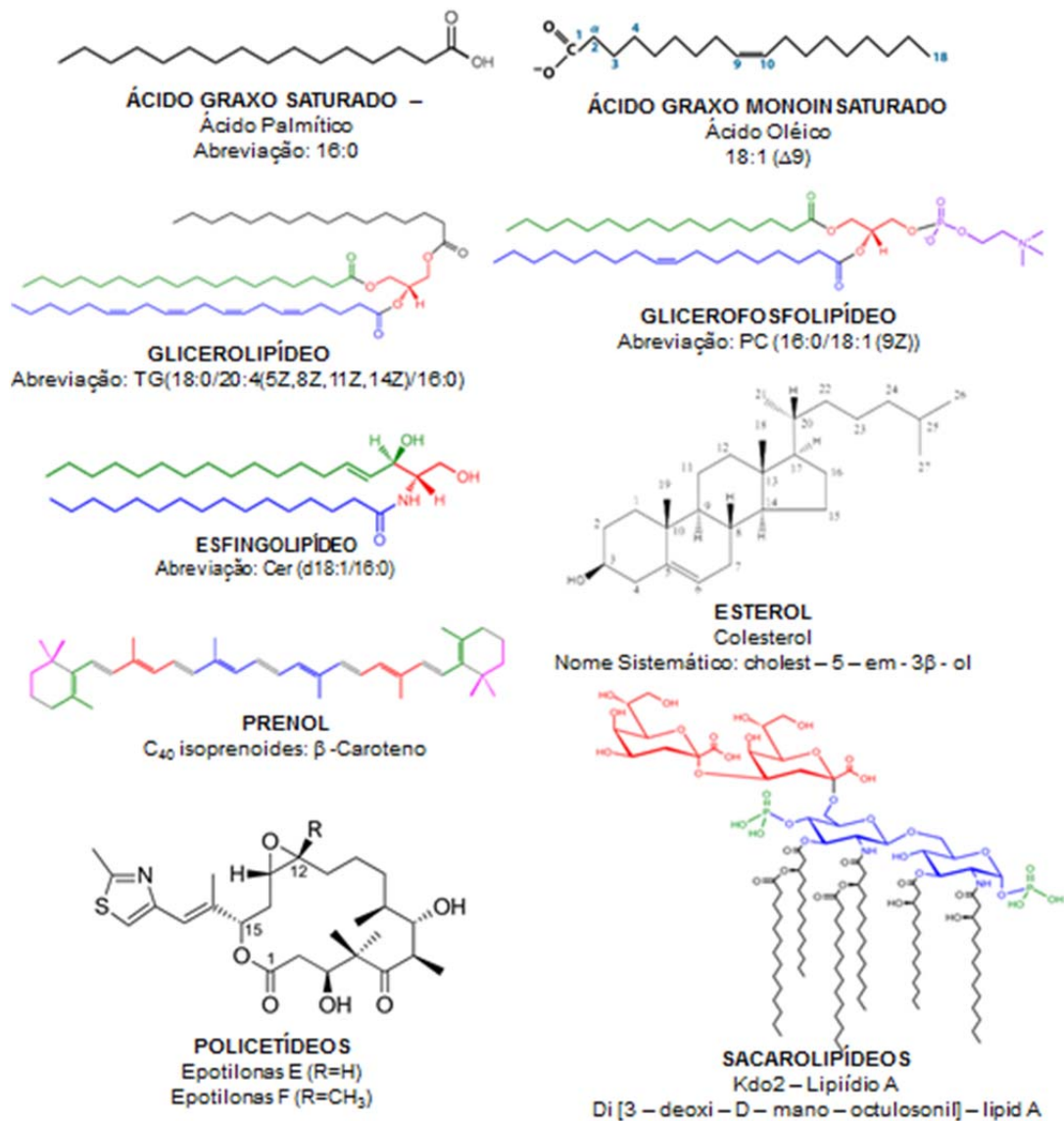
Sacarolipídeos são compostos nos quais os ácidos graxos estão ligados diretamente em açúcares, formando estruturas que são compatíveis com as bicamadas das membranas. Os policetídeos por sua vez são sintetizados por polimerização de subunidades de acetil e propionil, compreendem um grande número de metabólitos secundários e produtos naturais de animais, plantas, bactérias, fungos e fontes marinhas, e apresentam grande diversidade estrutural. Alguns policetídeos são comumente usados como antimicrobiano, antiparasítico e anticâncer (como as epotilonas, Figura 7a).

A nomenclatura abreviada dos lipídios descreve a categoria a qual pertencem, o número de carbonos que possuem assim como a presença e a posição das duplas ligações. Por exemplo, o lipídio 16:0 é um ácido graxo saturado (sem duplas ligações) com 16 carbonos (ácido palmítico); já a

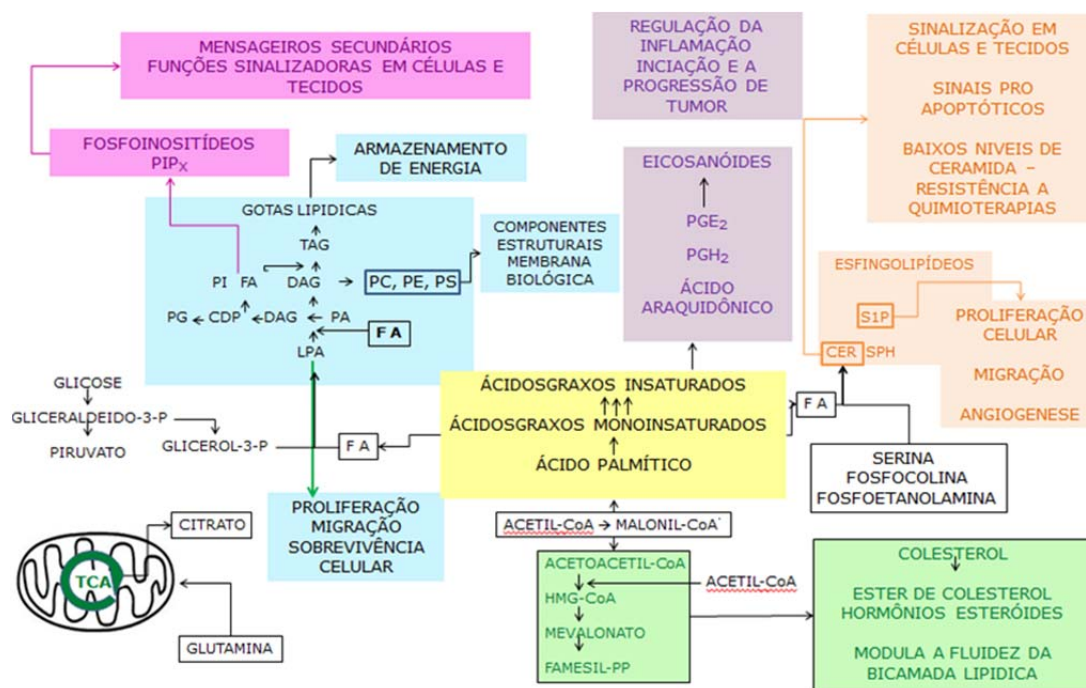
molécula de lipídio 20:2 ($\Delta 9,12$) é um ácido graxo polinsaturado de 20 carbonos com duplas ligações no carbono 9 (C–9) e no C–12 (sendo que o C–1 é definido como o carbono carboxílico terminal, Figura 7a). Nos casos dos glicerofosfolípeos, todas as cadeias de ácidos graxos ligadas ao glicerol são descritas, assim como a cabeça polar.

Nos casos onde a composição total da molécula de lipídio (categoria a qual pertencem, número de carbono e número de duplas ligações) é conhecida, porém a estereoquímica (arranjo espacial dos átomos em uma molécula) é desconhecida, a abreviação da nomenclatura no que diz respeito à posição da dupla ligação, pode ser feita. A molécula TG (52:1) ilustra tal situação, onde TG descreve a categoria lipídica dessa molécula, o número entre parênteses indica o número total de carbonos seguido pelo número de dupla ligação, porém a localização exata dessa dupla ligação é desconhecida.

A Figura 7a apresenta um exemplo de cada categoria descrita acima, assim como a abreviação da nomenclatura correspondente. A Figura 7b apresenta um resumo das rotas envolvidas na síntese de ácidos graxos e algumas funções desempenhadas por cada categoria.



(a)



(b)

Fonte: (a) Adaptado de lipidmap.org (2017); (b) Adaptado de BAENKE et al. (2013).

Figura 7 – Representação das principais categorias lipídicas e de algumas de suas funções nas células: (a) Exemplos de estruturas moleculares das oito categorias lipídicas e abreviações das nomenclaturas correspondentes. (b) Resumo das rotas envolvidas na síntese de ácidos graxos, e algumas funções desempenhadas por cada categoria. Abreviações: CER, *ceramide*; DAG, *diacylglycerol*; FA, *fatty acid*; LPA, *lysophosphatidic acid*; PA, *phosphatidic acid*; PC, *phosphatidylcholine*; PE, *phosphatidylethanolamine*; PG, *phosphatidylglycerol*; PGE₂, *prostaglandin E₂*; PGH₂, *prostaglandin H₂*; PI, *phosphatidylinositol*; PIP_x, *phosphatidylinositol phosphate*; PS, *phosphatidylserine*; S1P, *sphingosine-1-phosphate*; SPH, *sphingosine*; TAG, *triacylglyceride*.

SZACHOWICZ-PETELSKA et al. (2007) comparou tecidos saudáveis com amostras de câncer colorretal e observou que níveis de ácido linoleico e α -linolênico foram menores em membranas celulares tumorais, enquanto que os níveis de ácido oleico e araquidônico foram maiores nessas células. Alterações no metabolismo lipídico também é uma característica do câncer

de mama. Um elevado nível de glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAM), uma enzima da biossíntese de certos lipídios (triacilglicerol e fosfolipídios), correlaciona-se significativamente com uma melhor sobrevida do paciente. Estudos também demonstram que fosfatidilcolina (principal lipídio constituinte da membrana biológica) aumenta em tumores que super expressam GPAM. Além disso, a biossíntese *de novo* de alguns lipídios, como ácidos graxos, apresenta importante função nas células tumorais de mama. HILVO et al. (2001) analisaram 257 tecidos de câncer de mama e 10 amostras de tecido de mama adjacente, e mostrou que fosfatidilcolina, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilinositol, esfingomielinas e ceramidas apresentam níveis elevados em tecidos tumorais. LV e YANG (2012) comparou perfis de ácidos graxos livres do soro de pacientes saudáveis com perfis de pacientes com câncer de mama por CG-MS e observou que pacientes com câncer de mama apresentaram níveis maiores de C16:0, C18:0 e C18:2 e diminuição dos níveis de C18:3, C20:5 e C22:5.

As ferramentas analíticas mais utilizadas em metabolômica são ressonância magnética nuclear (*nuclear magnetic resonance*, NMR), e espectrometria de massas (*mass spectrometry*, MS). NMR analisa a influência magnética nos núcleos dos compostos quando estes são expostos a um campo magnético externo. O preparo da amostra para NMR é fácil, mas a técnica apresenta baixa sensibilidade. Já em MS moléculas da amostra de interesse são ionizadas, separadas e analisadas de acordo com sua razão massa (*m*)/carga (*z*). Métodos comuns de ionização incluem: ionização elétrica, *electron ionization*, EI; ionização química, *chemical*

ionization, CI; ionização por electrospray, *electrospray ionization*, ESI; ionização química a pressão atmosférica, *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI; ionização por dessorção por eletrospray, *Desorption Electrospray Ionization*, DESI). Após a ionização os íons são separados em um analisador (analisadores comuns de MS incluem: quadrupolo; triplo quadrupolo; tempo de voo; *time-of-flight*, TOF; e *ion traps*) e então detectados (CHRISTIANS et al. 2011).

A análise do perfil metabólico pode ser feita em vários tipos de espécies biológicas, incluindo sangue, plasma, urina, tecidos, células, saliva, fluido cerebrospinal e lágrimas. Alguns biofluidos, como sangue e urina, são mais fáceis de adquirir e são os tipos de amostras preferidos para a pesquisa de biomarcadores. Porém, identificar potenciais marcadores em amostras de tecidos pode ser complementar para análises microscópicas de biopsias.

SITTER et al. (2006) correlacionou dados de imagens microscópicas com dados obtidos por RMN de níveis de metabolitos relacionados com a colina, cátion presente em algumas classes de fosfolipídios como fosfatidilcolina e esfingomielina, em 85 tumores de mama e 18 tecidos não tumorais adjacentes, sendo que as amostras tumorais puderam ser distinguidas das amostras de tecidos saudáveis por meio das intensidades relativas de glicerofosfocolina, fosfocolina e colina, com uma sensibilidade de 82% e especificidade de 100%. EBERLIN et al. (2012) construiu um modelo preditivo, com 99% de precisão quando comparado com os resultados das análises histológicas, para determinar a extensão das

ressecções de câncer gastrointestinal utilizando dados de imagens obtidos por imageamento por espectrometria de massas (*mass spectrometry imaging*, MSI). Com base nessas evidências muitas pesquisas vêm sendo focadas em possíveis associações entre alterações nos níveis lipídicos e progressões tumorais.

1.5 IMAGEAMENTO QUÍMICO – DESI-MSI

Imageamento químico por espectrometria de massas (MSI) é uma ferramenta poderosa que mapeia a distribuição espacial de moléculas possibilitando maior entendimento de suas funções e das alterações no meio de interesse. Nessa técnica a captura de imagens por ponto é efetuada, referentes às propriedades químicas e/ou físicas, oferecendo um conhecimento amplo do sistema e de sua interação com o ambiente. Embora a MS geralmente não seja associada à possibilidade de imageamento químico, o desenvolvimento nos últimos trinta anos tem permitido que essa ferramenta seja aplicada e com grande potencial, sendo assim, MSI torna-se cada vez mais promissora no campo de espectrometria de massas por permitir identificar, mapear e visualizar diferentes compostos moleculares na superfície sem a necessidade de rotular as amostras. A quantidade de informação obtida em um experimento de MSI é imensa e vem sendo explorada em diferentes áreas com especial contribuição para a área de diagnósticos (BALLUFF et al. 2011; CASADONTE e CAPRIOLI

2011; EBERLIN et al. 2012; ALEXANDROV et al. 2013; CALLIGARIS et al. 2014).

Várias técnicas de ionização podem ser usadas na modalidade de imageamento, incluindo *Matrix-assisted laser desorption/ionization*-MALDI e *Desorption electrospray ionization*-DESI, sendo que cada uma oferece suas vantagens e desvantagens e a escolha do método dependerá das características desejadas (como condição de operação, diversidade de informação química desejada, resolução espacial e sensibilidade). A técnica de MALDI é operada em vácuo e exige extensivo preparo da amostra antes do passo de ionização, enquanto em DESI a ionização da amostra é feita em pressão atmosférica e o preparo da amostra é bastante simplificado. Além das diferenças operacionais e nos mecanismos de ionização os resultados obtidos por MALDI e DESI apresentam-se em diferentes faixas de massas e com diferentes resoluções (Figura 8).

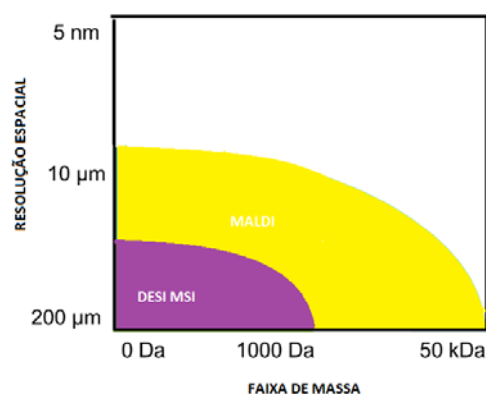
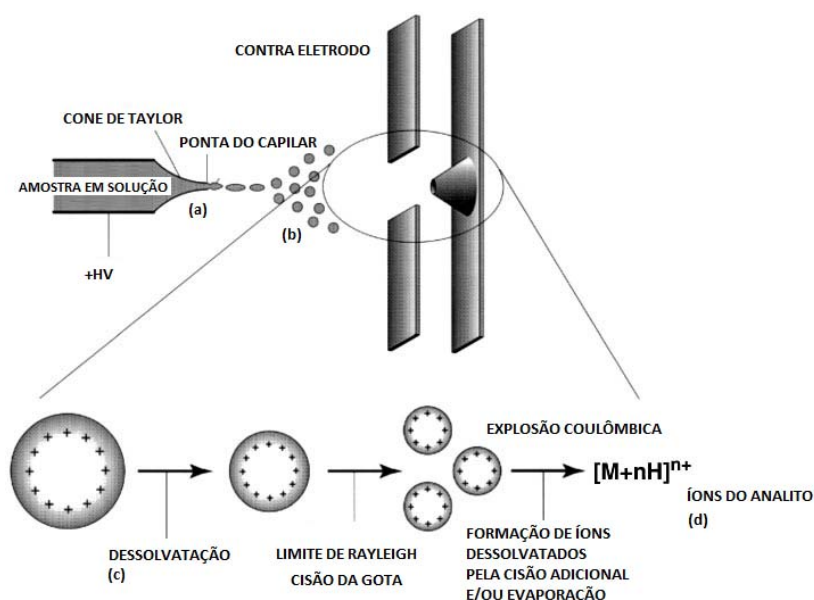


Figura 8 - Representação da resolução espacial e faixas de massas características dos diferentes métodos de ionização, MALDI (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*) e DESI, (*Desorption electrospray ionization*).

O desenvolvimento de métodos aplicados em pressão atmosférica, como o DESI, teve início em 2004 e aumentou a flexibilidade do interfaceamento de uma variedade de técnicas analíticas com MS incluindo análises diretas em tecidos com reduzido preparo de amostra. Os processos de dessorção e ionização da amostra em DESI são feitos usando um feixe primário, na forma de líquido, que impacta a superfície da amostra gerando uma pluma de íons secundários os quais serão ionizados por um processo de ionização semelhante ao que ocorre na ionização por electrospray (ESI). ESI é uma técnica de ionização suave aplicada em pressão atmosférica e que efetivamente transfere analitos da solução para a fase gasosa como íons intactos para a detecção do espectro de massas, permitindo que grandes moléculas sejam ionizadas com pouca ou nenhuma fragmentação. Adicionalmente ESI é capaz de produzir íons multiplamente carregados, reduzindo assim a razão m/z , o que também favorece a análise de compostos de elevada massa molecular.

O processo de ionização que ocorre em ESI pode ser descrito em dois passos: dispersão de gotas altamente carregadas seguida por condições que permitam a evaporação da gota (Figura 9). Para que ocorra a formação de gotas carregadas no solvente primário uma fonte de alta tensão é colocada em contato com a solução contendo os analitos, esta solução é transmitida através do capilar, onde é aplicado um potencial positivo ou negativo forçando um processo de oxirredução e, conseqüentemente, a formação de algumas espécies sem seus contra íons (etapa a), desta forma um spray eletrolítico é formado (etapa b) onde as gotículas carregadas

começam a diminuir de tamanho devido à evaporação do solvente, para auxiliar o processo de evaporação há um fluxo de gás inerte secante normalmente o nitrogênio (etapa c). Assim, a gota formada na ponta do capilar estará carregada e conforme a densidade da carga aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o contra eletrodo aumenta, provocando uma deformação na gota que ganha forma de um cone, o qual é denominado de cone de Taylor. Quando a densidade de carga supera a tensão superficial (limite de Rayleigh) a gota se desprende do capilar subdividindo-se (explosão de Coulomb, etapa d). A frequência deste último processo depende da magnitude do campo elétrico, da tensão superficial do solvente e da condutividade da solução. Os analitos ionizados geram espécies iônicas que podem ser protonadas, desprotonadas, agregados iônicos com o solvente ou adutos com cátions, Na^+ , K^+ e ânions, Cl^- , CF_3^- (GASKELL 1997).



Fonte: Adaptado de GASKELL (1997)

Figura 9 - Processo de ionização que ocorre na ionização por electrospray (ESI - *electrospray*) - produção da gota na interface do electrospray.

Em DESI (Figura 10a) o analito não é dissolvido na solução que passará pelo capilar, a análise começa com a formação de gotas carregadas, de aproximadamente 2-4 μm de diâmetro, do solvente primário as quais são submetidas à elevada pressão e impactam a superfície da amostra que estará sólida. Essa colisão resulta em um fino filme sobre a superfície da amostra no qual o analito é dissolvido por um mecanismo de micro extração sólido líquido (BEREMAN e MUDDIMAN 2007). Colisões subsequentes resultam no desprendimento de gotas secundárias da superfície da amostra, com velocidades e ângulos de desprendimento menores do que as gotas primárias que são emitidas no capilar. Gotas emitidas com ângulos maiores apresentam velocidades menores e maiores diâmetros, enquanto gotas menores e mais velozes são desprendidas em ângulos menores. Os analitos contidos nas gotas secundárias sofrerão o mesmo processo de ionização descrito para a ionização em ESI. Uma varredura é feita em toda a superfície da amostra com o feixe primário e a imagem química é gerada junto com o espectro de massa referente a cada ponto (Figura 10b). Evidências importantes que confirmam a similaridade entre os mecanismos de ionização que ocorrem em ESI e DESI são os espectros de massas e a energia interna dos íons gerados que apresentam o mesmo perfil em ambas as técnicas (NEFLIU et al. 2008). A obtenção de boa sensibilidade e reprodutibilidade nas análises por DESI envolve a otimização de alguns parâmetros que incluem: configuração da fonte (composição e fluxo do spray, fluxo do gás, voltagem); geometria (distâncias do spray a superfície e da superfície a entrada do MS, ângulo de incidência

do spray, ângulo de dessorção do analito (Figura 10a) e movimentação da amostra (velocidade e direção de scaneamento) (GREEN et al. 2009; GURDAK et al. 2014).

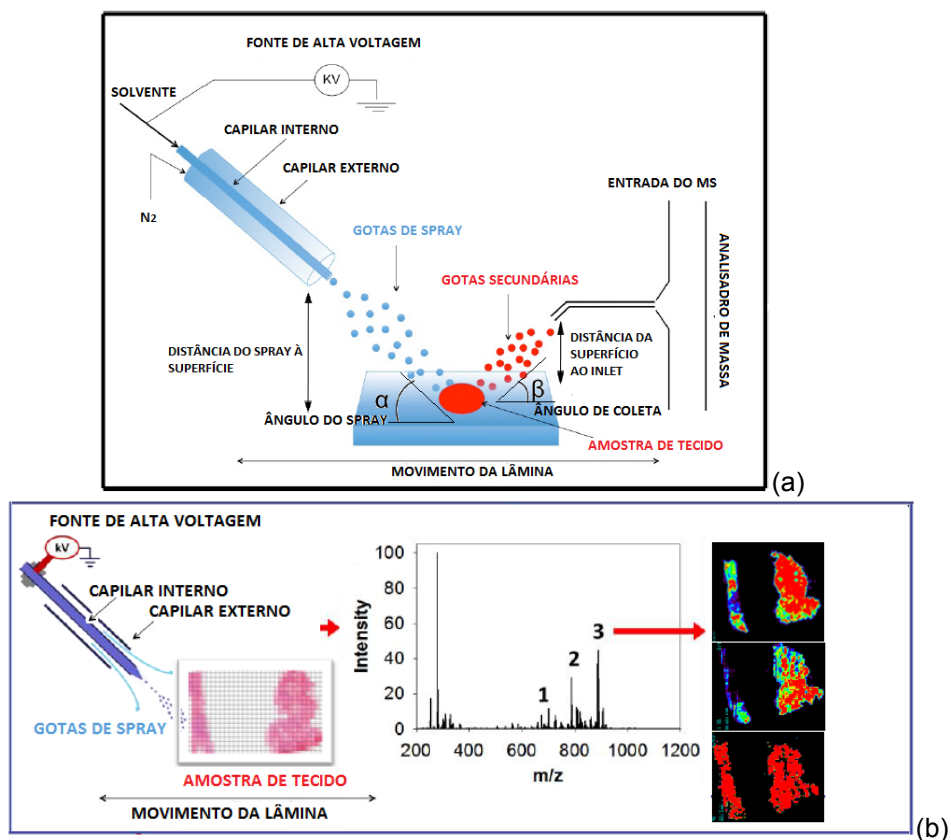


Figura 10 - Representação esquemática do funcionamento de DESI (*Desorption electrospray ionization*): a) Processo de dessorção e ionização; b) Exemplo de análise de DESI (*Desorption electrospray ionization*) em amostra de câncer de mama.

A primeira utilização do DESI MSI para a análise de tecidos data de 2006 quando CHEN et al. analisou a distribuição espacial de dois lipídios em cérebros de ratos correlacionando as posições dos lipídios nas imagens com os tipos de tecidos analisados. A resolução reportada nesse trabalho foi de 500 μm , enquanto que a resolução obtida em análises por MALDI MSI fica em torno de 10 μm . No entanto, as vantagens apresentadas pelo DESI MSI,

de não necessitar de preparo da amostra ou vácuo, despertou enorme interesse na área apesar da baixa resolução obtida inicialmente (CHEN et al. 2006). Em 2012 LASKIN et al. utilizou nano-DESI-MSI e reportou uma resolução de 12 μm , sendo que está foi a melhor resolução reportada até o momento, apresentando-se com a mesma performance do MALDI-MSI.

Nesse projeto foram feitos estudos lipidômicos *in situ* em diferentes subtipos de carcinoma de mama por meio da técnica de espectrometria de massas, utilizando ionização por DESI em amostras de tecidos. Os perfis lipídicos obtidos para os diferentes subtipos tumorais foram comparados e as diferenças recorrentes observadas entre os grupos foram usadas para identificar potenciais candidatos para justificar a progressão do câncer de mama. Como reportado anteriormente, desde a classificação molecular dos tumores mamários invasivos em cinco subtipos (Luminal A, Luminal B, HER2, Triplo Negativo) estes subtipos tumorais têm sido intensamente estudados, porém do ponto de vista lipídico os estudos ainda são bem superficiais e devem ser aprofundados rapidamente acompanhando os desenvolvimentos tecnológicos disponíveis para as análises.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar topograficamente os perfis lipídicos do CDIS e carcinomas mamários invasivos de diferentes subtipos moleculares, pareados com suas respectivas amostras de lóbulos normais adjacentes, utilizando DESI-MSI

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Identificar diferenças lipídicas entre o lobulo normal e carcinoma mamário invasivo em geral;
- 2 Identificar diferenças nos perfis lipídicos entre ductos contendo carcinoma ductal in situ e áreas de carcinoma invasivo;
- 3 Identificar diferenças nos perfis lipídicos entre os 4 subtipos moleculares do câncer de mama invasivo: luminal A, luminal B, HER2 e triplo negativo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma apresentado na Figura 11 apresenta uma visão geral das etapas efetuadas no trabalho.

Inicialmente as amostras de tumores foram selecionadas, sendo que a seleção foi feita de forma que contemplasse os quatro subtipos moleculares de tumores de mama (Luminal A, Luminal B, HER2 e Triplo Negativo) e CDIS. Cortes histológicos de 10 μ m foram feitos nas amostras congeladas, e para cada amostra de tumor uma amostra de tecido normal adjacente também foi cortada. Os cortes histológicos foram analisados utilizando a técnica de DESI MSI e então foram corados com H&E. As amostras coradas por H&E foram utilizadas na etapa de seleção de regiões de interesse (ROIs) (CMI, CDIS e tecidos normais) feita por um patologista.

Os dados obtidos pelas análises de espectrometria de massas foram importados no software Biomap, dando origem às imagens moleculares 2D. As amostras foram scaneadas e as imagens de H&E também foram importadas no software BIOMAP e sobrepostas às imagens moleculares 2D. Análises visuais foram feitas comparando as imagens de H&E com as imagens moleculares 2D e os íons que apresentaram imagens moleculares com topografia definida foram selecionados. Paralelamente, espectros médios de massas das ROIs foram exportados para análises estatísticas, as quais selecionaram os íons capazes de diferenciar as ROIs. Todos os íons selecionados, tanto pelas análises visuais como pelas análises estatísticas, foram submetidos às buscas em bancos de dados de metabólitos

(Metabolomic Workbench - www.metabolomicworkbench.org) e lipídios (LIPID Metabolites and Pathways Strategy - www.lipidmaps.org/).

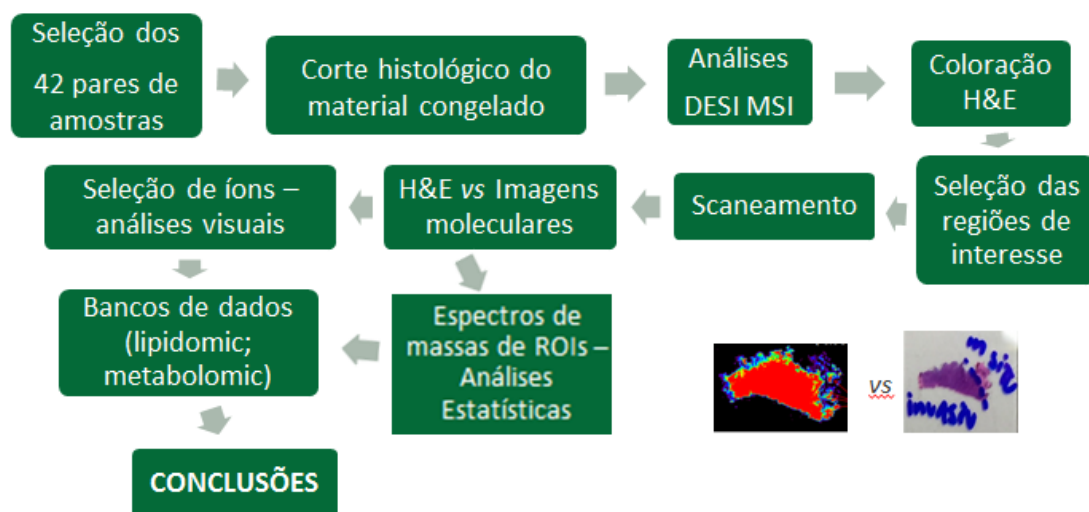


Figura 11 – Fluxograma representando as etapas efetuadas no trabalho. (DESI MSI - *Desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging*).

3.1 MATERIAIS

Todos os reagentes químicos obtidos de fontes comerciais foram de grau HPLC, e usados sem purificação adicional. Metanol (grau HPLC) foi obtido da Merck (Darmstadt, Germany). Água ultrapura foi preparada com um sistema de purificação Milli-Q da Millipore (Milford, MA). As amostras de tumores de mama foram provenientes do Biobanco do AC Camargo Cancer Center.

3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética e Pesquisa-CEP do A.C.Camargo Cancer Center, em processo de número 1830/13 em 02/2014, as amostras selecionadas foram coletadas do Biobanco dessa instituição, onde estavam armazenadas a - 80°C. Foram selecionadas 84 amostras de tecidos, contendo tecido tumoral e tecido benigno adjacente, de 42 pacientes que passaram por cirurgia devido à presença de tumor na mama. As amostras foram selecionadas de tal forma que os vários subtipos tumorais de câncer de mama fossem incluídos (Luminal A - 8 amostras; Luminal B – 10 amostras; Triplo Negativo – 12 amostras; HER2 – 5 amostras; Carcinoma Ductal *in situ* – 7 amostras).

Três cortes sequenciais com 10 µm de espessura foram feitos para cada amostra em um micrótomo (Leica Multicut 2045®, Germany) operado a - 30°C. Os cortes foram depositados em lâminas de vidro, as mesmas utilizadas em análises histológicas, de forma que cada lâmina continha uma amostra de tecido tumoral e uma amostra de tecido benigno adjacente do mesmo paciente. As lâminas foram mantidas a - 80°C até serem analisadas por DESI MSI.

3.3 ANÁLISES DESI-MSI

3.3.1 DESI-MSI e processamento da imagem

Antes de serem analisados por DESI MSI os tecidos congelados foram depositados em um dessecador por 10 minutos. Todas as amostras foram então analisadas por um espectrômetro de massas Q Exactive HF hybrid quadrupole orbitrap (Thermo Scientific) conectado a uma fonte comercial de DESI (Prosolia, Inc.).

Após a análise espectrométrica as mesmas lâminas foram coradas com H&E, com reagentes da marca Merk, e analisadas por um patologista em um microscópio óptico Olympus BX-52. Células tumorais e células normais foram demarcadas e então as lâminas foram scaneadas com uma amplificação de 20 vezes utilizando um Aperio XT Scanscope (Leica) e visualizadas usando o software ImageScope (Leica).

A obtenção dos dados pela análise espectrométrica foi feita linha por linha com uma resolução espacial de 200 μm . Metanol 100% grau HPLC da marca Merk foi utilizado como spray, nitrogênio foi usado como gás auxiliar para nebulização do electrospray com uma pressão de 175psi. O fluxo do spray foi de 1.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ e os espectros foram adquiridos em modo negativo (-5kV) no intervalo de m/z de 100 a 1200 utilizando o software XCalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

A intensidade de cada um dos sinais ao longo do espectro de massas adquirido foi representada como uma função da localização dos íons nos tecidos. Para a obtenção das imagens moleculares 2D os arquivos dos

espectros de massas (extensão *.raw*) foram convertidos em imagens (extensão *.img*) pelo software FireFly (Prosolia Inc., IN). Após a conversão as imagens puderam ser visualizadas no software biomédico Biomap (<https://ms-imaging.org/wp/biomap/>).

As imagens de H&E foram importadas no software Biomap, onde foram sobrepostas às imagens moleculares 2D. Com essa sobreposição e a prévia demarcação das regiões de tecido tumoral e normal, foi possível fazer a seleção das regiões de interesse (ROIs) para as quais espectros médios foram gerados e exportados no formato.txt para posteriores análises estatísticas. As ROIs foram cuidadosamente selecionadas a fim de classificar as regiões tumorais e normais com precisão (Figura 12).

Todas as imagens geradas no software biomap apresentadas nas figuras a seguir apresentam a mesma escala de intensidade e foram geradas utilizando a ordem de cor *rainbow* para que as regiões de maiores concentrações fossem representadas por vermelho e as de menores concentrações representadas em violeta. O *bin size* (resolução da imagem gerada) utilizado no software Biomap para as análises das imagens foi de 1, o que corresponde a uma diferença de massa de 0.03Da de uma imagem para a outra, com isso, cerca de 35000 imagens foram geradas para cada amostra, já que o intervalo de massas que estamos avaliando é de 100 a 1200Da.

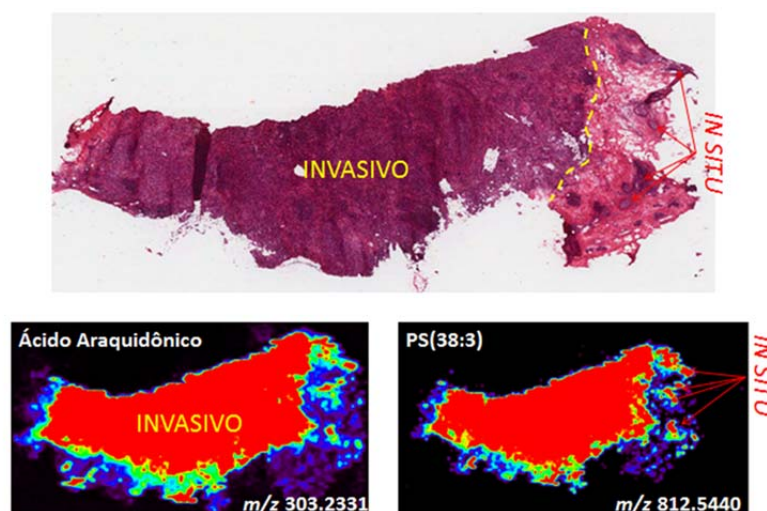


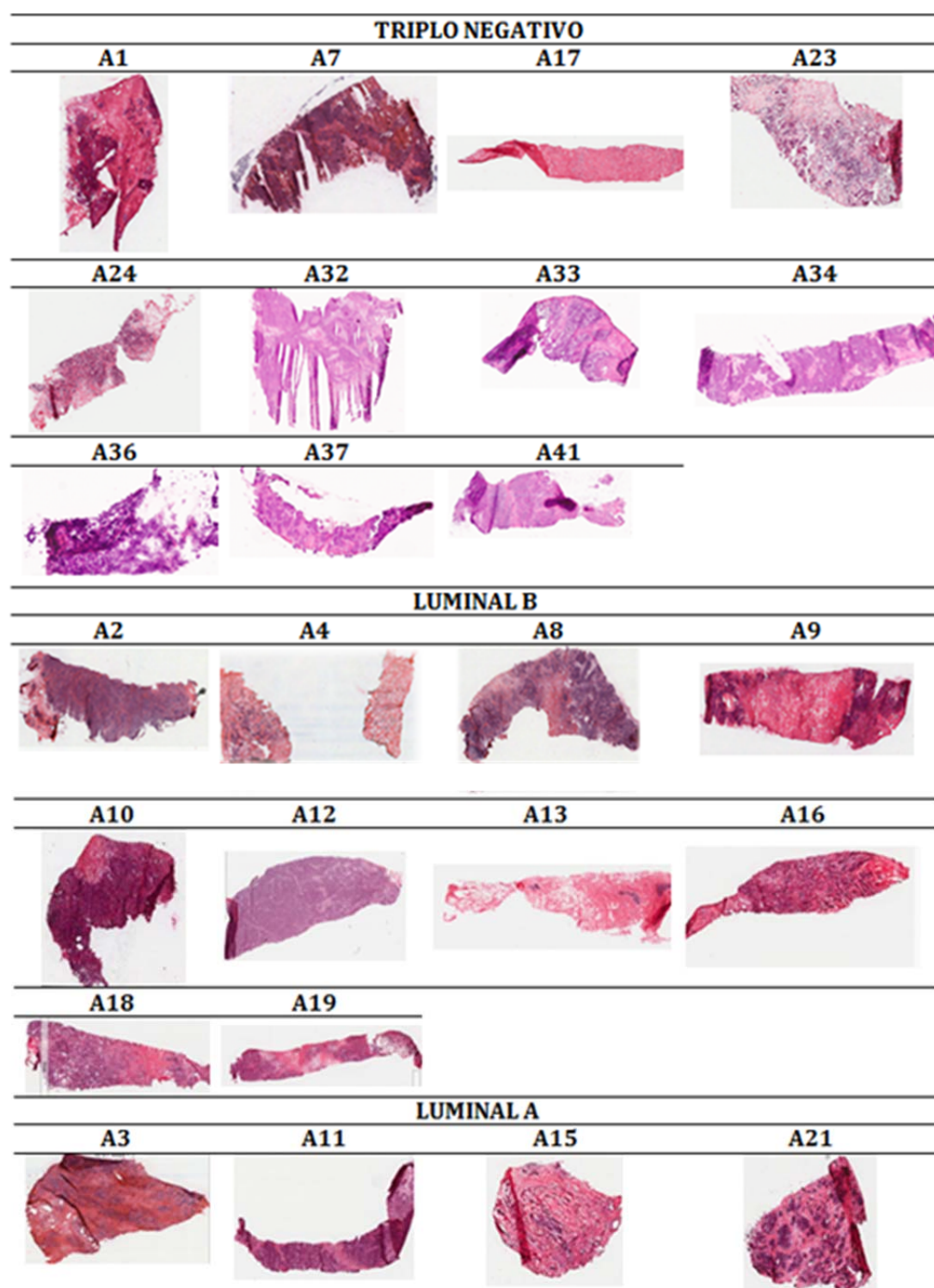
Figura 12 - Seleção das regiões tumorais na A2, usando H&E sobreposto às imagens moleculares 2D obtidas com os dados de DESI MSI. A primeira imagem é a imagem de H&E, a segunda é a imagem molecular 2D do íon de m/z 303.2331 e a terceira do íon de m/z de 812.5440 (H&E: *Hematoxylin and eosin*, DESI MSI: *Desorption electrospray ionization Mass Spectrometry Imaging*).

Os íons que apresentaram melhor distribuição no tecido, considerando as diferentes regiões de interesse, foram selecionados e comparados com dados da literatura e também com dados disponíveis em bancos de dados de metabólitos (Metabolomic Workbench - www.metabolomicworkbench.org) e lipídios (LIPID Metabolites and Pathways Strategy - www.lipidmaps.org/).

A Tabela 2 apresenta a identificação e as características das amostras selecionadas e a Figura 13 contém imagens representativas para cada corte, sendo que as amostras estão agrupadas segundo seu subtipo tumoral.

Tabela 2 - Características das amostras analisadas

IDENTIFICAÇÃO	TIPO DE TUMOR	RE (%)	HER2(+)
A1	Triplo Negativo	-	-
A2	Luminal B	+	-
A3	Luminal A	+	-
A4	Luminal B	+	-
A5	CDIS associado à CI	-	+
A6	HER2	-	+
A7	Triplo Negativo	-	-
A8	Luminal B	+	+
A9	Luminal B	-	-
A10	Luminal B	+	-
A11	Luminal A	+	-
A12	Luminal B	+	-
A13	Luminal B	+	+
A14	CDIS puro	+	-
A15	Luminal A	+	-
A16	Luminal B	+	+
A17	Triplo negativo	-	-
A18	Luminal B	+	+
A19	Luminal B	+	-
A20	CDIS associado à CI	+	-
A21	Luminal A	+	-
A22	CDIS puro	+	+
A23	Triplo negativo	-	-
A24	Triplo negativo	-	-
A25	Luminal A	+	+
A26	Luminal A	+	-
A27	Luminal A	+	-
A28	Luminal A	+	-
A29	CDIS puro	+	+
A30	Triplo negativo	-	-
A31	HER2	-	+
A32	Triplo negativo	-	-
A33	Triplo negativo	-	-
A34	Triplo negativo	-	-
A35	CDIS puro	-	+
A36	Triplo negativo	-	-
A37	Triplo negativo	-	-
A38	HER2	-	+
A39	HER2	-	+
A40	CDIS puro	-	+
A41	Triplo negativo	-	-
A42	HER2	-	+



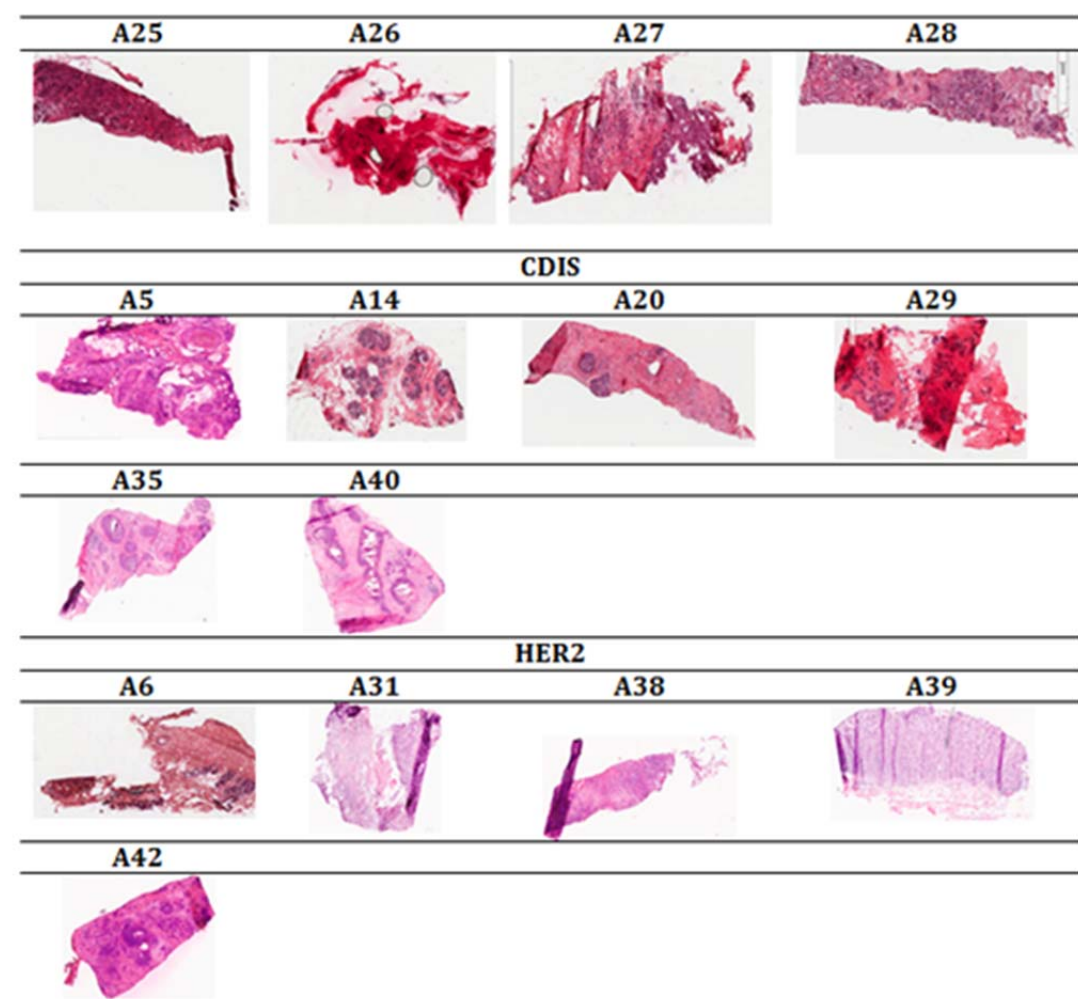


Figura 13 - Imagens de H&E das amostras de tumores separadas por subtipos. (CDIS: Carcinoma Ductal *In Situ*, H&E: *Hematoxylin and eosin*)

3.3.2 Análises Estatísticas

Os espectros médios das regiões de interesse (tumor, tecido normal e CDIS) gerados no software Biomap foram exportados no formato.txt e então importados para a linguagem R para estudos estatísticos. Nas análises estatísticas todos os picos individuais das regiões selecionadas foram considerados.

Uma análise não supervisionada foi feita com o método de análises de componentes principais (PCA), para verificar as semelhanças

apresentadas nos dados obtidos. A análise foi feita utilizando os espectros médios de massas das ROIs, na faixa de m/z de 100 a 1200, considerando os íons que apresentaram sinal acima do erro medido em pelo menos 7 dos 41 tumores (17%). Os componentes principais foram obtidos com a função "prcomp" do software R, voltado para computação científica e estatística. Parâmetros desta função foram fixados para que as variáveis (massas) fossem centralizadas (subtraídas de sua média) e padronizadas (divididas pelo seu desvio padrão) antes de computar os componentes principais.

Posteriormente o método Lasso (*multiclass-logistic regression with L1 penalty*) foi usado para selecionar os íons capazes de discriminar as amostras nas seguintes comparações: Tumor vs Normal; CMI vs CDIS; Subtipos tumorais (Triplo Negativo, Luminal A, Luminal B e HER2) e Triplo negativo vs demais subtipos. O método foi aplicado usando o pacote glmnet da linguagem R (FRIEDMAN et al. 2010, <https://cran.r-project.org/web/packages/glmnet/index.html>).

Os modelos gerados pelo método Lasso apresentam somente um subconjunto de variáveis/preditores isso porque nesse método um peso matemático para cada valor de m/z informativo é calculado, dependendo da importância que cada íon apresenta em caracterizar uma determinada classe, sendo que o valor zero é atribuído para os coeficientes das variáveis menos significantes e com isso os modelos gerados são mais simples e mais fáceis de serem interpretados do que os modelos gerados por regressões lineares.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES DE DESI MSI

Alguns dos picos mais intensos dos espectros de massas apresentaram imagem sem topografia definida (Figura 14). Aparentemente, os íons em questão (Tabela S1, Material Suplementar) apresentam concentração elevada na amostra e solubilidade no spray utilizado o que resulta em um espalhamento dos mesmos em toda a lâmina e impossibilita a análise topográfica. Em estudos posteriores as condições experimentais de composição e aplicação do spray nas amostras devem ser otimizadas visando à manutenção das informações topográficas desses íons.

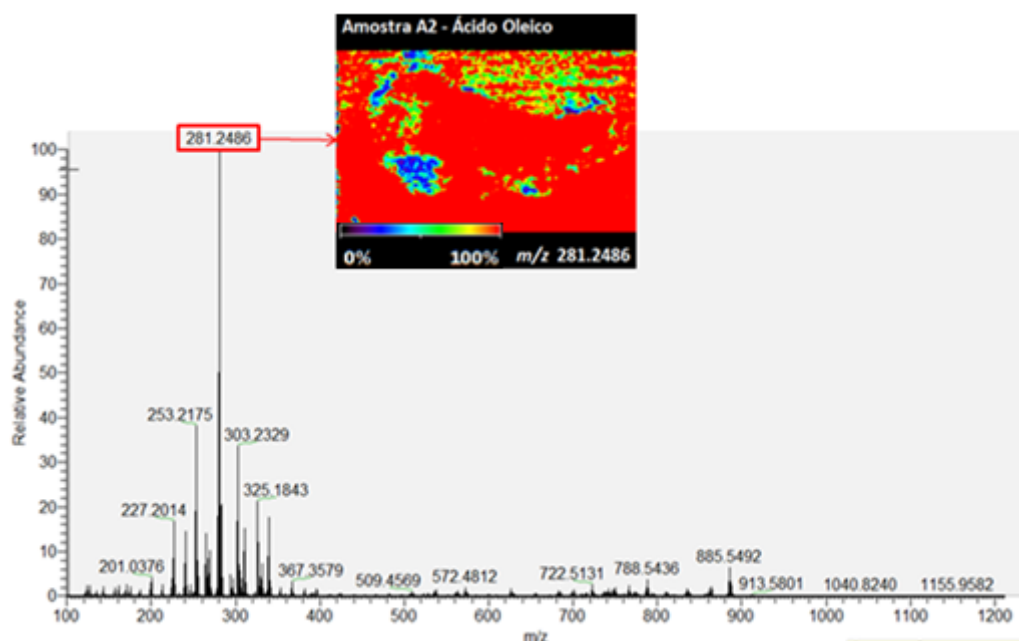


Figura 14 - Espectro de massas médio obtido por DESI MSI no modo negativo para a amostra A2. Pico de maior intensidade, identificado como ácido oleico com um erro de 0.36 ppm (com base na medida de alta precisão da massa e no padrão isotópico). Imagem molecular 2D para o íon ($M-H^-$) de m/z 281.2486 na amostra A2. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

As imagens moleculares 2D, geradas pixel por pixel pelas análises de DESI MSI com $\sim 200\ \mu\text{m}$ de resolução, foram cuidadosamente analisadas e comparadas com as regiões de interesse delimitadas pelas análises de H&E. A visualização da distribuição espacial de íons específicos foi obtida, sendo que as imagens moleculares de alguns íons possibilitaram a observação até mesmo de pequenas estruturas nos tecidos, como por exemplo, o íon de m/z 812.5440 que evidencia os dutos contendo células de CDIS, Figura 12.

Espectros de massas obtidos na faixa de m/z de 100-200 para uma amostra de tecido de mama e algumas de suas imagens moleculares 2D são apresentados na Figura 15. Íons provenientes de moléculas de xenobióticos (tais como o niqueloceno, pantoprazol, ranitidina e parecoxib) e metabólitos

(incluindo a xantina, o ácido úrico e o ácido dehidroascórbico) foram detectados na região não tumoral enquanto que na região tumoral íons provenientes de metabólitos (como taurina, glutamina, ácido glutâmico e ácido ascórbico) foram detectados (Figure15B).

Conforme apresentado na Figura 15B a glutamina e o ácido glutâmico estão mais concentrados na região tumoral sendo que a glutamina foi encontrada apenas nas amostras do subtipo luminal enquanto que o ácido glutâmico está presente em todos os subtipos. Sabe-se que para suportar a rápida divisão celular as células tumorais necessitam de maior quantidade de nutrientes do que as células não tumorais e, além de glicose, glutamina e ácidos graxos são nutrientes essenciais para o crescimento e viabilidade celular (PIKE et al. 2011; ALTMAN et al. 2016). O consumo de glutamina em alguns tumores é tão elevado que acarreta na diminuição dessa molécula a nível plasmático (CHEN et al. 1993; KLIMBERG et al. 1996; PIKE et al. 2011). Sendo assim, a maior concentração de glutamina observada em subtipos luminais pode ser explicada pelo fato de que neste subtipo as células apresentam menor taxa de divisão celular enquanto que nos subtipos mais agressivos (HER2 e Triplo Negativo) a glutamina deve ter sido consumida mais rapidamente para suportar a rápida divisão celular.

Além de participar do metabolismo, a glutamina é precursora da glutathione a qual apresenta importante ação no controle de espécies reativas de oxigênio (*reactive species of oxygen*, ROS) e sua concentração se correlaciona inversamente com a tumorigênese e resistência a fármacos (YEH et al. 2005; ALTMAN et al. 2016). O íon proveniente da glutathione (M-

H⁻ de m/z 306.0761) também foi observado nas imagens moleculares 2D de todos os subtipos tumorais, com exceção do subtipo HER2. Os tumores do subtipo Luminal são os que apresentam maior concentração (Figura 16) enquanto que os subtipos mais agressivos apresentam níveis menores. Tal fato é suportado pela hipótese de que o status de glutathiona é inversamente relacionado com as transformações malignas (YEH et al. 2005).

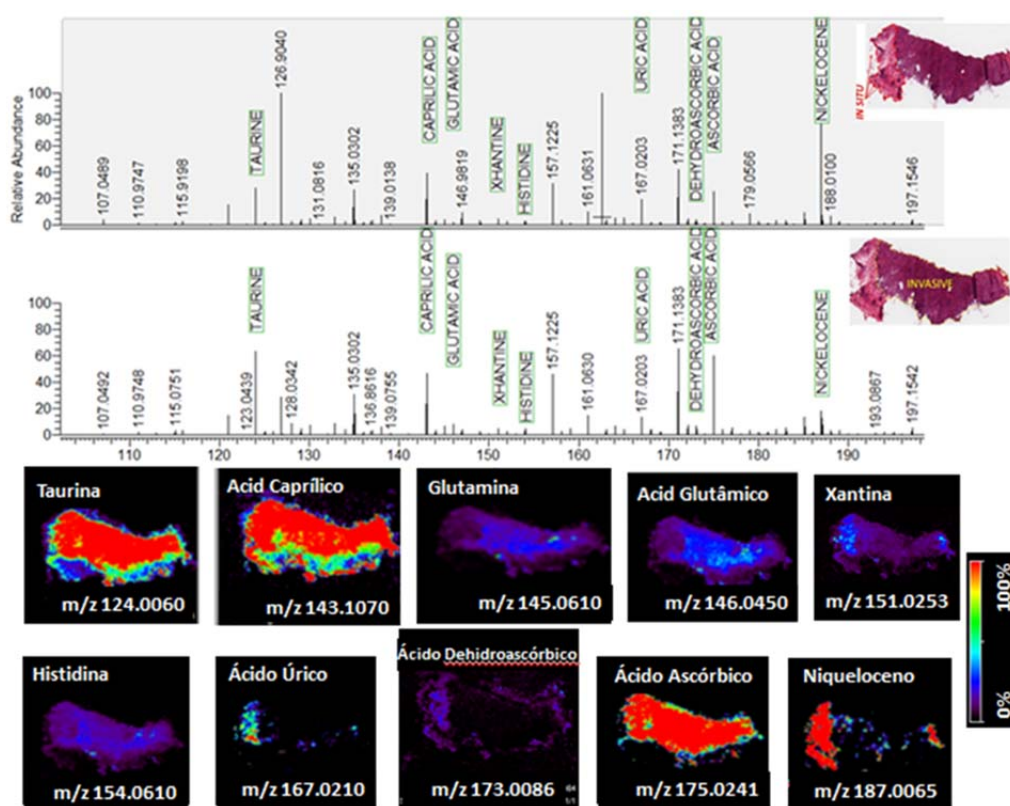


Figure 15 - Espectros de massas obtidos no modo negativo por análises de DESI MSI na faixa de m/z 100–200 para uma amostra de tecido de mama (Amostra A2). (A) O espectro superior é referente a um pixel da região não tumoral, a qual no caso dessa amostra contém também CDIS, e o espectro de baixo é proveniente de um pixel da região tumoral. Do lado direito dos espectros estão as respectivas imagens de H & E. (B) Distribuição espacial de 10 pequenas moléculas mapeadas em um tecido de mama com câncer do subtipo Luminal B (Amostra A2). (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

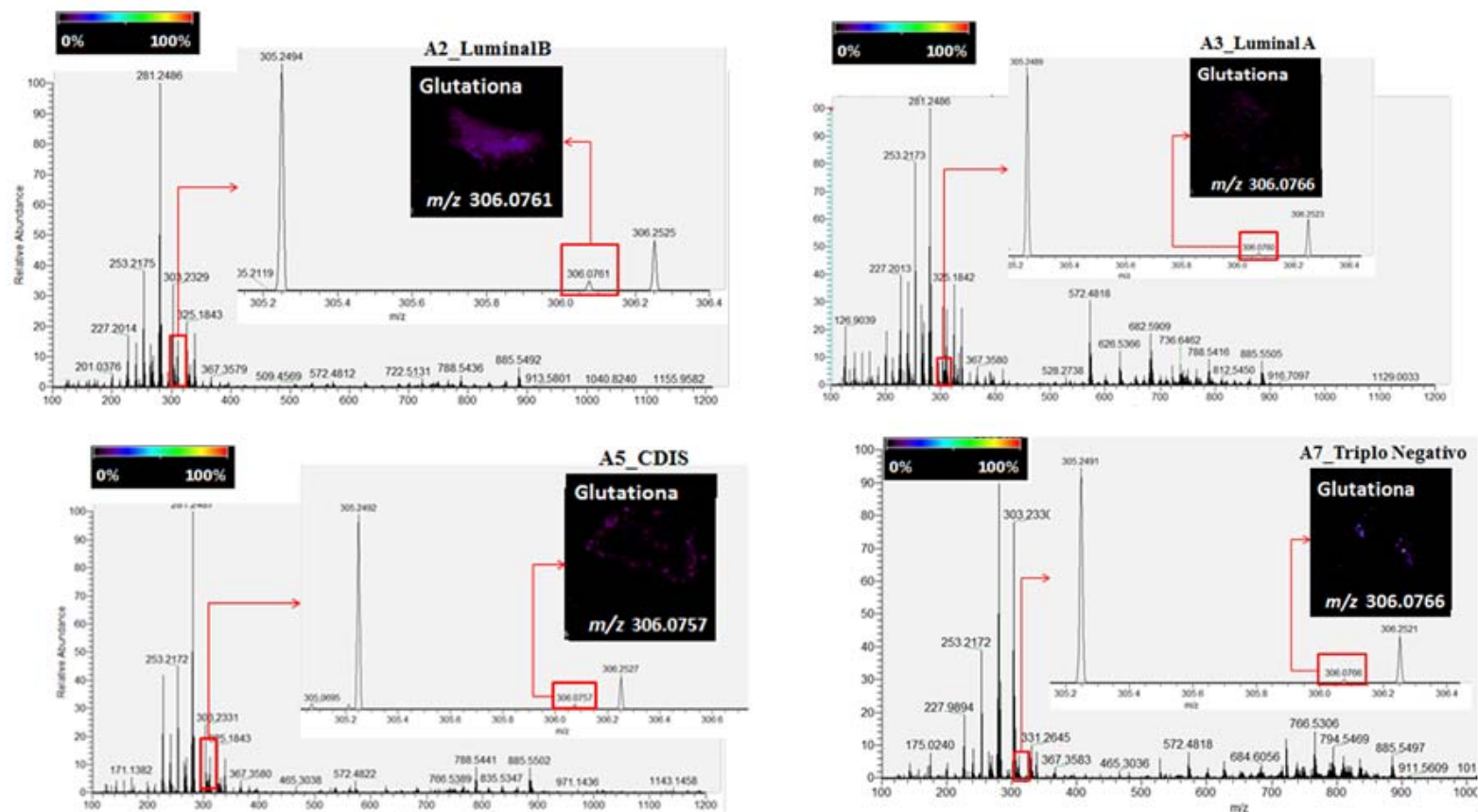


Figura 16 - Espectros de massas obtidos por DESI MSI de 4 amostras de câncer de mama de diferentes subtipos, e suas respectivas imagens moleculares 2 D para o íon ($M-H^-$) da glutathione (m/z 306.0775). (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

Espectros de massas (faixa de m/z de 100 a 1200) e imagens moleculares 2D para os diferentes subtipos de tumores de mama estão representados nas Figuras S1-S19 do material suplementar. Todos os íons que geraram imagens moleculares com topografia definida foram submetidos às buscas nos bancos de dados e os resultados estão listados na Tabela 3. Os íons que apresentaram imagens moleculares 2D mas não foram encontrados nos bancos de dados estão listados na Tabela 4. Considerando os resultados das buscas (Tabela 3) foi possível observar que a maioria dos íons detectados é proveniente de glicerofosfolipídeos seguidos de ácidos graxos, eicosanóides, metabólitos e xenobióticos (Figura 17).

As células tumorais apresentam um complexo sistema de defesa para limitar o acúmulo de ROS, incluindo agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Exemplos de agentes antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas glutathione peroxidase e superóxido dismutase (SOD - metaloproteínas que apresentam eficiente mecanismo para neutralizar as ROS sem necessitar de energia celular para operar (SALVEMINI et al. 2002). Grande variedade de substâncias de origem endógena e exógena pode agir como antioxidantes não enzimáticos, tais como: vitamina A, vitamina C, vitamina E, e alguns metais (como Cu, Zn, Mn e Se os quais são cofatores das enzimas antioxidantes SOD).

Tabela 3 - Resultado das buscas nas bases de dados de metabólitos encontrados nas análises de imagens moleculares 2D.

<i>m/z</i> Medida	Fórmula Proposta	<i>m/z</i> Teórico	$\Delta m/z$	Erro (ppm)	Atribuição	Categoria
24.0060	C ₂ H ₇ NO ₃ S	124.0074	+0.0014	+11.29	Taurina	Metabólito
143.1070	C ₈ H ₁₆ O ₂	143.1078	+0.0008	+5.59	Ácido Caprílico	Metabólito
145.0610	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	145.0619	+0.0009	+6.20	Glutamina	Metabólito
146.0450	C ₅ H ₉ NO ₄	146.0459	+0.0009	+6.20	Ácido Glutâmico	Metabólito
151.0253	C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	151.0262	+0.0009	+5.96	Xantina	Metabólito
154.0610	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	154.0622	+0.0012	+7.79	Histidina	Metabólito
157.0113	C ₄ H ₅ F ₃ O ₃	157.0118	0.000	3.18	2,2,2-(trifluoroetoxi)ácido acético	Xenobiótico
167.0210	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	167.0211	+0.0001	+0.60	Ácido Úrico	Metabólito
173.0086	C ₆ H ₆ O ₆	173.0092	+0.0006	+3.47	Ácido Dehidroascórbico	Metabólito
175.0241	C ₆ H ₈ O ₆	175.0248	+0.0007	+3.99	Ácido Ascórbico	Metabólito
187.0065	C ₁₀ H ₁₀ Ni	187.0063	-0.0002	-1.07	Niqueloceno	Xenobiótico
248.0497	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	248.0499	0.0002	0.81	Sulfapiridina	Metabólito
248.9286	C ₉ H ₅ Cl ₃ O ₂	248.9282	0.000	-1.61	2-(4'-Clorofenil)-3,3-dicloropropenoato	Xenobiótico
277.2175	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	277.2173	-0.0002	-0.72	Ácido α linolênico	[FA]
279.2330	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279.2330	0.0000	0.00	Ácido linoleico	[FA]
281.2487	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	281.2486	-0.0001	-0.36	Ácido oleico	[FA]
295.2643	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	295.2643	0.0000	0.00	Ácido Octadecenoico	[FA]
303.2331	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	303.2330	-0.0001	-0.33	Ácido araquidônico	[FA] - Eicosanóides
305.2487	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	305.2486	-0.0001	-0.33	Ácido Eicosatrienoico	[FA] - Eicosanóides
306.0761	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	306.0765	+0.0004	+1.31	Glutaciona	Metabólito
307.2643	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	307.2643	0.0000	0.00	Ácido Eicosadienoico	[FA] - Eicosanóides
309.2800	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	309.2799	-0.0001	-0.32	Ácido Eicosenoico	[FA] - Eicosanóides
311.2229	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	311.2228	-0.0001	-0.32	Ácido Octadecanoico	[FA]
323.2583	C ₂₀ H ₃₆ O ₃	323.2592	0.001	2.78	Ácido Auricolico	[FA] Eicosanóides

Cont/ Tabela 3

327.2330	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	327.2330	0.0000	0.00	Ácido Docosaheptaenoico	[FA]
329.2490	C ₂₂ H ₃₄ O ₂	329.2486	-0.0004	-1.22	Ácido Docosapentaenoico	[FA]
331.2640	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	331.2643	+0.0003	+0.91	Ácido Docosatetraenoico	[FA]
339.1997	C ₂₂ H ₂₈ O ₃	339.1966	-0.003	-9.14	Esteróide ou Myrsinoico	[FA] ou [ST]
349.1099	C ₁₃ H ₂₃ ClN ₄ O ₃ S	349.1107	-0.0008	-2.29	Hidrocloreto de Ranitidina	Xenobiótico
357.2804	C ₂₄ H ₃₈ O ₂	357.2799	0.000	-1.40	Esteróide ou FA	[FA] ou [ST]
359.2954	C ₂₄ H ₄₀ O ₂	359.2956	0.000	0.5566	5 α ou β Colan-24-oic Ácido/tetracosatetraenoico /ácido 12-[3]-ladderano-dodecanoico	[FA] ou [ST]
369.0909	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	369.0915	0.0006	1.62	Parecoxib	Xenobiótico
382.0677	C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ O ₄ S	382.0679	0.0002	0.52	Pantoprazol	Xenobiótico
465.3040	C ₂₇ H ₄₆ O ₄ S	465.3044	+0.0004	+0.86	Sulfato de Colesterol	[ST]
509.4568	C ₃₂ H ₆₂ O ₄	509.4575	0.001	1.37	Mono propileno glicol e diesters de gorduras ou FA ou FAHFA	[FA]
585.4862	C ₃₈ H ₆₅ O ₄	585.4888	+0.0026	+4.44	Ác. Oleico+Ác. Araquidônico*	[FA]
599.3198	C ₂₇ H ₅₃ O ₁₂ P	599.3202	0.000	0.67	PI(18:0) ou Glicerofosfoinositols	[GL] - PI
607.4724	C ₄₀ H ₆₃ O ₄	607.4732	+0.0008	+1.32	Dimero de Ác. Araquidônico*	[FA] - Eicosanoids
615.5360	C ₄₀ H ₇₂ O ₄	615.5358	-0.0002	-0.32	1-(10-metil-hexadecanoil-2-(8-[3]-ladderano-octanil)-sn-glicerol	[GP]
624.5235	C ₃₇ H ₇₁ N ₆ O	624.5209	-0.0026	-4.16	N-(3-(15-metil-hexadecanoiloxi)-13-metil-tetradecanoil)-L-serina	[FA]
637.5428	C ₃₉ H ₇₄ O ₆	637.5413	-0.0015	-2.35	1,2,3-tridodecanoil-sn-sn-glicerol	[GP] - TriacilGPicerol
648.6289	C ₄₂ H ₈₃ N ₃ O	648.6300	+0.0011	+1.70	Cer(d18:1/24:0) ou Cer(d18:0/24:1(15Z))	[SP] - Ceramida
700.5292	C ₃₉ H ₇₆ N ₇ O ₇ P	700.5287	-0.0005	-0.71	PE(34:1)	[GP] - PC/PE
702.5466	C ₃₉ H ₇₈ N ₇ O ₇ P	702.5443	-0.0023	-3.27	PC ou PE	[GP] - PC/PE
714.5066	C ₃₉ H ₇₄ N ₈ O ₈ P	714.5079	0.0013	1.82	PC ou PE	[GP] - PC/PE
716.5231	C ₃₉ H ₇₆ N ₈ O ₈ P	716.5236	0.0005	0.70	PC ou PE	[GP] - PC/PE
721.5017	C ₃₈ H ₇₅ O ₁₀ P	721.5025	0.0008	1.11	PG (32:0)	[GP] - PG

Cont/ Tabela 3

722.5134	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	722.5130	-0.0004	-0.55	PE (36:0)	[GP] - PE
724.5313	C ₄₁ H ₇₆ NO ₇ P	724.5287	-0.0026	-3.59	PE (P 36:3) ou PE (O 36:4)	[GP] - PE
734.5348	C ₃₉ H ₇₈ NO ₉ P	734.5342	-0.0006	-0.82	PS (33:0)	[GP] - PS
740.5231	C ₄₁ H ₇₆ NO ₈ P	740.5236	0.0005	0.68	PC ou PE	[GP] - PC/PE
742.5389	C ₄₁ H ₇₈ NO ₈ P	742.5392	0.0003	0.40	PC ou PE	[GP] - PC/PE
746.5099	C ₄₃ H ₇₄ NO ₇ P	746.5130	0.0031	4.15	PE(P-16:0/22:6)	[GP] - PE
748.5255	C ₄₃ H ₇₆ NO ₇ P	748.5287	0.0032	4.28	PE	[GP] - PE
750.5457	C ₄₃ H ₇₈ NO ₇ P	750.5443	-0.0014	-1.87	PE	[GP] - PE
751.4592	C ₄₁ H ₆₉ O ₁₀ P	751.4556	-0.004	-4.79	PG (35:6)	[GL] - PG
758.4990	C ₄₀ H ₇₄ NO ₁₀ P	758.4978	-0.0012	-1.58	PS(34:2)	[GP] - PS
760.5124	C ₄₀ H ₇₆ NO ₁₀ P	760.5134	0.0010	1.31	PS(34:1)	[GP] - PS
764.5222	C ₄₃ H ₇₆ NO ₈ P	764.5236	0.0014	1.83	PC (35:5) ou PE (38:5)	[GP] - PC/PE
766.5393	C ₄₃ H ₇₈ NO ₈ P	766.5392	-0.0001	-0.13	PC (45:4) ou PE (38:4)	[GP] - PC/PE
771.5170	C ₄₂ H ₇₇ O ₁₀ P	771.5182	0.0003	0.39	PG (36:3)	[GP] - PG
772.5249	C ₄₅ H ₇₆ NO ₇ P	772.5287	0.0038	4.92	PE	[GP] - PE
773.5328	C ₄₂ H ₇₉ O ₁₀ P	773.5338	0.0010	1.29	PG (36:2)	[GP] - PG
786.5286	C ₄₂ H ₇₈ NO ₁₀ P	786.5291	0.0005	0.64	PS(36:2)	[GP] - PS
788.5438	C ₄₂ H ₈₀ NO ₁₀ P	788.5447	0.0009	1.14	PS(36:1)	[GP] - PS
793.5044	C ₄₄ H ₇₅ O ₁₀ P	793.5025	-0.0019	-2.39	PG (38:6)	[GP] - PG
797.5323	C ₄₄ H ₇₉ O ₁₀ P	797.5338	0.0015	1.88	PG (38:4)	[GP] - PG
802.5594	C ₄₃ H ₈₂ NO ₁₀ P	802.5604	0.0010	1.25	PS(37:1)	[GP] - PS
804.5794	C ₄₃ H ₈₄ NO ₁₀ P	804.5760	-0.0034	-4.23	PS(37:0)	[GP] - PS
807.5015	C ₄₁ H ₇₇ O ₁₃ P	807.5029	0.0014	1.73	PI (32:1)	[GP] - PI
810.5280	C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₀ P	810.5291	0.0011	1.36	PS(38:4)	[GP] - PS
812.5440	C ₄₄ H ₈₀ NO ₁₀ P	812.5447	0.0007	0.86	PS(38:3)	[GP] - PS

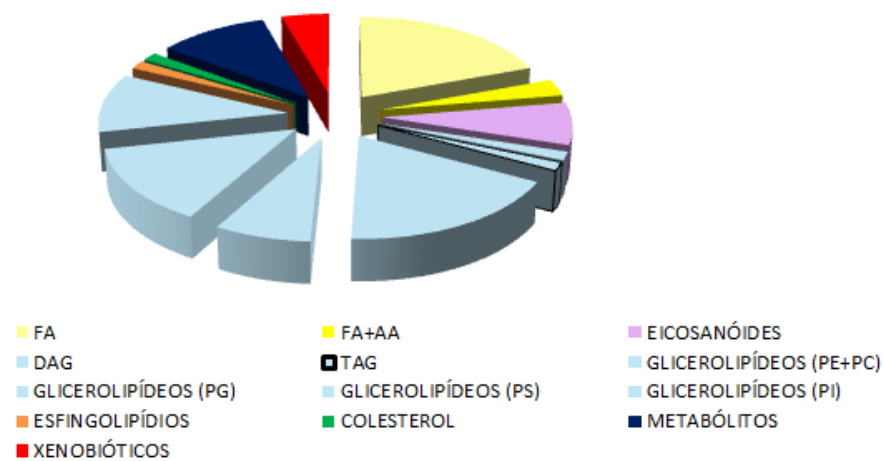
Cont/ Tabela 3

819.5188	C ₄₆ H ₇₇ O ₁₀ P	819.5182	-0.0006	-0.73	PG (40:7)	[GP] - PG
834.5262	C ₄₆ H ₇₆ NO ₁₀ P	834.5291	0.0029	3.48	PS(40:6)	[GP] - PS
835.5335	C ₄₃ H ₈₁ O ₁₃ P	835.5342	0.0007	0.84	PI (34:1)	[GP] – PI
857.5165	C ₄₅ H ₇₉ O ₁₃ P	857.5186	0.0021	2.45	PI(36:4)	[GP] - PI
861.5500	C ₄₅ H ₈₃ O ₁₃ P	861.5499	-0.0001	-0.12	PI (36:2)	[GP] - PI
863.5651	C ₄₅ H ₈₅ O ₁₃ P	863.5655	0.0004	0.46	PI (36:1)	[GP] - PI
885.5497	C ₄₇ H ₈₃ O ₁₃ P	885.5499	0.0002	0.23	PI (38:4)	[GP] - PI
909.5479	C ₄₉ H ₈₃ O ₁₃ P	909.5499	0.0020	2.20	PI (40:6)	[GP] - PI
913.5805	C ₄₉ H ₈₇ O ₁₃ P	913.5812	0.0007	0.77	PI (40:4)	[GP] - PI

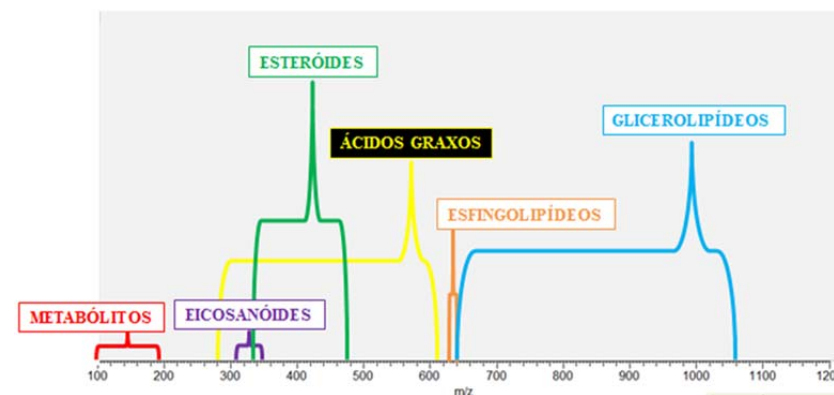
m/z teórica baseada em massa monoisotópica da respectiva espécie deprotonada. Tentativa de atribuição baseada na alta precisão das massas e na distribuição isotópica; *Íons caracterizados por BANERJEE et al. (2017). FA, *fatty acids*; ST, *sterol lipids*; GP, *glycerolipids*; SP, *sphingolipids*; PC, *phosphatidylcholine*; PE, *phosphatidylethanolamine*; PG, *phosphatidylglycerol*; PI, *phosphatidylinositol*; PS, *phosphatidylserine*; PIM, *phosphatidylinositol mannosides*.

Tabela 4 - Valores de m/z que apresentaram imagens moleculares 2D para as amostras analisadas mas não foram encontrados em bancos de dados.

Valores de m/z			
146.982	663.520	722.6661	900.714
164.953	666.600	723.980	919.728
172.969	670.590	734.630	921.755
269.065	672.580	736.539	928.883
413.246	680.570	736.645	933.509
572.45	682.590	769.497	942.726
600.514	684.600	794.553	945.752
625.464	688.490	816.527	977.528
626.536	694.640	843.528	1012.800
627.476	698.510	845.725	1038.810
629.490	708.610	873.754	1065.585
631.493	710.470	875.765	1109.614
653.497	710.630	899.768	1119.638
656.576	710.970	900.713	1153.637
			1155.956



(A) - Distribuição das categorias lipídicas nas amostras analisadas.



(B) – Faixas de massas características dos analitos presentes nas amostras analisadas.

Figura 17 - Distribuição das diferentes categorias lipídicas nas amostras analisadas por DESI MSI e H&E e faixas de massas características. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*, H&E: *Hematoxylin and eosin*). FA, *fatty acids*; FA+AA, *fatty acids + amino acids*; DAG, *diacylglycerol*; TAG, *triacylglycerol*; PC, *phosphatidylcholine*; PE, *phosphatidylethanolamine*; PG, *phosphatidylglycerol*; PI, *phosphatidylinositol*; PS, *phosphatidylserine*; PIM, *phosphatidylinositol mannosides*.

Nas amostras analisadas quase todos os íons encontrados na faixa de m/z de 100 a 200 são provenientes de metabólitos e moléculas antioxidantes. As imagens moleculares indicam que as moléculas na sua forma reduzida (como o íon de m/z 175.0241, proveniente do ácido ascórbico, por exemplo) apresentam maior concentração nas regiões tumorais enquanto que as moléculas na forma oxidada (no caso o íon de m/z 173.0086 - ácido dehidroascórbico) estão mais concentradas nas regiões de tecidos normais adjacentes (Figura 15B). O tecido normal também apresenta maior concentração de íons provenientes de xenobióticos, como é o caso dos íons de m/z de 349.1099, 369.0909 e 382.0677 (provenientes dos fármacos omeprazol, parecoxib e pantoprazol, respectivamente) e do íon de m/z 187.0065 (proveniente do niqueloceno).

Por apresentar níquel na sua molécula (Ni^{2+} , metal de transição, estado de oxidação +2) o niqueloceno também apresenta grande eficiência em processos redox. A simulação da distribuição isotópica do niqueloceno deprotonado (m/z de 187.0063) e a comparação com a distribuição isotópica das espécies detectadas com m/z 187.0065 foi feita com a finalidade de confirmar sua identidade, uma vez que não encontramos dados na literatura que associem niqueloceno com câncer de mama (Figura 18). O níquel apresenta um padrão isotópico muito particular (^{58}Ni – 68%; ^{60}Ni – 26; ^{61}Ni – 1%) e como pode ser observado na comparação do espectro de massas obtido experimentalmente com a distribuição isotópica teórica, os perfis obtidos são muito semelhantes o que sugere que o íon detectado é mesmo proveniente do niqueloceno (Figura 18).

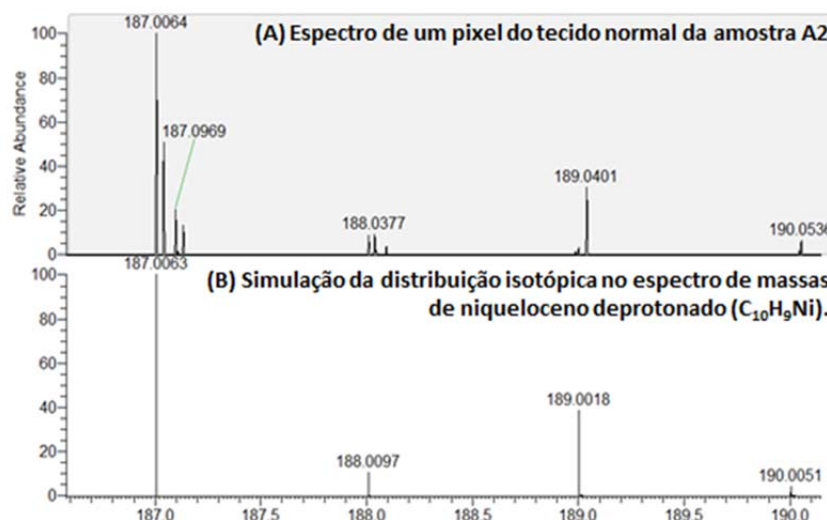


Figura 18 - Espectro de massas, obtido por DESI MSI no modo negativo, para a amostra A2 na região de m/z entre 186 e 190 e simulação da distribuição isotópica para a molécula de niqueloceno deprotonada: (A) Espectro de um pixel do tecido normal da amostra A2; (B) Simulação da distribuição isotópica no espectro de massas de niqueloceno deprotonado ($C_{10}H_9Ni$). (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

É presumido que a maioria dos compostos de níquel induz ao câncer por mecanismos não genotóxicos (SALNIKOW e ZHITKOVICH 2008; HERNÁNDEZ et al. 2009). Eventos epigenéticos desencadeados por compostos de níquel incluem: stress hipóxico, inibição da acetilação de histonas, alteração da homeostase de ferro, depleção de ascorbato, indução de hipermetilação do DNA e silenciamento de genes supressores de tumores via hipermetilação dos seus promotores (SALNIKOW e ZHITKOVICH 2008). Outra característica associada à ação de níquel em tumores é a inibição de canais proteicos da membrana plasmática que fazem a conexão entre o interior de células adjacentes e permitem a troca direta de pequenas moléculas (moléculas com massas de até 1000Da) e íons, mecanismo importante para

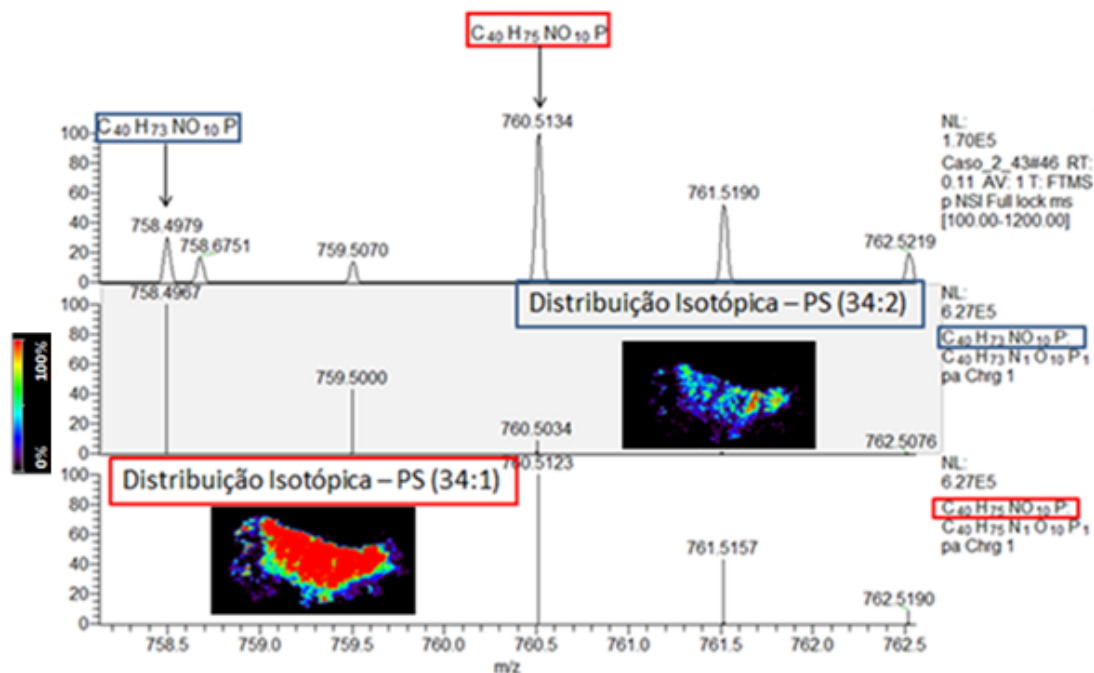
manter a homeostase celular (BUDUNOVA et al. 1996). Adicionalmente o níquel pode estar associado a bactérias características do trato gastrointestinal (BENOIT et al. 2013) sendo que diversos estudos associam o desequilíbrio do microbioma intestinal com câncer de mama (KWA et al. 2016, YANG et al. 2017).

Variações nos graus de insaturação de lipídios também foram observadas dependendo da região do tecido analisada. A Tabela 5 contém algumas das moléculas que apresentaram diferentes graus de insaturação e os subtipos onde foram detectadas. Na Figura 19 os íons de m/z 758.4979 e 760.5134, no espectro de massas da região tumoral da amostra A2, representam a variação do grau de insaturação para as moléculas PS (34:2) e PS (34:1). A simulação de distribuições isotópicas para essas moléculas (segundo e terceiro espectros da Figura 19) evidencia que o íon de m/z 760.5134 não é apenas um isótopo do íon de m/z 758.4979. Imagens moleculares 2D para íons provenientes de lipídios foram geradas para representar a diminuição no grau de insaturação em diferentes subtipos tumorais (Figura 21 a 23). A predominância de lipídios menos insaturados nas regiões tumorais sugere que as células tumorais apresentam preferência pelas moléculas com menor grau de insaturação.

Tabela 5 - Valores de m/z de moléculas que apresentaram diferentes graus de insaturação e presença (X) nas imagens moleculares dos subtipos tumorais analisados.

m/z	Erro (ppm)	LB (A2)	LA (A28)	CDIS (A_5)	HER2 (A_6)	TN (A_7)	Atribuição	Nome
173.0086	3.47	X	X	X			$C_6H_5O_6$	Ácido Dehidroascórbico
175.0241		X	X	X		X	$C_6H_7O_6$	Ácido Ascórbico
327.2330	0.00	X	X	X		X	$C_{22}H_{31}O_2$	Docosaheptaenóico
329.2490	1.22	X	X			X	$C_{22}H_{33}O_2$	Docosapentaenóico
331.2640	0.91	X	X	X		X	$C_{22}H_{35}O_2$	Docosatetraenóico
357.2804	1.40	X		X			$C_{24}H_{38}O_2$	ST ou FA
359.2956	0.00	X		X			$C_{24}H_{40}O_2$	ST ou FA
698.5155	3.58	X		X		X	$C_{39}H_{74}NO_7P$	PE (O-34:3) ou PE (P-34:2)
700.5292	0.71	X	X	X		X	$C_{39}H_{76}NO_7P$	PE (O-34:2) ou PE (P-34:1)
714.5066	1.82	X	X	X	X	X	$C_{39}H_{74}NO_8P$	PC (31:2) ou PE (34:2)
716.5231	0.70	X	X	X	X	X	$C_{39}H_{76}NO_8P$	PC (31:1) ou PE (34:1)
724.5313	3.59	X	X	X	X	X	$C_{41}H_{76}NO_7P$	PE (O-36:4) ou PE (P-36:3)
726.5428	2.06	X		X	X	X	$C_{41}H_{78}NO_7P$	PE (O-36:3) ou PE (P-36:4) ou PC (P-33:2)
740.5231	0.68	X	X	X	X	X	$C_{41}H_{76}NO_8P$	PC (33:3) ou PE (36:3)
742.5389	0.40	X	X	X	X	X	$C_{41}H_{78}NO_8P$	PC (33:2) ou PE (36:2)
746.5099	4.15	X		X	X	X	$C_{43}H_{74}NO_7P$	PE (P-38:6)
748.5255	4.28	X	X	X	X	X	$C_{43}H_{76}NO_7P$	PE (P-38:5) ou PE (O-38:6)
758.4990	1.58	X				X	$C_{40}H_{74}NO_{10}P$	PS(34:2)
760.5124	1.31	X		X		X	$C_{40}H_{76}NO_{10}P$	PS(34:1)
771.5170	0.39	X	X	X	X	X	$C_{42}H_{77}O_{10}P$	PG(36:3)
773.5328	1.29	X	X	X	X	X	$C_{42}H_{79}O_{10}P$	PG(36:2)
786.5286	0.64	X	X	X	X	X	$C_{42}H_{78}NO_{10}P$	PS(36:2)
788.5438	1.14	X	X	X	X	X	$C_{42}H_{80}NO_{10}P$	PS(36:1)
802.5594	1.25	X		X	X	X	$C_{43}H_{82}NO_{10}P$	PS(37:1)
804.5794	4.23	X		X	X	X	$C_{43}H_{84}NO_{10}P$	PS(37:0)
810.5280	1.36	X	X	X	X	X	$C_{47}H_{78}NO_{10}P$	PS(38:4)
812.5440	0.86	X	X	X	X	X	$C_{47}H_{80}NO_{10}P$	PS(38:3)
834.5262	3.48	X	X	X	X	X	$C_{46}H_{78}NO_{10}P$	PS(40:6)
836.5432	1.79	X	X	X	X	X	$C_{46}H_{80}NO_{10}P$	PS(40:5)
838.5601	0.36	X	X	X	X	X	$C_{46}H_{82}NO_{10}P$	PS(40:4)
861.5500	0.12	X	X	X	X	X	$C_{45}H_{83}O_{13}P$	PI(36:2)
863.5651	0.46	X	X	X	X	X	$C_{45}H_{85}O_{13}P$	PI(36:1)

LB – Luminal B; LA – Luminal A; CDIS – Carcinoma ductal *in situ*; HER2 - Human Epidermal Growth Factor Receptor 2; TN – Triplo Negativ



Fonte: <http://lipidmaps.org/>

Figura 19 - Espectro de massas obtidos nas análises de DESI MSI, modo negativo. Faixa de m/z de 758 – 762 para um pixel da região tumoral da amostra A2 e simulação das distribuições isotópicas para as moléculas PS (34:2) e PS (34:1) deprotonadas. (DESI MSI - Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging; PS, phosphatidylserine).

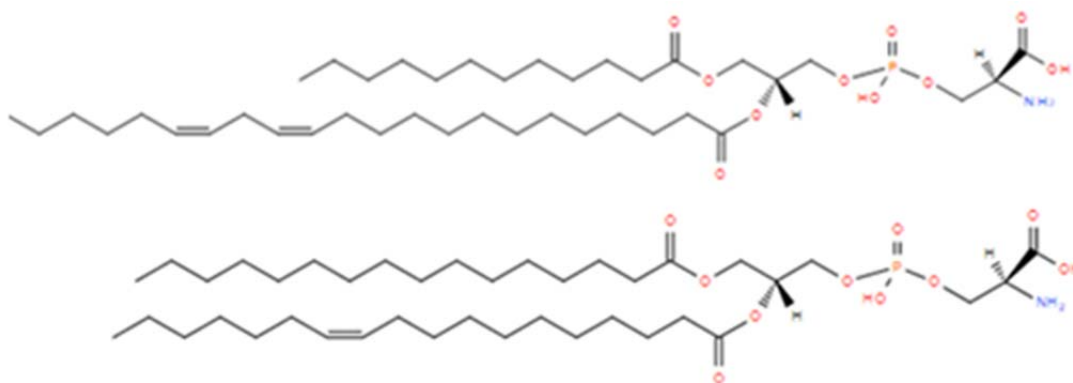


Figura 20 - Possíveis estruturas para os íons de m/z 758.4967 PS (34:2) e 760.5132 PS(34:1).

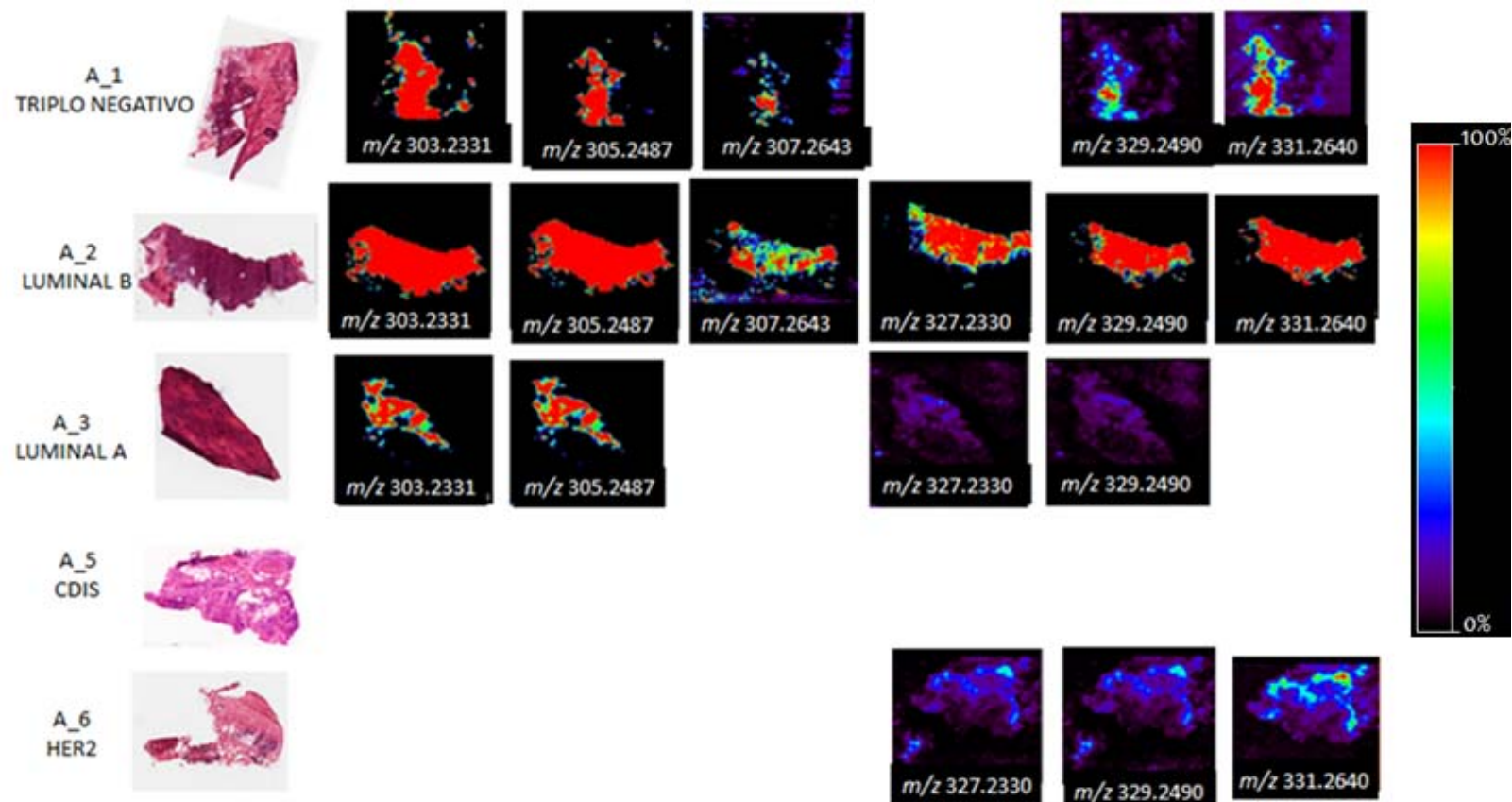


Figura 21 - Imagens moleculares 2D representando uma possível redução no grau de insaturação em ácidos graxos e eicosanoides para os diferentes subtipos tumorais estudados.

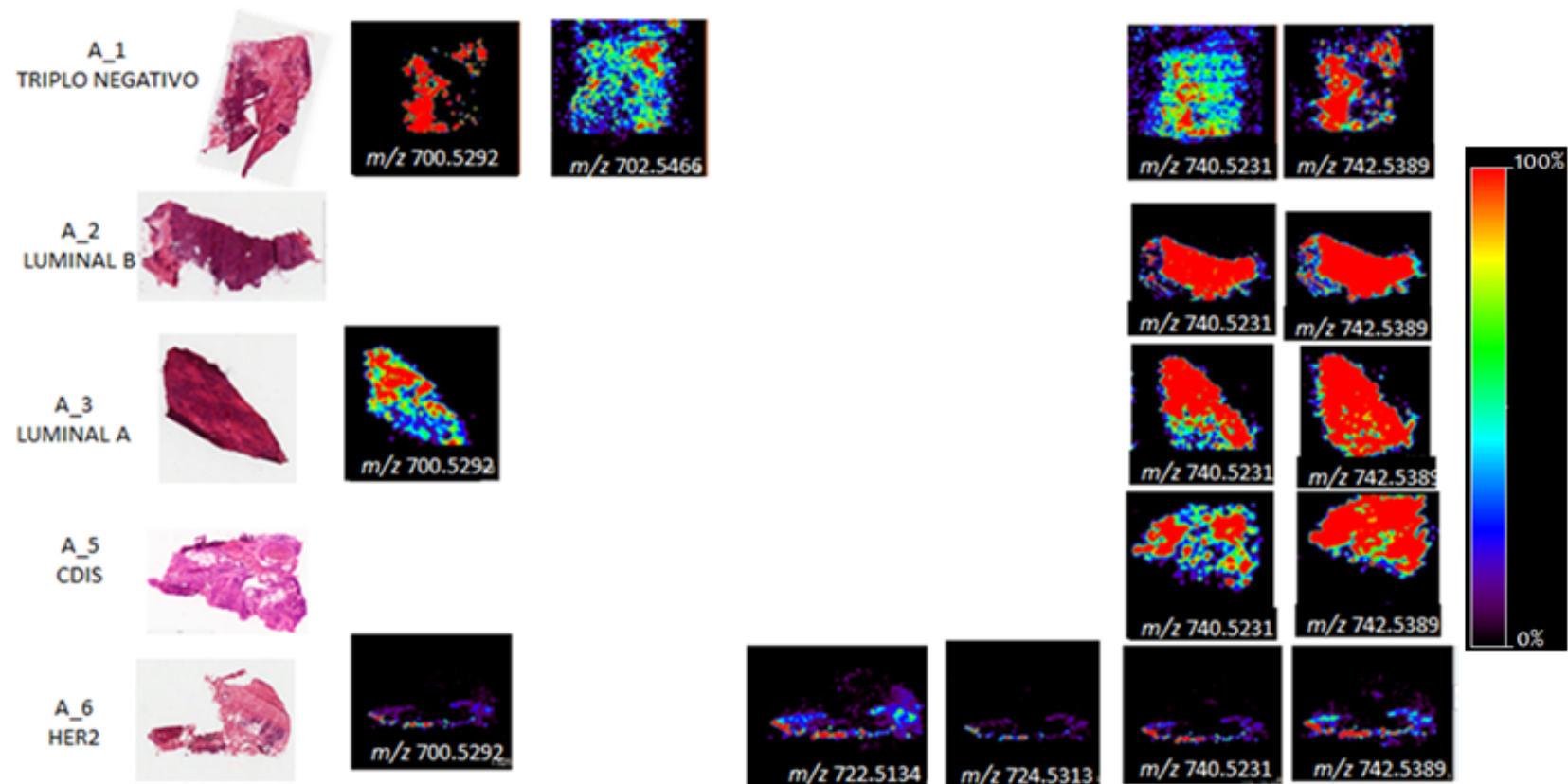


Figura 22 - Imagens moleculares 2D representando uma possível redução no grau de insaturação em glicerofosfolipídeos (PC-*Phosphatidylcholine*, e PE-*phosphatidylethanolamine*) para os diferentes subtipos tumorais estudados.

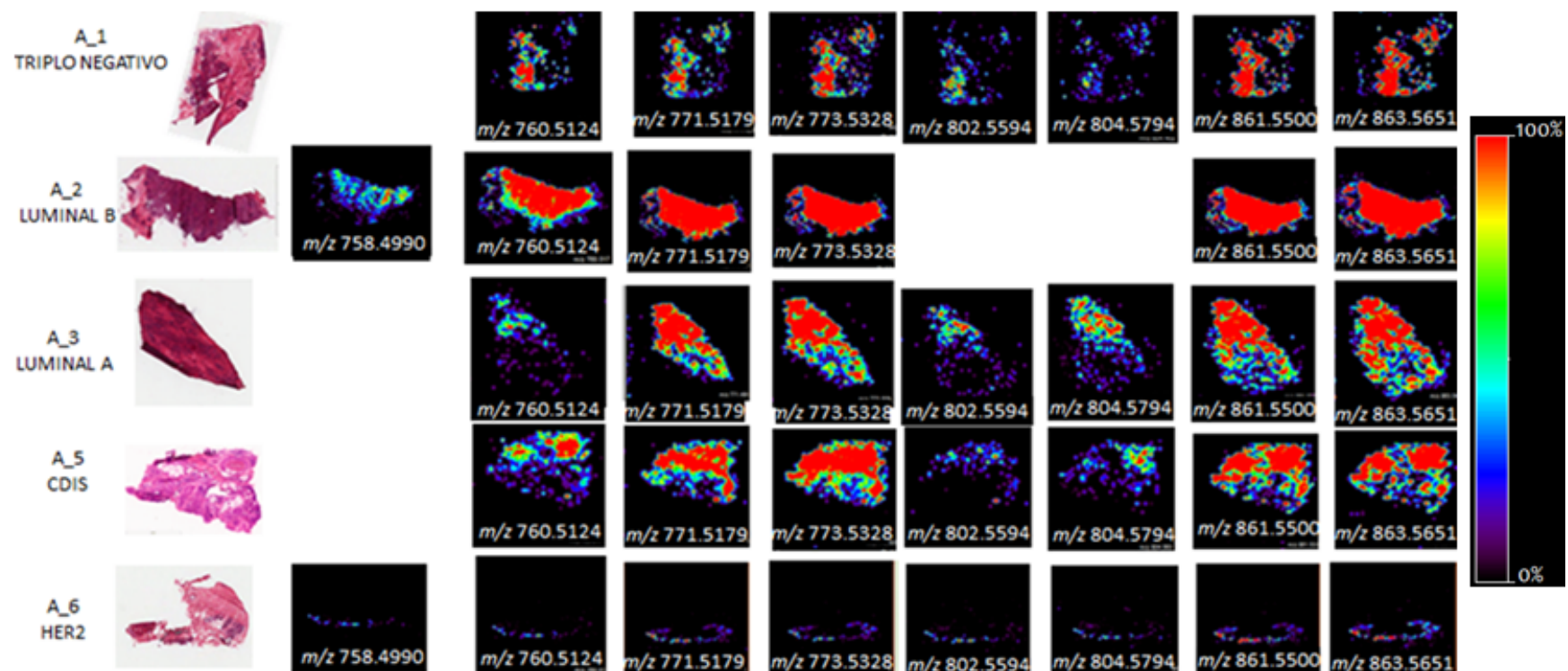


Figura 23 - Imagens moleculares 2D representando uma possível redução no grau de insaturação em glicerofosfolídeos (PS – Phosphatidylserine, PI –Phosphatidylinositol e PG - Phosphatidylglycerol) para os diferentes subtipos tumorais estudados.

Uma das moléculas que apresentou variação no grau de insaturação foi o ácido docosahexaenoico, DHA, (íon de m/z 327,2330), um ácido graxo polinsaturados que está envolvido na formação de radicais livres em resposta ao stress oxidativo (NORTH et al. 1994) ativação transcricional de genes (JUMP et al. 1996) e prevenção de apoptose (ROTSTEIN et al. 1997). A variação do grau de insaturação na molécula indica alterações nas suas funções.

Possíveis reduções nos graus de insaturação também foram encontradas em glicerofosfolipídeos, principais componentes das membranas biológicas (Figura 7). As propriedades da membrana biológica são essenciais para a funcionalidade das organelas de membrana, incluindo a mitocôndria e o retículo endoplasmático. Alterações nos níveis de insaturação de glicerofosfolipídeos alteram essas propriedades e afetam muitos aspectos da funcionalidade celular.

Tem sido reportado que em células tumorais o transporte de lipídios na lipogênese *de novo* leva a uma diminuição nos graus de insaturação dos lipídios de membrana, resultando em uma maior concentração de fosfolípídeos saturados e monoinsaturados nas membranas e conferindo uma proteção extra contra danos oxidativos pela redução da peroxidação lipídica (RYSMAN et al. 2010). A redução nos graus de insaturação dos ácidos graxos também é associada com a redução da fluidez da membrana e tem sido relacionado à agressividade de câncer de mama, o que sugere que a redução da fluidez da membrana é uma característica da doença avançada (HILVO et al. 2011).

A análise detalhada dos espectros de massas mostra também alguns pares de picos que apresentam pequenas diferenças de m/z sendo que cada um desses íons apresentam-se concentrados em diferentes regiões dos tecidos (Figura 24). Nesse caso temos picos com diferença de 0.11 unidades de m/z sendo que suas imagens mostram-se complementares, ou seja, o íon de m/z 722.6285 (não encontrado nos bancos de dados) apresenta maior concentração no tecido normal, enquanto que o íon de m/z 722.5131 (identificado como PE (36:0), Tabela 3) apresenta maior concentração na região do tumor. Para obter informações adicionais para o íon de m/z 722.6285 é necessário fazer análises de MS/MS, pois apesar do analisador de massas orbitrap nos fornecer alta resolução e permitir a observação da existência dessas moléculas, não encontramos referências que nos orientem sobre sua composição.

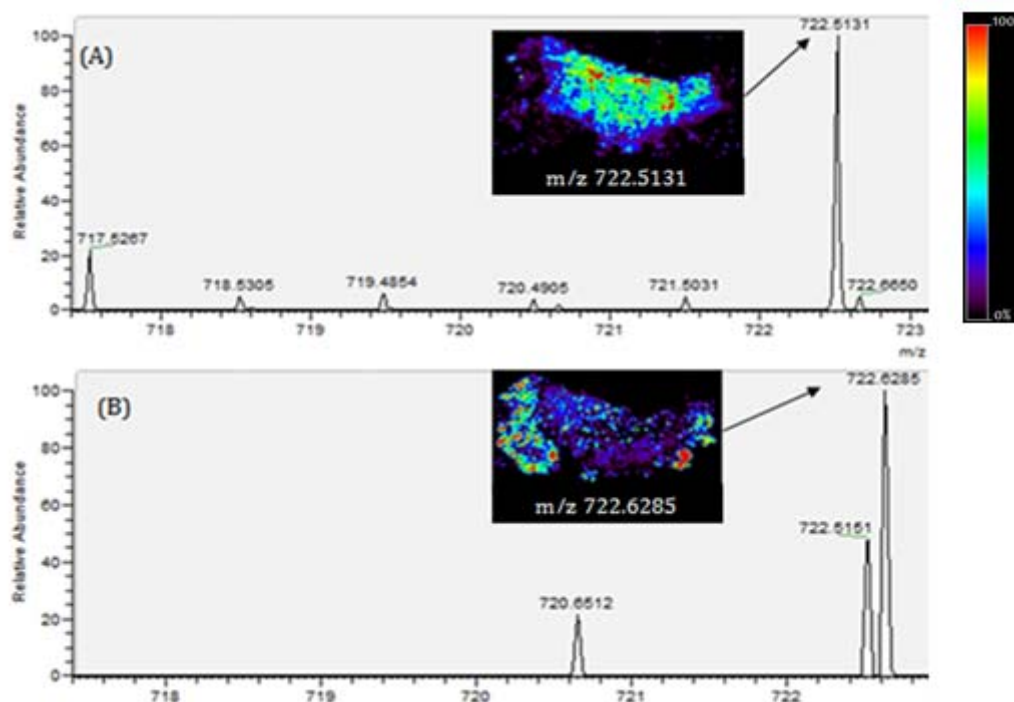


Figura 24 - Espectros de massas obtidos por DESI MSI, modo negativo, de um pixel da região tumoral da amostra A2 e de um pixel da região de tecido normal da amostra A2, respectivamente. (DESI MSI - *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

A Figura 25 apresenta outros exemplos onde pequenas diferenças de massas estão presentes, e para cada valor de m/z temos uma imagem molecular característica. Efetuando a busca nos bancos de dados para os íons de m/z 724.4769, 724.5240, 724.6475 e 724.9847 encontramos possíveis estruturas apenas para o íon de m/z de 724.5240 (PE (P-36:3) ou PE (O 36:4)) porém para os outros valores de m/z não encontramos nenhum resultado. As diferenças de massas encontradas entre esses 4 picos (0.05; 0.12; 0.34) são encontradas também nos picos de m/z de 722.5131; 722.5631; 722.6831; 723.0231 e 726.5472; 726.5972; 726.7172 e 727.0572, em todos os subtipos tumorais. Considerando os três grupos de íons

descritos acima (722.5131; 724.5240 e 726.5472) também é possível sugerir a diminuição do grau de insaturação das moléculas já que os valores de m/z apresentam diferenças que podem representar o aumento de número de hidrogênios conforme diminui o grau de insaturação. A confirmação dessa hipótese, assim como a identificação dos quatro íons observados em cada um desses grupos, só pode ser feita por análises adicionais como MS/MS.

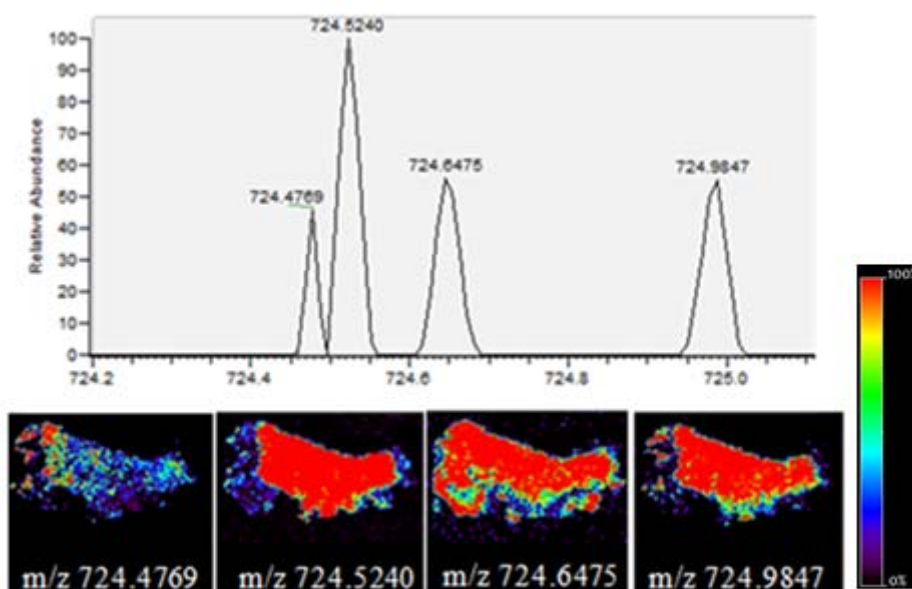


Figura 25 - Espectros de massas obtidos por DESI MSI, modo negativo, de um pixel da região tumoral da amostra A2 e imagens moleculares 2D correspondentes para os íons de m/z : 724.4769; 724.5240; 724.6475; 724.9847. (DESI MSI - *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

4.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As informações contidas nas imagens moleculares 2D também foram analisadas estatisticamente, uma vez que a quantidade de informação presente é enorme e selecionar os íons capazes de diferenciar as amostras em subtipos, ou mesmo diferenciar tumor de tecido normal, baseando-se apenas nas análises de imagem é praticamente impossível. A análise de PCA descreveu 83.1% da variância com 3 componentes, sendo 52.1% da variância total descrita pela componente principal 1 (PC1), 23.3% descrita pela componente principal 2 (PC2) e 7.7% descrita pela componente principal 3 (PC3) (Figura 26).

As amostras do subtipo luminal B são as que apresentam maior complexidade e concentração lipídica, principalmente para íons de m/z maiores que 500. Além de ser um grupo diferenciado dos demais, as amostras do subtipo luminal B apresentam uma grande diversidade dentro do próprio grupo, e se encontram dispersas por toda a PC1. Para os demais subtipos tumorais a análise de PCA não indicou nenhuma diferença significativa. As componentes principais PC2 e PC3 não apresentam potencial para separar as amostras em grupos.

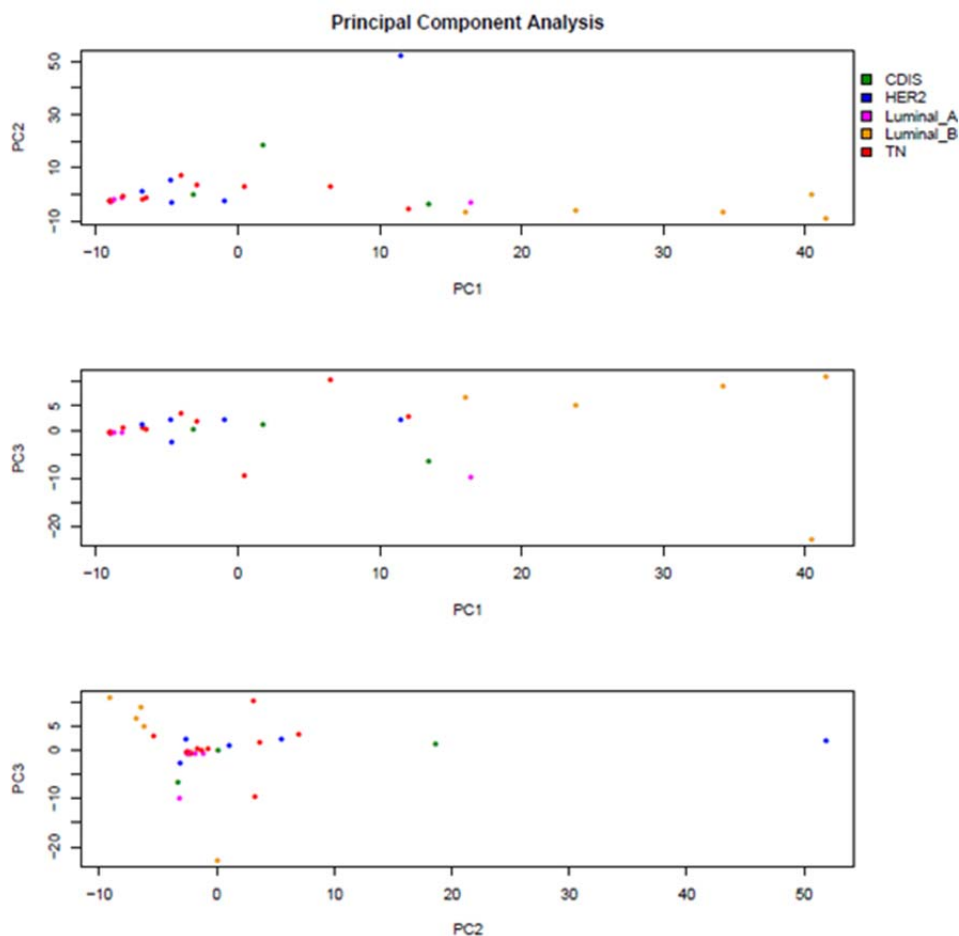


Figura 26 - Análise de PCA de dados de DESI-MSI (*Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*) para os 42 casos analisados. Gráficos de *scores* para as três principais componentes (PC1 – PC3) para as amostras dos cinco subtipos analisados (CDIS – carcinoma ductal *in situ*, TN – triplo Negativo).

Os resultados obtidos pelo método Lasso, usado para selecionar os íons capazes de diferenciar os seguintes grupos: Tumor vs. Normal, CMI vs CDIS, Subtipos Tumoraes (Luminal A, Luminal B, Triplo Negativo e HER2), Triplo Negativo vs demais CMI, estão resumidos nas Tabelas de 6 a 8.

Tabela 6 - Íons selecionados pelo método Lasso e seus respectivos pesos estatísticos em cada subtipo tumoral para as comparações: (a) Tumor vs Normal; (b) Carcinoma Mamário Invasivo (CMI) vs Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS).

(a)		(b)	
Tumor vs Normal		CMI vs CDIS	
<i>m/z</i>	Tumor	<i>m/z</i>	CI
146.0454	0.097	341.2100	-0.208
157.0113	-0.035	382.3736	-0.079
175.0241	0.188	746.5110	-0.047
176.0060	0.119	812.5440	-0.046
187.0065	-0.276		
248.9286	-0.037		
269.0650	-0.035		
304.2150	0.061		
313.0440	-0.065		
323.2500	-0.003		
334.2610	0.022		
357.2804	0.200		
509.4568	-0.023		
600.5160	-0.002		
626.5370	0.062		
679.5084	-0.025		
767.5330	0.012		
788.5438	0.059		

Tabela 7 - Íons selecionados pelo método Lasso e seus respectivos pesos estatísticos em cada subtipo tumoral, considerando todos os subtipos: Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS), HER2, Luminal A, Luminal B e Triplo Negativo (TN).

<i>m/z</i>	CDIS	HER2	Luminal_A	Luminal_B	TN
107.8889			-0.042		
146.9820					-0.633
175.0241					0.032
278.1970			-0.012		
279.1641			0.044		
341.2100	0.092				
359.2954		0.153			
382.3736	0.052				
656.5800			0.001		
746.5099	0.003				
751.4592					-0.011
765.5190			-0.043		
861.5500				0.133	

Tabela 8 - Íons selecionados pelo método Lasso e seus respectivos pesos estatísticos considerando a comparação entre os tumores do tipo Triplo Negativo (TN) com os demais tipos de tumores invasivos.

TN vs <i>DEMAIS</i> CMI	
<i>m/z</i>	TN
146.982	-0.786
175.0241	0.158
328.2180	-0.008
386.9680	0.022
751.4592	-0.031

4.2.1 Modelo Lasso: Tumor VS. Normal

18 íons foram selecionados (Tabela 6a) sendo que 3 são provenientes de xenobióticos (mais concentrados em regiões de tecido normal, resultado que coincide com os dados das imagens moleculares 2D), 4 de metabólitos (mais concentrados no tumor, todos na forma reduzida) e 11 de lipídios.

Os íons provenientes de xenobióticos incluem metais de transição (*m/z* 187.0065) e organoclorados (*m/z* 248.9286). Organoclorados são moléculas capazes de se acumularem em tecidos humanos (ENNACEUR et al. 2008; RÖLLIN et al. 2009; FREDRICKS et al. 2009) e são agentes hormonalmente ativos, o que atribui um importante papel no desenvolvimento de tumores de mama (ANAND et al. 2013). No estudo feito por ANAND et al. em 2013 foi demonstrado que a exposição à organoclorados pode causar o desenvolvimento de câncer de mama com positividade para receptor de estrógeno.

Ácido glutâmico (*m/z* de 146.0454) e ácido ascórbico (*m/z* de 175.0241) também foram selecionadas pelo modelo como moléculas

características de regiões tumorais o que vai de acordo com dados disponíveis na literatura (EBERLIN et al. 2014; BANERJEE et al. 2017) e com os dados obtidos pelas análises de imagens.

O ácido ascórbico é descrito em maiores concentrações em tecidos tumorais há muito tempo, desde a década de 70 existem experimentos descrevendo a ação bioquímica de ácido ascórbico em câncer (CAMERON et al. 1979). A revisão publicada em 1979 por CAMERON et al. descreve diversas dessas funções que incluem participação na síntese de colágeno e inibição da glicosidase lisossomal responsável pela metástase. Trabalhos mais recentes sugerem que além de ser obtido pela alimentação, o ácido ascórbico poderia ser utilizado por via intravenosa, sendo que dessa forma passaria pelo fino controle do intestino e excreção renal e poderia atuar em células tumorais através de uma cascata oxidativa, a qual teria pouco efeito em células normais (RIORDAN et al. 2005).

Moléculas de eicosanóides foram selecionadas como características de regiões tumorais. Essa classe de lipídios relaciona-se às respostas pró-inflamatória e sua maior concentração é característica em muitas doenças incluindo doenças cardiovasculares, gastrointestinal e renal (KHANAPURE et al. 2007). Moléculas de fosfolípidos, como glicerofosfoserina PS (36:1), também foram selecionadas pelo modelo. As glicerofosfoserinas são moléculas que estão envolvidas na composição da membrana biológica assim como em mecanismos apoptóticos (Figura 7).

Para alguns íons selecionados pelo modelo a busca nos bancos de dados não retornou resultado e para outros a busca resultou em mais de

uma categoria possível para a fórmula proposta. Para a caracterização exata dessas moléculas são necessárias análises de MS/MS.

4.2.2 Modelo Lasso: CMI vs. CDIS

As classes de eicosanóides e glicerofosfolipídeos foram capazes de diferenciar CMI de CDIS. Quatro íons foram selecionados pelo método, sendo que todos encontram-se mais concentrados em CDIS. Um dos íons de glicerofosfolipídeos selecionado foi o de m/z 746.5110, classificado como glicerofosfoetanolamina (PE (P-16:0/22:6), classe de moléculas que está envolvida em diversos processos bioquímicos como sinalização celular, fonte e armazenamento de energia e composição da membrana. Uma molécula de fosfatidilserina (PS (38:3), íon de m/z 812.544) também foi selecionada pelo modelo. Essa molécula foi previamente observada nas imagens moleculares 2D (Figura 12) por diferenciar os ductos que contêm células de CDIS.

As glicerofosfoserinas caracterizam-se como o fosfolipídio aniônico mais abundante nas células, sendo que quando as células estão em condições normais as moléculas de PS se localizam no interior da membrana plasmática (e de outras membranas celulares), porém durante a ativação de plaquetas e apoptose celular ocorre um desequilíbrio e a PS passa para a superfície de linfócitos apoptóticos contribuindo para a fagocitose pela ativação de macrófagos (FADOK et al. 1992). A exposição de PS na superfície celular é uma característica clássica de células apoptóticas e agem como um sinal “eat me” permitindo a fagocitose de

corpos pós apoptóticos (MARÍÑO e KROEMER 2013). Os mecanismos de reconhecimento e remoção de células apoptóticas são de importância fisiológica crítica para respostas inflamatórias e doenças autoimunes (SCHLEGEL et al. 2001). O câncer é uma doença caracterizada pela baixa eficiência de processos apoptóticos (WONG RS 2011) sendo assim as diferenças nas concentrações de PS em diferentes regiões dos tecidos podem estar relacionadas ao processo de invasão ou reconhecimento antigênico no tumor invasivo.

4.2.3 Modelo Lasso: Todos os subtipos

13 íons foram selecionados incluindo ácidos graxos, eicosanoides e glicerofosfolídeos. Os ácidos linolênico (C 18:3) e linoleico (C 18:2) foram selecionados por apresentarem maior concentração no subtipo Luminal A, sendo que o modelo indica que o ácido linoleico (ácido com menor grau de insaturação) é o mais concentrado nas regiões tumorais. O ácido ascórbico foi selecionado por ser mais concentrado em tecidos tumorais do subtipo triplo negativo enquanto que eicosanoides e glicerofosfolídeos apresentam maior concentração em CDIS. O íon de m/z 359.2954 apresenta maior concentração em tumores do subtipo HER2, porém quando submetido às buscas recebe como fórmula proposta $C_{24}H_{39}O_2$ o que possibilita que possua até seis tipos de estruturas diferentes, como ácidos graxos insaturados e esteroides.

A categoria lipídica de glicerofosfolídeos é a que apresenta maior importância para o modelo e é representada por 5 moléculas que incluem:

fosfatidiletanolamina (íon de m/z 746.5110 - PE (P-16:0/22:6)) característica do subtipo CDIS; o íon de m/z 751.4592, pertencente à classe de diacilglicerofosfoglicerol, característico de tumores do subtipo triplo negativo; e o íon de m/z 861.550, (fosfatidilinositol, PI (36:2)) característico de tumores do subtipo Luminal B.

4.2.4 TN vs. Demais CMIs

Dos 5 íons selecionados pelo modelo o ácido ascórbico reafirmou sua maior concentração nos tumores triplos negativos enquanto que ácidos graxos insaturados e glicerofosfolipídeos foram selecionados por apresentarem maiores concentrações nos outros subtipos tumorais. Um dos ácidos graxos insaturados selecionado foi o ácido docosahexaenóico (DHA, deprotonado apresenta m/z de 327.2330) o qual está envolvido na formação de radicais livres em resposta ao stress oxidativo (NORTH et al. 1994), e também esta associado a prevenção de apoptose (ROTSTEIN et al. 1997). Da categoria dos glicerofosfolipídeos o íon de m/z 751.4592 (diacilglicerofosfoglicerol - PG (35:6)) foi selecionado, categoria lipídica com importante função como mensageiros secundários.

4.3 VANTAGENS E LIMITAÇÕES DA TÉCNICA DE DESI MSI NAS ANÁLISES DE TUMORES DE MAMA DE DIFERENTES SUBTIPOS MOLECULARES

A técnica DESI MSI apresenta a grande vantagem de não necessitar de vácuo e não exigir preparo de amostra. Isso viabiliza sua utilização para análises *in situ* de tecidos e possibilita que as informações topográficas sejam correlacionadas com análises de imuno-histoquímica. Além disso, os consumíveis para as análises são baratos e a técnica pode ser aplicada de forma rápida. As análises de DESI-MSI com o analisador do tipo orbitrap apresentam resultados de alta resolução.

A maior dificuldade encontrada na utilização da técnica acontece na etapa de tratamento dos dados. A quantidade de informação para cada amostra é muito grande e foi necessário a utilização de pelo menos 3 softwares diferentes, o estudo das imagens moleculares 2D exige uma intensa análise visual e tratamento de dados com ferramentas bioinformáticas evoluídas.

A diversidade biológica dos diferentes subtipos tumorais também é um grande desafio, ainda assim padrões de perfil lipídico foram obtidos para tecidos tumorais (CDIS e CMI) e normais e para os diferentes subtipos analisados. Um padrão no grau de saturação das moléculas ficou evidente entre tumor e normal e isso pode representar um mecanismo importante na tumorigênese.

De forma geral, as informações contidas em apenas algumas análises feitas por DESI MSI são bastante complexas e precisam ser estudadas em profundidade. A técnica já vem sendo utilizada para diferenciar tecido tumoral de tecido normal em tempo real durante cirurgias. Adicionalmente apresenta grande utilidade na compreensão de metabolismos envolvidos na doença e pode auxiliar na busca de novos biomarcadores.

5 CONCLUSÃO

Até onde sabemos este é o primeiro estudo que apresenta a distribuição topográfica de lipídios e metabólitos para regiões de tecidos normais, tecidos contendo CDIS e tumores invasivos de diferentes subtipos moleculares de câncer de mama e permite observar que em nível lipidômico o câncer de mama também é um grupo heterogêneo de tumores com perfis característicos em diferentes subtipos moleculares. Adicionalmente os resultados indicam que lipídios com menor grau de insaturação são mais concentrados em regiões tumorais, se essa hipótese for confirmada pode representar mecanismos importantes na tumorigênese uma vez que as diferenças foram encontradas tanto em lipídios constituintes das membranas biológicas como em lipídios que apresentam papéis de mensageiros secundários em vias de sinalização. Descrever a heterogeneidade lipídica e metabólica em diferentes subtipos de tumores de mama pode ajudar na compreensão do desenvolvimento e progresso da doença com potencial de novas vias a serem utilizadas a fim de beneficiar os pacientes.

Vários íons delimitaram as regiões de interesse (CDIS e invasivo) e possibilitaram a diferenciação entre tumor e normal. Alguns íons são bem característicos e estão sempre presentes, como é o caso do íon 303.2330 para os tecidos tumorais e o íon 187.0065 para os tecidos normais.

As amostras do subtipo luminal B apresentam uma diversidade e uma concentração lipídica bem maior que os demais subtipos, enquanto as amostras do subtipo HER2 são as que possuem menor concentração e

diversidade lipídica. As principais categorias lipídicas presentes nos subtipos tumorais estudados são os glicerofosfolídeos e os ácidos graxos insaturados, incluindo os eicosanóides, sendo que os tecidos tumorais apresentaram uma tendência em acumular ácidos graxos com menor número de insaturações.

O modelo Lasso gerado para diferenciar tecido normal de carcinoma mamário invasivo selecionou 18 íons, sendo que xenobióticos, metabólitos, ácidos graxos polinsaturados e glicerofosfolídeos apresentaram importância para o modelo. Pelas análises estatísticas foi possível diferenciar perfil lipídico de CDIS e CMI utilizando 4 valores de m/z onde uma das moléculas selecionadas foi proveniente de glicerofosfoserinas, classe de moléculas diretamente envolvida em processos apoptóticos. Isso evidencia a possibilidade de utilizar a técnica de DESI-MSI para observar moléculas diretamente envolvidas em determinados mecanismos biológicos atuantes em diferentes tipos de tecidos. Os 4 subtipos tumorais também foram diferenciados segundo sua composição lipídica, sendo que 13 íons foram selecionados pelo modelo estatístico.

A técnica de DESI MSI possibilitou a observação de moléculas em diferentes estados de oxidação, indicando a presença de ROS nos diferentes subtipos de câncer de mama analisados. Informações sobre a localização dessas alterações nos tecidos, com uma resolução de $\sim 200\ \mu\text{m}$, foram obtidas e possibilitam um estudo mais aprofundado do metabolismo lipídico e das respostas geradas pelo organismo frente à presença das ROS no câncer.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abba MC, Sun H, Hawkins KA, et al. Breast cancer molecular signatures as determined by SAGE: correlation with lymph node status. **Mol Cancer Res** 2007; 5 881-90.

Alexandrov T, Becker M, Guntinas-Lichius O, Ernst G, von Eggeling F. MALDI-imaging segmentation is a powerful tool for spatial functional proteomic analysis of human larynx carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol** 2013; 39:85-95.

Anand M, Singh J, Siddiqui M K J, Taneja A, Patel DK, Mehrotra PK. Organochlorine pesticides in the females suffering from breast cancer and its relation to estrogen receptor status. **J Drug Metabol Toxicol** 2013; 4:1-6.

Alfarouk KO, Muddathir AK, Shayoub ME. Tumor acidity as evolutionary spite. **Cancers (Basel)** 2011; 3:408-14.

Alfarouk KO, Verduzco D, Rauch C, et al. Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination a new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question. **Oncoscience** 2014; 1:777-802.

Alfarouk KO. Tumor metabolism, cancer cell transporters, and microenvironmental resistance. **J Enzyme Inhib Med Chem** 2016; 8:59-66.

Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. **Nat Rev Cancer** 2016; 16:749.

Baenke F, Peck B, Miess H, Schulze A. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. **Dis Model Mech** 2013; 6:1353-63.

Balluff B, Rauser S, Meding S, et al. MALDI imaging identifies prognostic seven-protein signature of novel tissue markers in intestinal-type gastric cancer. **Am J Pathol** 2011; 179:2720-9.

Banerjee S, Zare RN, Tibshirani RJ, et al. Diagnosis of prostate cancer by desorption electrospray ionization mass spectrometric imaging of small metabolites and lipids. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2017; 114:3334-9.

Benoit SL, Miller EF, Maier RJ. Helicobacter pylori stores nickel to aid its host colonization. **Infect Immun** 2013; 81:580-4.

Bereman MS, Muddiman DC. Detection of attomole amounts of analyte by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS) determined using fluorescence spectroscopy. **J Am Soc Mass Spectrom** 2007; 18:1093-6.

Bombonati A, Sgroi DC. The molecular pathology of breast cancer progression. **J Pathol** 2011; 223:307-17.

Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? **J Clin Oncol** 2005; 29:7350-60.

Budunova IV, Carbajal S, Slaga TJ. Effect of diverse tumor promoters on the expression of gap-junctional proteins connexin (Cx)26, Cx311, and Cx43 in SENCAR mouse epidermis. **Mol Carcinog** 1996; 15:202-14.

Buerger H, Otterbach F, Simon R, et al. Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways. **J Pathol** 1999; 187:396-402.

Buitrago F, Uemura G, Sena MCF. Fatores prognósticos em câncer de mama. **Com Ciências Saúde** 2011; 22(supl 1):S69-S82.

Calligaris D, Caragacianu D, Liu X, et al. Application of desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging in breast cancer margin analysis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2014; 111:15184-9.

Cameron E, Pauling L, Leibovitz B. Ascorbic acid and cancer: a review. **Cancer Res** 1979; 39:663-81.

Carraro DM, Elias EV, Andrade VP. Ductal carcinoma in situ of the breast: morphological and molecular features implicated in progression. **Biosci Rep** 2014; 34(1).

Casadonte R, Caprioli RM. Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue by MALDI imaging mass spectrometry. **Nat Protoc** 2011; 6:1695-709.

Castro NP, Osório CA, Torres C, et al. Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma. **Breast Cancer Res** 2008; 10:R87.

Chen H, Cotte-Rodríguez I, Cooks RG. cis-Diol functional group recognition by reactive desorption electrospray ionization (DESI). **Chem Commun (Camb)** 2006; (6):597-9.

Chen J, Zhang X, Cao R, et al. Serum 27-nor-5 β -cholestane-3,7,12,24,25 pentol glucuronide discovered by metabolomics as potential diagnostic biomarker for epithelium ovarian cancer. **J Proteome Res** 2011; 10:2625-32.

Chen W, Zu Y, Huang Q, et al. Study on metabonomic characteristics of human lung cancer using high resolution magic-angle spinning ^1H NMR spectroscopy and multivariate data analysis. **Magn Reson Med** 2011; 66:1531-40.

Chen Y, Zhang R, Song Y, et al. RRLC-MS/MS-based metabonomics combined with in-depth analysis of metabolic correlation network: finding potential biomarkers for breast cancer. **Analyst** 2009; 134:2003-11.

Chen MK, Espat NJ, Bland KI, Copeland EM, III, Souba WW. Influence of progressive tumor growth on glutamine metabolism in skeletal muscle and kidney. **Ann Surg** 1993; 217:655-66, discussion 666-7.

Christians U, Klawitter J, Hornberger A, Klawitter J. How unbiased is non-targeted metabolomics and is targeted pathway screening the solution? **Curr Pharm Biotechnol** 2011; 12:1053-66.

Colditz G, Chia KS. Invasive breast carcinoma: Introduction and general features. In: Lakhani S, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, editors. **WHO classification of tumours of the breast**. 4th ed. Lyon: IARC; 2012. p.14-31. (World Health Organization Classification of Tumours, v.4).

Dai X, Li T, Bai Z, et al. B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **Am J Cancer Res** 2015; 5:2929-43.

Damonte P, Hodgson JG, Chen JQ, Young LJ, Cardiff RD, Borowsky AD. Mammary carcinoma behavior is programmed in the precancer stem cell. **Breast Cancer Res** 2008; 10:R50.

Eberlin LS, Norton I, Dill AL, et al. Classifying human brain tumors by lipid imaging with mass spectrometry. **Cancer Res** 2012; 72:645-54.

Eberlin LS, Tibshirani RJ, Zhang J, et al. Molecular assessment of surgical-resection margins of gastric cancer by mass-spectrometric imaging. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2014; 111:2436-41.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology** 1991; 19:403-10.

Ennaceur S, Gandoura N, Driss MR. Distribution of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human breast milk from various locations in Tunisia: levels of contamination, influencing factors, and infant risk assessment. **Environ Res** 2008; 10:86-93.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J Immunol** 1992; 148:2207-16.

Fahy E, Sud M, Cotter D, Subramaniam S. LIPID MAPS online tools for lipid research. **Nucleic Acids Res** 2007; 35:W606-12.

Fahy E, Subramaniam S, Murphy R, et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. **J Lipid Res** 2009; 50:S9-S14.

Fan C, Oh DS, Wessels L, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. **N Engl J Med** 2006; 355:560-9.

Fan Y, Murphy TB, Byrne JC, et al. Applying random forests to identify biomarker panels in serum 2D-DIGE data for the detection and staging of prostate cancer. **J Proteome Res** 2011; 10:1361-73.

Fisher ER, Anderson S, Tan-Chiu E, Fisher B, Eaton L, Wolmark N. Fifteen-year prognostic iscriminants for invasive breast carcinoma: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol-06. **Cancer** 2001; 91:1679-87.

Fredricks TB, Fedynich AM, Benn S, Ford L. Environmental contaminants in white-winged doves (*Zenaida asiatica asiatica*) from the Lower Rio Grande Valley of Texas, USA. **Arch Environ Contam Toxicol** 2009; 57:387-96.

Frickenschmidt A, Frohlich H, Bullinger D, et al. Metabonomics in cancer diagnosis: mass spectrometry-based profiling of urinary nucleosides from breast cancer patients. **Biomarkers** 2008; 13:435-49.

Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization paths for generalized linear models via coordinate descent. **J Stat Softw** 2010; 33:1-22.

Garcia E, Andrews C, Hua J, et al. Diagnosis of early stage ovarian cancer by ¹H NMR metabonomics of serum explored by use of a microflow NMR probe. **J Proteome Res** 2011; 10:1765-71.

Gaskell SJ. Special feature: tutorial electrospray: principles and practice. **J Mass Spectrom** 1997; 32:677-88.

Green FM, Stokes P, Hopley C, et al. Developing repeatable measurements for reliable analysis of molecules at surfaces using desorption electrospray ionization. **Anal Chem** 2009; 81:2286-93.

Greene FL. The American Joint Committee on Cancer: updating the strategies in cancer staging. **Bull Am Coll Surg** 2002; 87:13-5.

Gurdak E, Green FM, Rakowska PD, et al. VAMAS interlaboratory study for desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI MS) intensity repeatability and constancy. **Anal Chem** 2014; 86:9603-11.

Han X, Gross RW. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. **J Lipid Res** 2003; 44:1071-9.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-674.

Hernández LG, van Steeg H, Luijten M, van Benthem J. Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. **Mutat Res** 2009; 682:94-109.

Hilvo M, Denkert C, Lehtinen L, et al. Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. **Cancer Res** 2011; 71:3236-45.

Jump DB, Clarke SD, Thelen A, et al. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. **Prog Lipid Res** 1996; 35:227-41.

Khanapure SP, Garvey DS, Janero DR, Letts LG. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. **Curr Top Med Chem** 2007; 7:311-40.

Kim JW, Dang CV. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. **Cancer Res** 2006; 66 8927-30.

Klimberg V, McClellan JL. Glutamine, cancer, and its therapy. **Am J Surg** 1996; 172:418-24.

Kwa M, Plottel CS, Blaser MJ, Adams S. The intestinal microbiome and estrogen receptor-positive female breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 2016;108(8).

Lagarde M, G  lo  n A, Record M, Vance D, Spener F. Lipidomics is emerging. **Biochim Biophys Acta** 2003; 1634:61.

Lakhani S, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. **WHO Classification of tumours of the breast**. 4th ed. Lyon: IARC; 2012. p.8-9. (World Health Organization Classification of Tumours, v.4).

Laskin J, Heath BS, Roach PJ, Cazares L, Semmes OJ. Tissue imaging using nanospray desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Anal Chem** 2012; 84:141-8.

Lv W, Yang T. Identification of possible biomarkers for breast cancer from free fatty acid profiles determined by GC-MS and multivariate statistical analysis. **Clin Biochem** 2012; 45:127-33.

Mari  o G, Kroemer G. Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. **Cell Res** 2013; 23:1247-8.

Martindale D. A large look at lipids-major grant will fund team effort to characterize human lipidome. **Scientist** 2003; 17:15.

Medes G, Thomas A, Weinhouse S. Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. **Cancer Res** 1953; 13:27-9.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de C  ncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2016: incidência de c  ncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

Morad SA, Cabot MC. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. **Nat Rev Cancer** 2013; 13:51-65.

Nam H, Chung BC, Kim Y, Lee K, Lee D. Combining tissue transcriptomics and urine metabolomics for breast cancer biomarker identification. **Bioinformatics** 2009; 25:3151-7.

Nefliu M, Smith JN, Venter A, Cooks RG. Internal energy distributions in desorption electrospray ionization (DESI). **J Am Soc Mass Spectrom** 2008; 19:420-7.

North JA, Spector AA, Buettner GR. Cell fatty acid composition affects free radical formation during lipid peroxidation. **Am J Physiol** 1994; 267:C177-88.

O'Brien KM, Cole SR, Tse CK, et al. Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. **Clin Cancer Res** 2010; 16:6100-10.

Oresic M, Hänninen VA, Vidal-Puig A. Lipidomics: a new window to biomedical frontiers. **Trends Biotechnol** 2008; 26:647-52.

Panieri E, Santoro MM. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. **Cell Death and Disease** 2016; 7(6):e2253.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2000; 406:747-52.

Pike LS, Smift AL, Croteau NJ, Ferrick DA, Wu M. Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. **Biochim Biophys Acta** 2011; 1807:726-34.

Pinder SE, Duggan C, Ellis IO, et al. A new pathological system for grading DCIS with improved prediction of local recurrence: results from the UKCCCR/ANZ DCIS trial. **Br J Cancer** 2010; 103 94-100.

Polyak K. Is breast tumor progression really linear? **Clin Cancer Res** 2008; 14 339-41.

Porter D, Lahti-Domenici J, Keshaviah A, et al. Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. **Mol Cancer Res** 2003; 1:362-75.

Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Mol Oncol** 2011; 5:5-23.

Riordan HD, Casciari JJ, González MJ, et al. A pilot clinical study of continuous intravenous ascorbate in terminal cancer patients. **P R Health Sci J** 2005; 24:269-76.

Röllin HB, Sandanger TM, Hansen L, Channa K, Odland JØ. Concentration of selected persistent organic pollutants in blood from delivering women in South Africa. **Sci Total Environ** 2009; 408:146-52.

Rotstein NP, Aveldaño MI, Barrantes FJ, Roccamo AM, Politi LE. Apoptosis of retinal photoreceptors during development in vitro: protective effect of docosahexaenoic acid. **J Neurochem** 1997; 69:504-13.

Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, et al. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. **Cancer Res** 2010; 70:8117-26.

Salnikow K, Zhitkovich A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. **Chem Res Toxicol** 2008; 21:28-44.

Salvemini D, Riley DP, Cuzzocrea S. SOD mimetics are coming of age. **Nat Rev Drug Discov** 2002; 1:367-74.

Schlegel RA, Williamson P. Phosphatidylserine, a death knell. **Cell Death Differ** 2001; 8:551-63.

Schuetz CS, Bonin M, Clare SE, et al. Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. **Cancer Res** 2006; 66:5278-86.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. **CA Cancer J Clin** 2013; 63:11-30.

Sitter B, Lundgren S, Bathen TF, et al. Comparison of HR MAS MR spectroscopic profiles of breast cancer tissue with clinical parameters. **NMR Biomed** 2006; 19:30-40.

Smigal C, Jemal A, Ward E, et al. Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. **CA Cancer J Clin** 2006; 56:168-83.

Soerjomataram I, Louwman MW, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2008; 107:309-30.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:10869-74.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:8418-23.

Szachowicz-Petelska B, Sulkowski S, Figaszewski ZA. Altered membrane free unsaturated fatty acid composition in human colorectal cancer tissue. **Mol Cell Biochem** 2007; 294:237-42.

Tiezzi DG. [Epidemiology of breast cancer]. **Rev Bras Ginecol Obstet** 2009; 31:213-5.

Vanhaesebroeck B, Leeyers S J, Ahmadi K, et al. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. **Ann Rev Biochem** 2001; 70:535-602.

Vargas AC, McCart Reed AE, Waddell N, et al. Gene expression profiling of tumour epithelial and stromal compartments during breast cancer progression. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 135:153-65.

Vogel VG. Epidemiology, genetics, and risk evaluation of postmenopausal women at risk of breast cancer. **Menopause** 2008; 15 782-9.

Warwick J, Tabàr L, Vitak B, Duffy SW. Time-dependent effects on survival in breast carcinoma: results of 20 years of follow-up from the Swedish Two-County Study. **Cancer** 2004; 100:1331-6.

Wellings SR, Jensen HM. On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. **J Natl Cancer Inst** 1973; 50:1111-8.

Wong E. Breast anatomy and histology. **Clin Obstet Gynecol** 2011; 54 91-5.

Wong H, Lau S, Yau T, Cheung P, Epstein RJ. Presence of an in situ component is associated with reduced biological aggressiveness of size-matched invasive breast cancer. **Br J Cancer** 2010; 102 1391-6.

Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **J Exp Clin Cancer Res** 2011; 30:87.

Wu ZJ, Meyer CA, Choudhury S, et al. Gene expression profiling of human breast tissue samples using SAGE-Seq. **Genome Res** 2010; 20 1730-9.

Wymann M P, Schneiter R. Lipid signalling in disease. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2008; 9:162-76.

Yang J, Tan Q, Fu Q, et al. Gastrointestinal microbiome and breast cancer: correlations, mechanisms and potential clinical implications. **Breast Cancer** 2017; 24:220-8.

Yeh CC, Hou MF, Tsai SM, et al. Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. **Clin Chim Acta** 2005; 361:104-11.

Yu KD, Shen ZZ, Shao ZM. The immunohistochemically “ER-negative, PR-negative, HER2-negative, CK5/6-negative, and HER1-negative” subgroup is not a surrogate for the normal-like subtype in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 118:661-3.

Zajchowski DA, Bartholdi MF, Gong Y, et al. Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. **Cancer Res** 2001; 61:5168-78.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 28 de outubro de 2013.

Ao
Dr. Victor Piana de Andrade.

Aluna: Adriana Leandro Santoro (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1830/13

“Quantificação proteica *in situ* por espectrometria de massas utilizando *matrix-assisted laser desorption/ionization (maldi-ims)* em amostras ductal *in situ* puro e carcinoma *in situ* associado a carcinoma invasor de mama”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 22/10/2013, aprovaram a realização do protocolo do estudo em referência (datado de 02 de setembro de 2013) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico. Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas Pelo Biobanco do AC Camargo Cancer Center;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Mastologia;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento da Instituição Proponente;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 - Material Suplementar

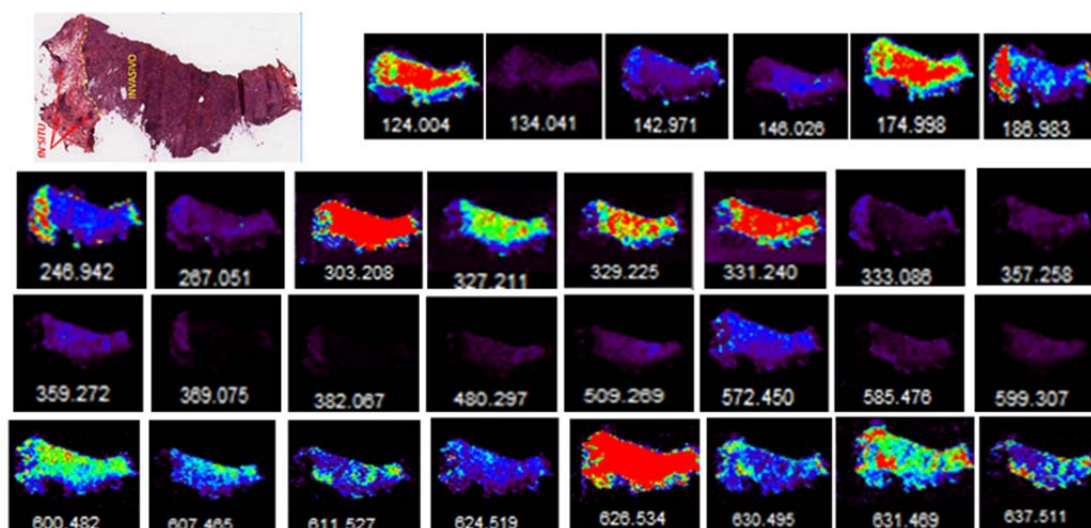


Figura S1 - Imagens moleculares 2D geradas pela conversão do dados obtidos por DESI MSI, no intervalo de m/z de 100 a 640, para a amostra A2, SUBTIPO LUMINAL B. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

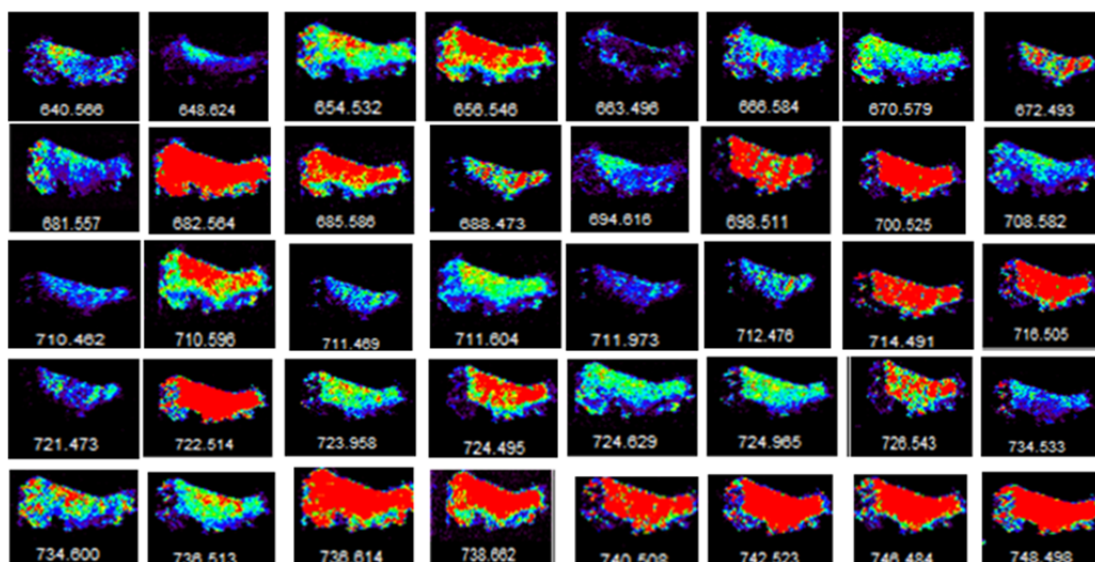


Figura S2 - Imagens moleculares 2D geradas pela conversão do dados obtidos por DESI MSI, no intervalo de m/z de 640a 750, para a amostra A2, SUBTIPO LUMINAL B. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

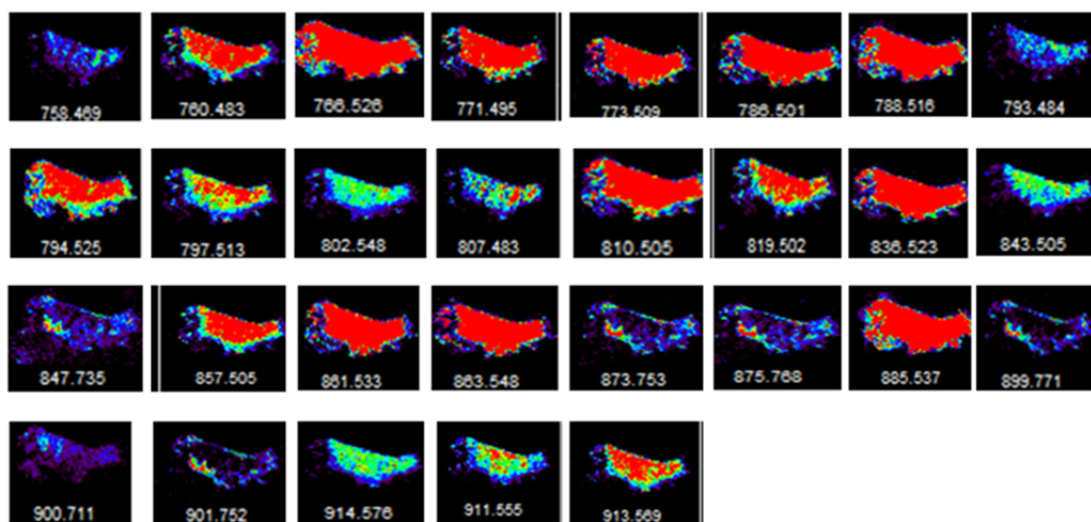


Figura S3 - Imagens moleculares 2D geradas pela conversão do dados obtidos por DESI MSI, no intervalo de m/z de 750 a 1200, para a amostra A2, SUBTIPO LUMINAL B. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

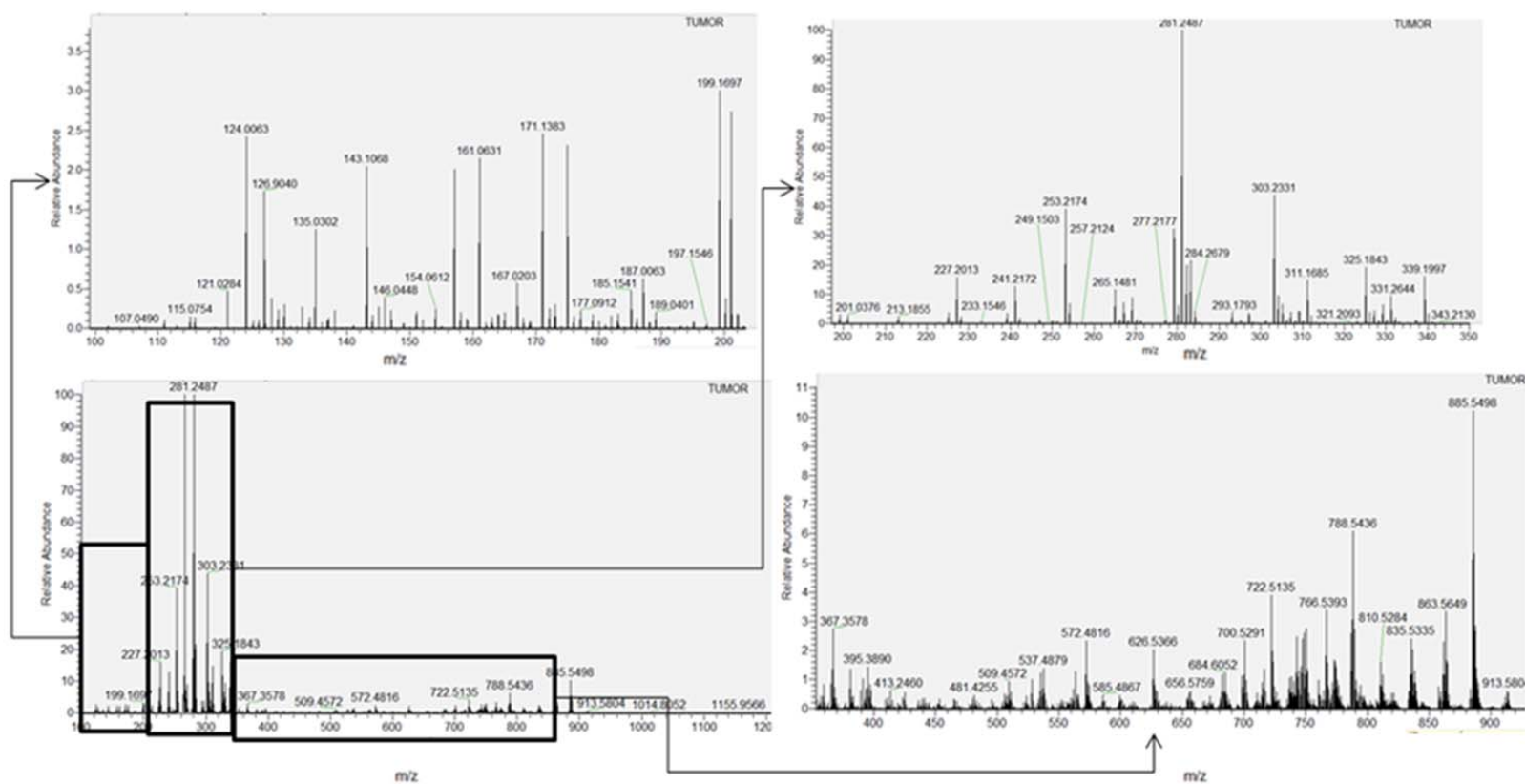


Figura S4 - Espectro de massas médio obtido por análises de DESI MSI no modo negativo para a região tumoral da amostra A2, SUBTIPO LUMINAL B. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

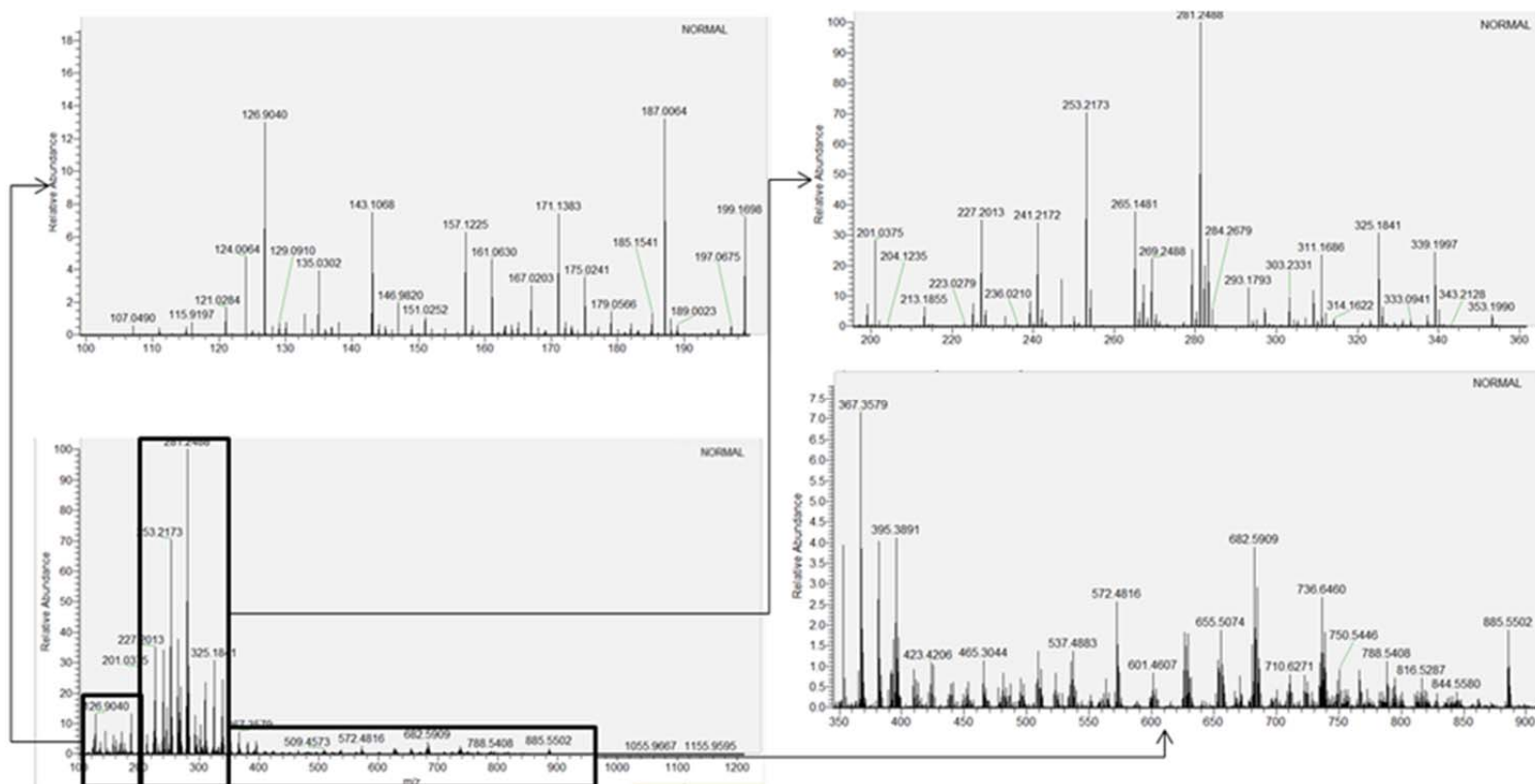


FIGURA S5 - Espectro de massas médio obtido por análises de DESI MSI no modo negativo para a região não tumoral (tecido normal adjacente ao tumor) da amostra A2, SUBTIPO LUMINAL B. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

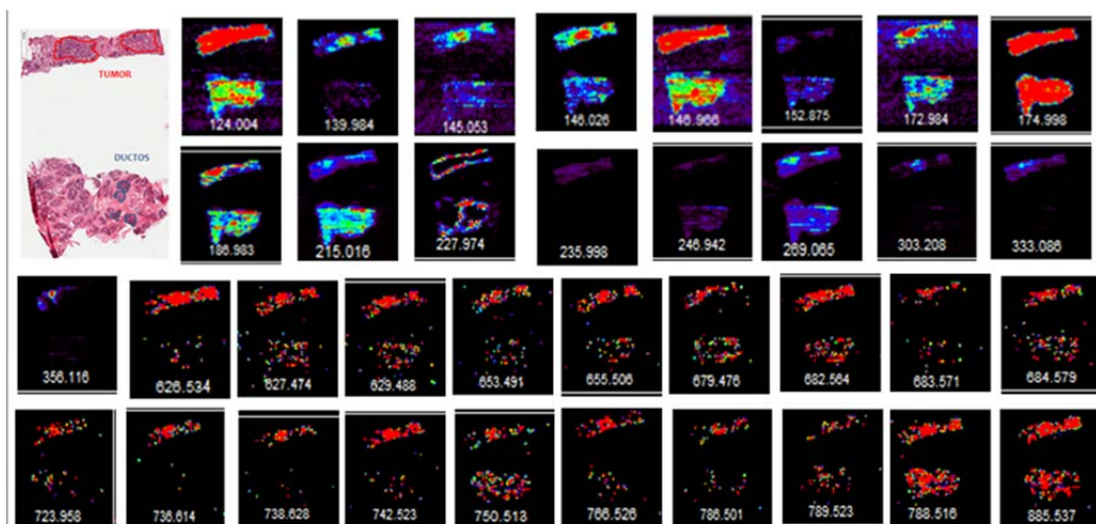


Figura S6 - Imagens moleculares 2D geradas pela conversão do dados obtidos por DESI MSI, no intervalo de m/z de 200 a 1200, para a amostra A28, SUBTIPO LUMINAL A. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

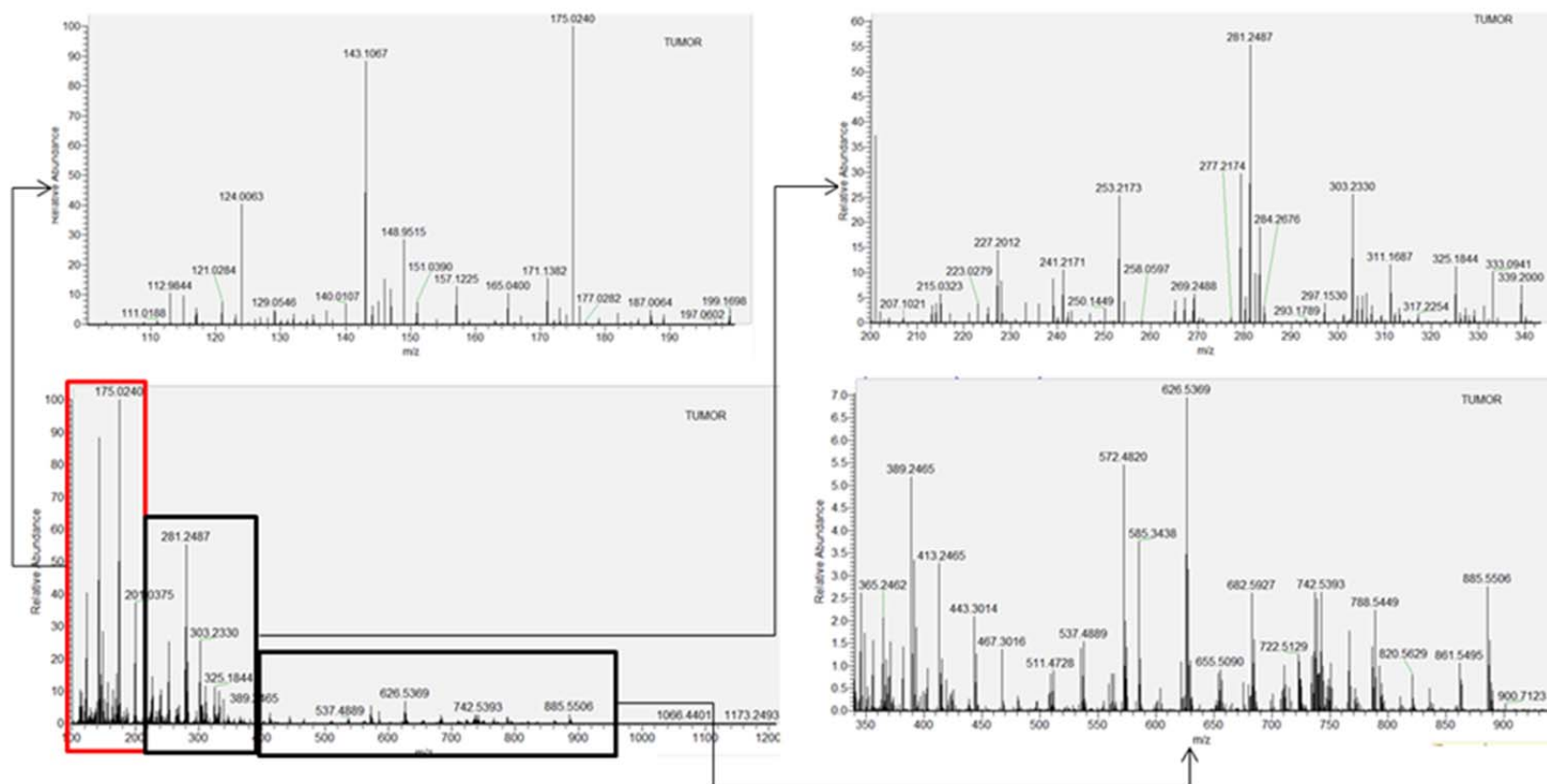


Figura S7 - Espectro de massas médio obtido por análises de DESI MSI no modo negativo para a região tumoral da amostra A28, SUBTIPO LUMINAL A. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

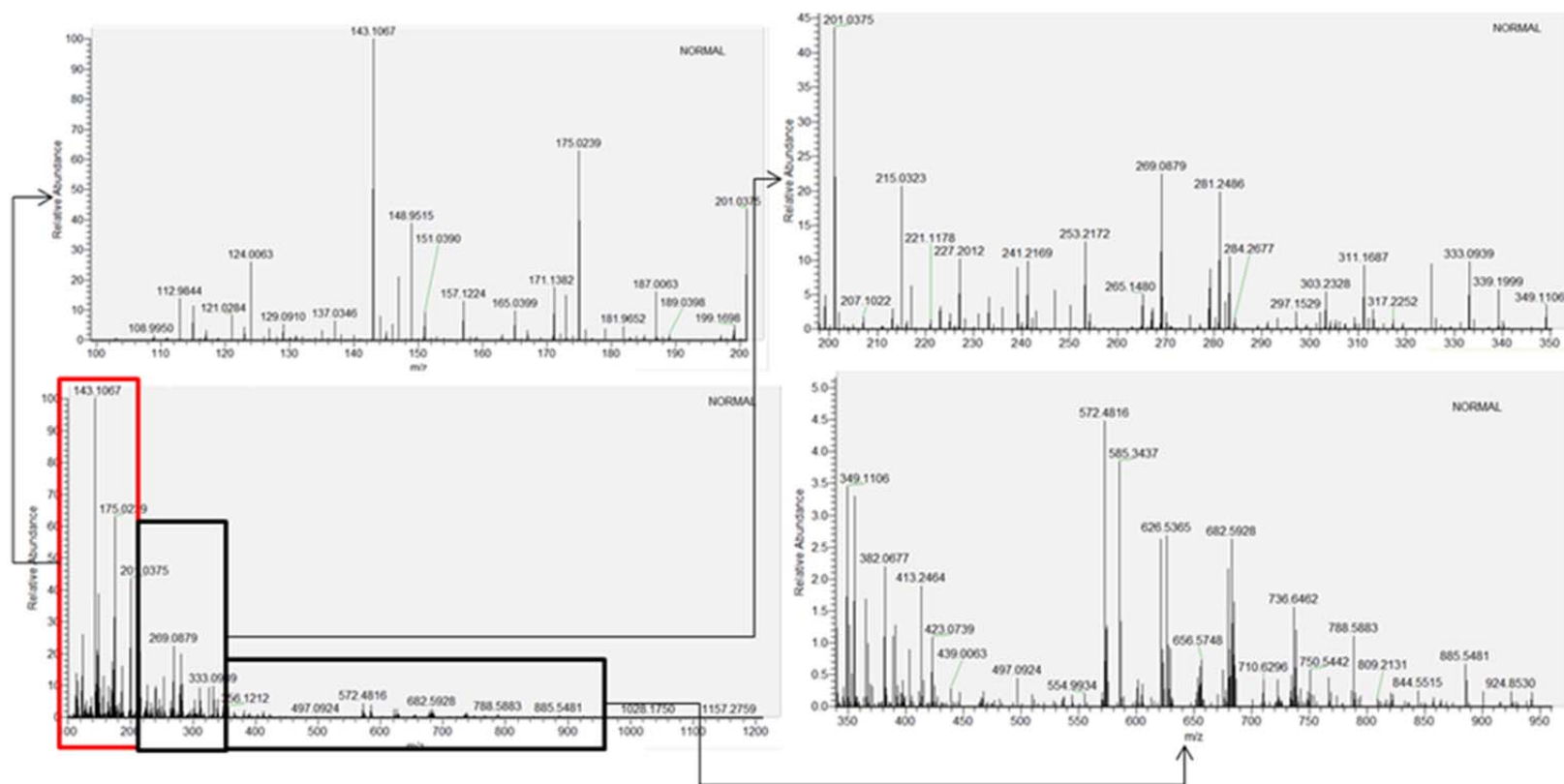


Figura S8 - Espectro de massas médio obtido por análises de DESI MSI no modo negativo para a região não tumoral (tecido normal adjacente ao tumor) da amostra A28, SUBTIPO LUMINAL A. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

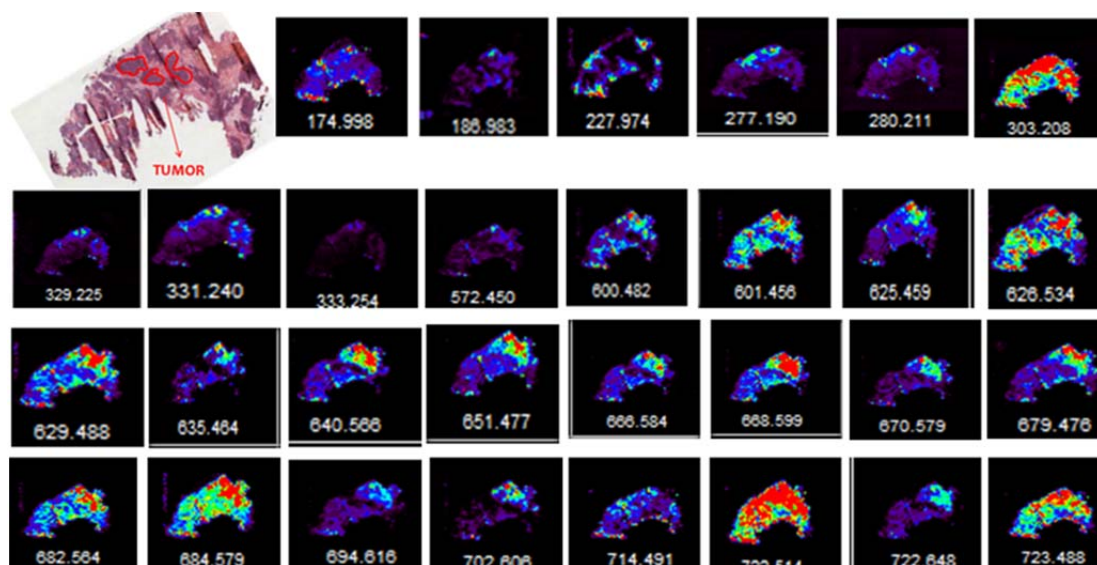


Figura S9 - Imagens moleculares 2D geradas pela conversão do dados obtidos por DESI MSI, no intervalo de m/z de 100 a 730, para a amostra A7, SUBTIPO TRIPLO NEGATIVO. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

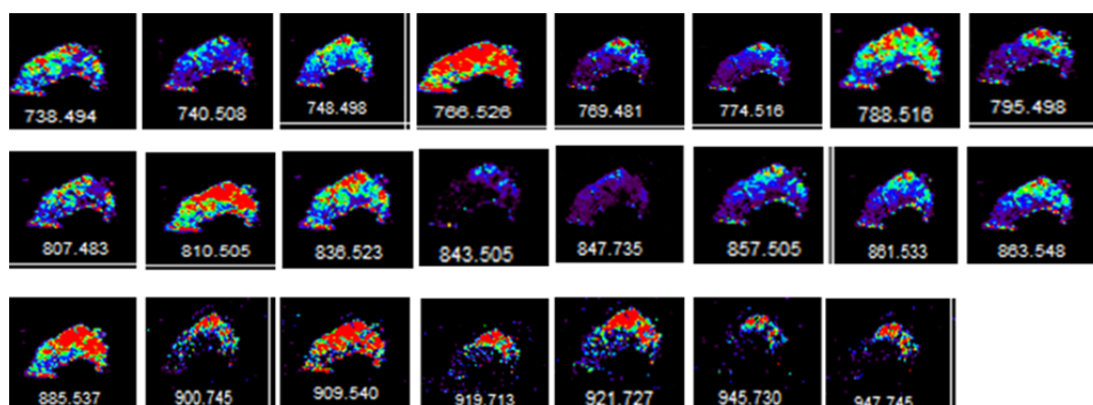


Figura S10 - Imagens moleculares 2D geradas pela conversão do dados obtidos por DESI MSI, no intervalo de m/z de 730 A 1200), para a amostra A7, SUBTIPO TRIPLO NEGATIVO. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

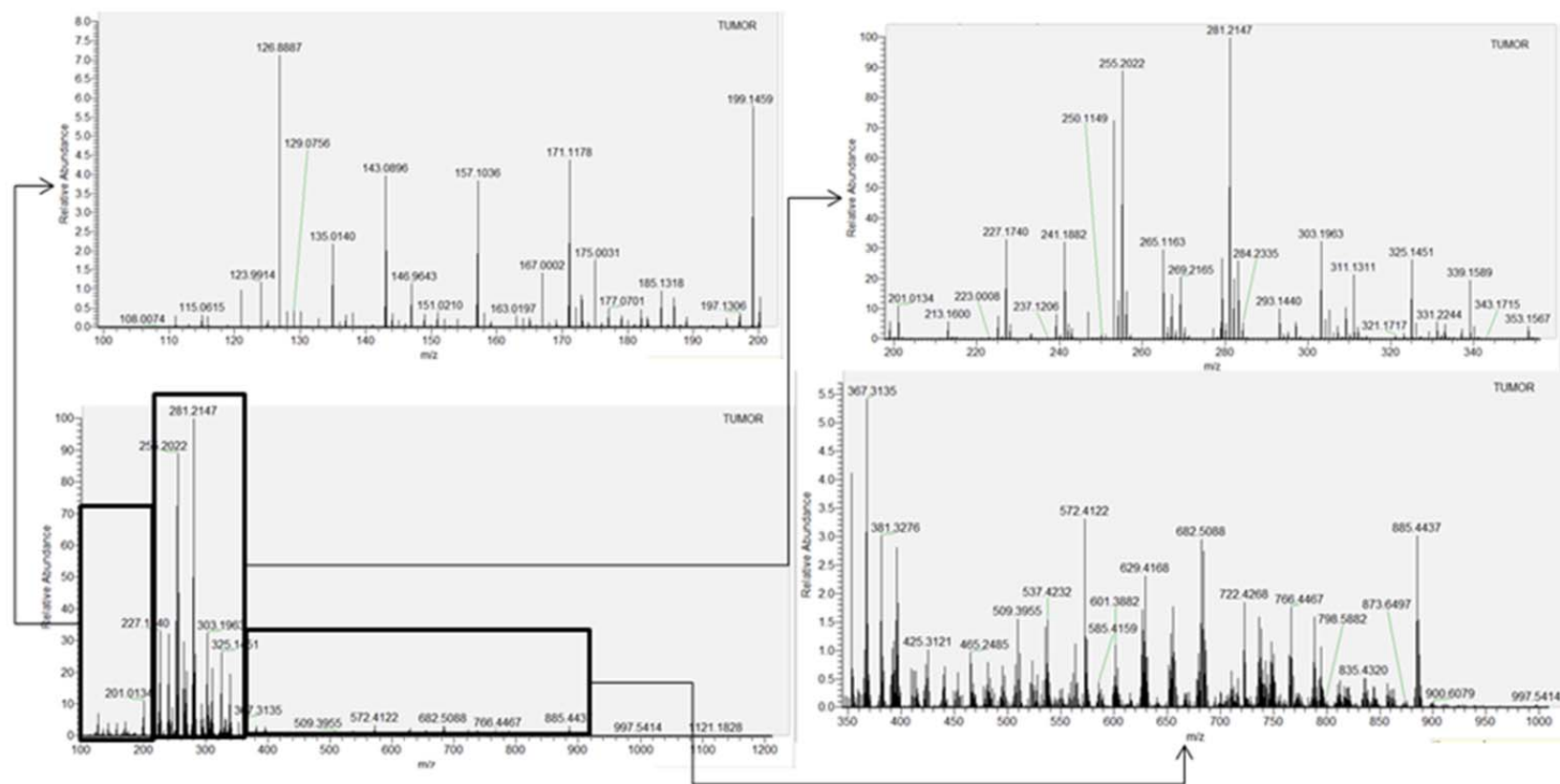


Figura S11 - Espectro de massas médio obtido por análises de DESI MSI no modo negativo para a região tumoral da amostra A7, SUBTIPO TRIPLO NEGATIVO. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

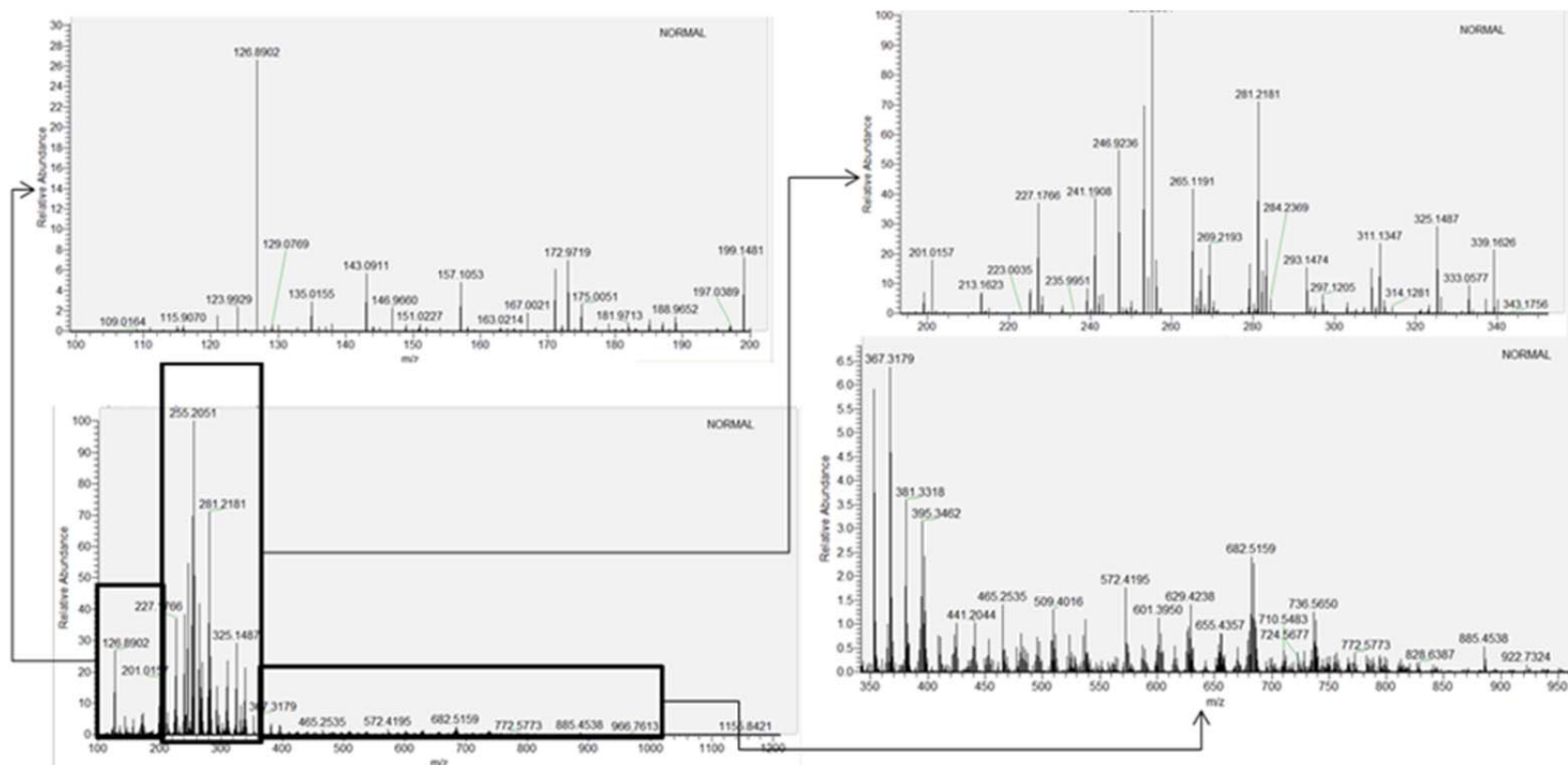


Figura S12 - Espectro de massas médio obtido por análises de DESI MSI no modo negativo para a região não tumoral (tecido normal adjacente ao tumor) da amostra A7, SUBTIPO TRIPLO NEGATIVO. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*).

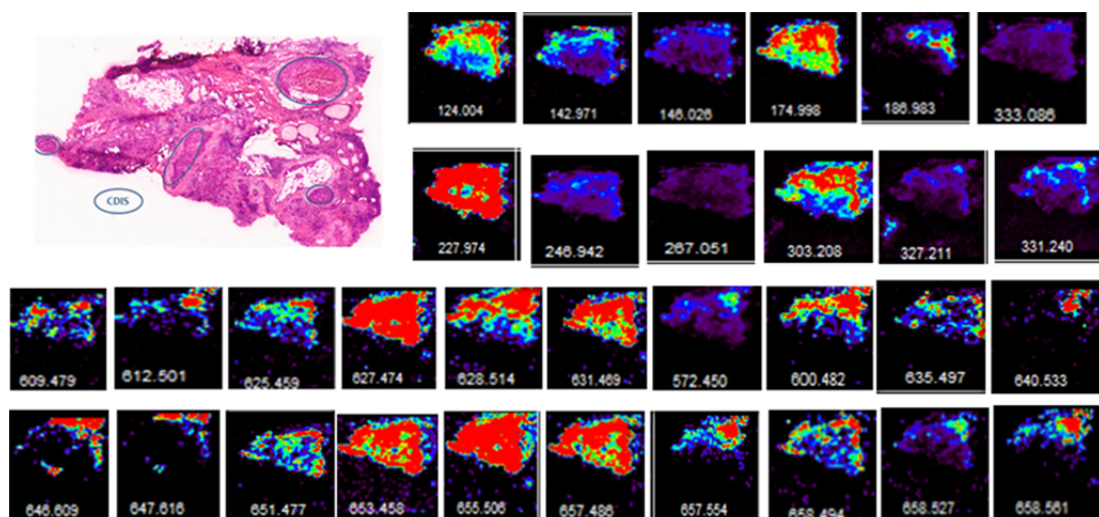


Figura S13 - Imagens moleculares 2D geradas pela conversão do dados obtidos por DESI MSI, no intervalo de m/z de 100 a 660, para a amostra A5, SUBTIPO CDIS. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*; CDIS: *Carcinoma Ductal in situ*).

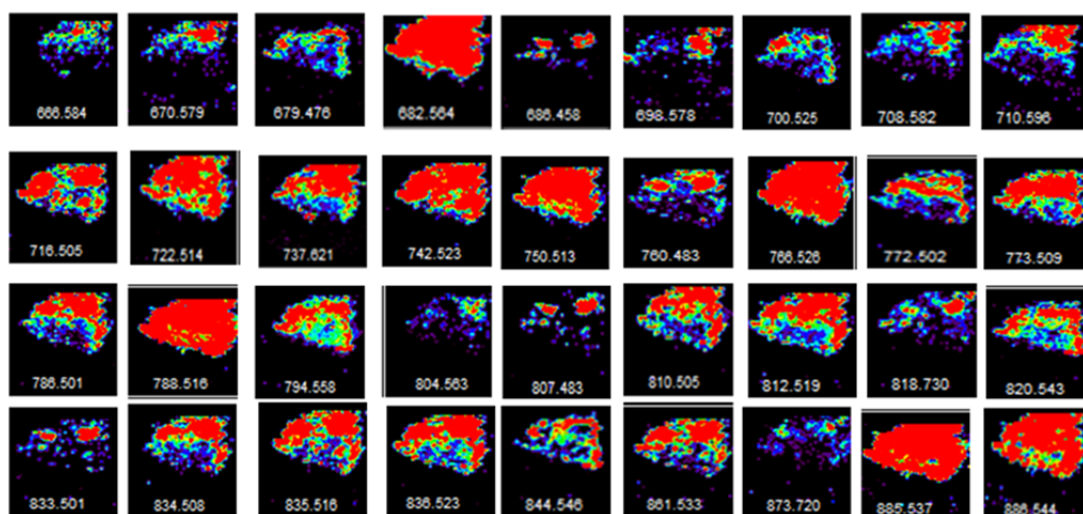


Figura S14 - Imagens moleculares 2D geradas pela conversão do dados obtidos por DESI MSI, no intervalo de m/z de 660 a 1200, para a amostra A5, SUBTIPO CDIS. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*; CDIS: *Carcinoma Ductal in situ*).

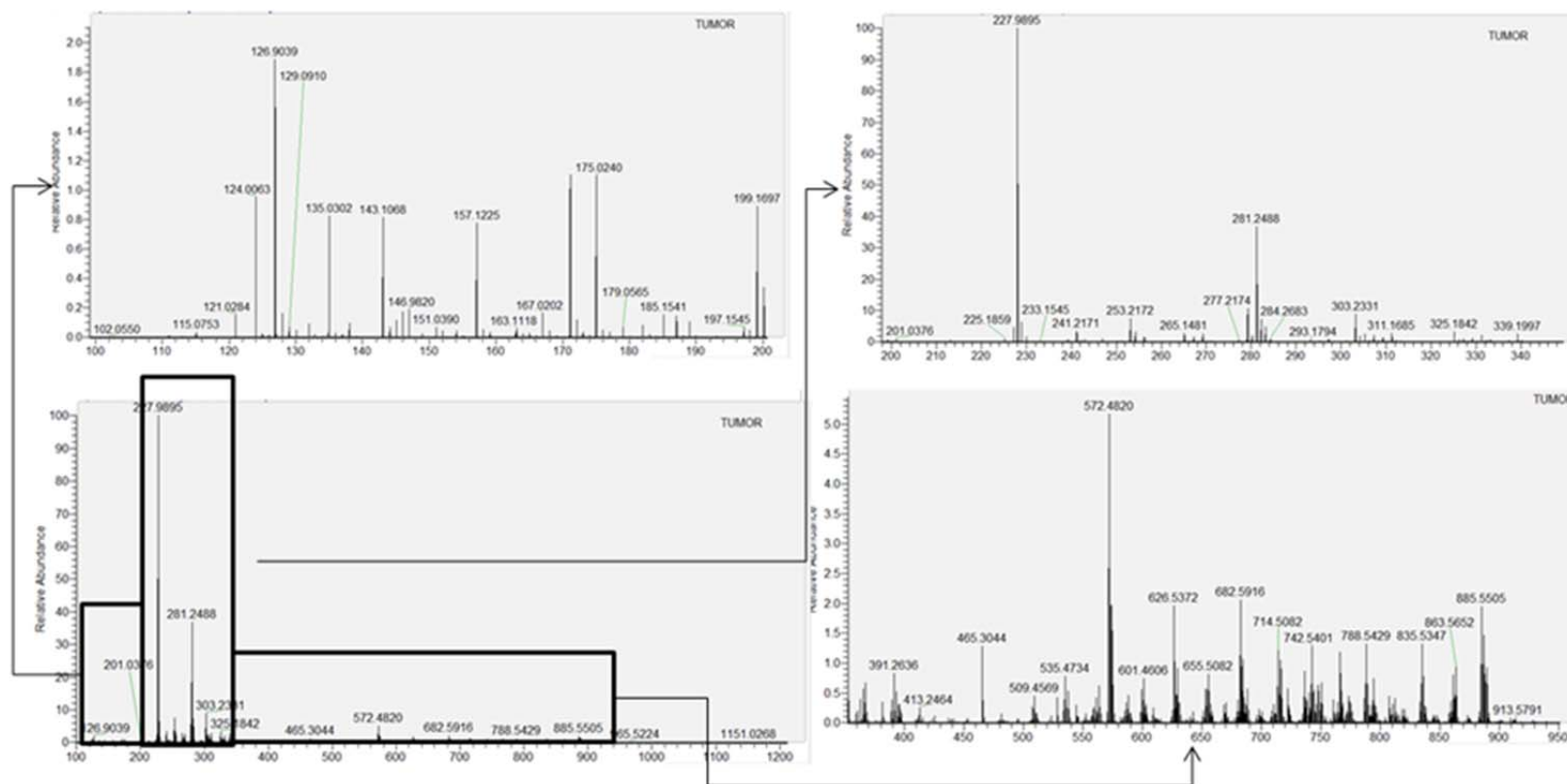


Figura S15 - Espectro de massas médio obtido por análises de DESI MSI no modo negativo para a região tumoral da amostra A5, SUBTIPO CDIS. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*; CDIS: *Carcinoma Ductal in situ*).

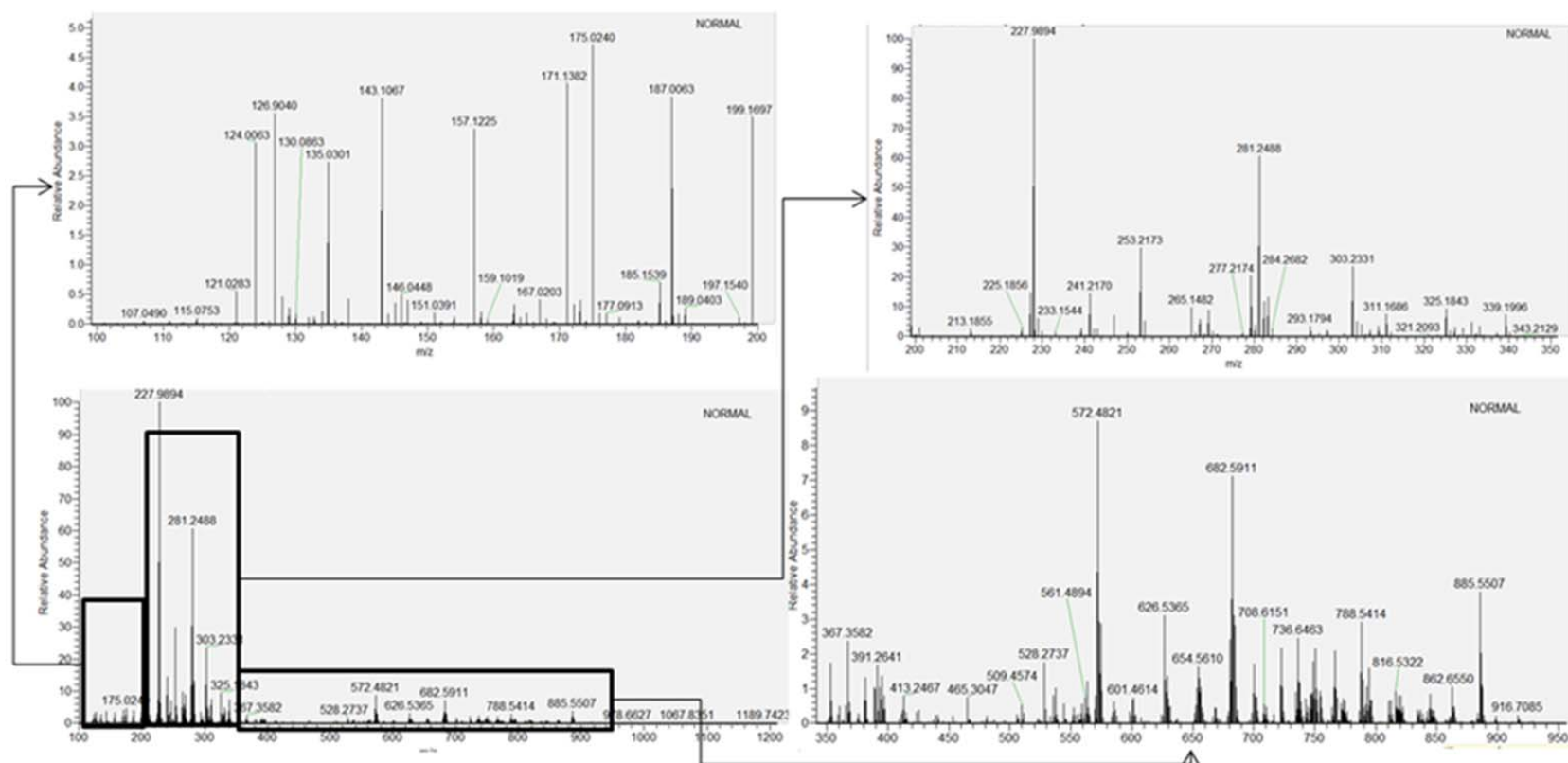


Figura S16 - Espectro de massas médio obtido por análises de DESI MSI no modo negativo para a região não tumoral (tecido normal adjacente ao tumor) da amostra A5, SUBTIPO CDIS. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*; CDIS: *Carcinoma Ductal in situ*).

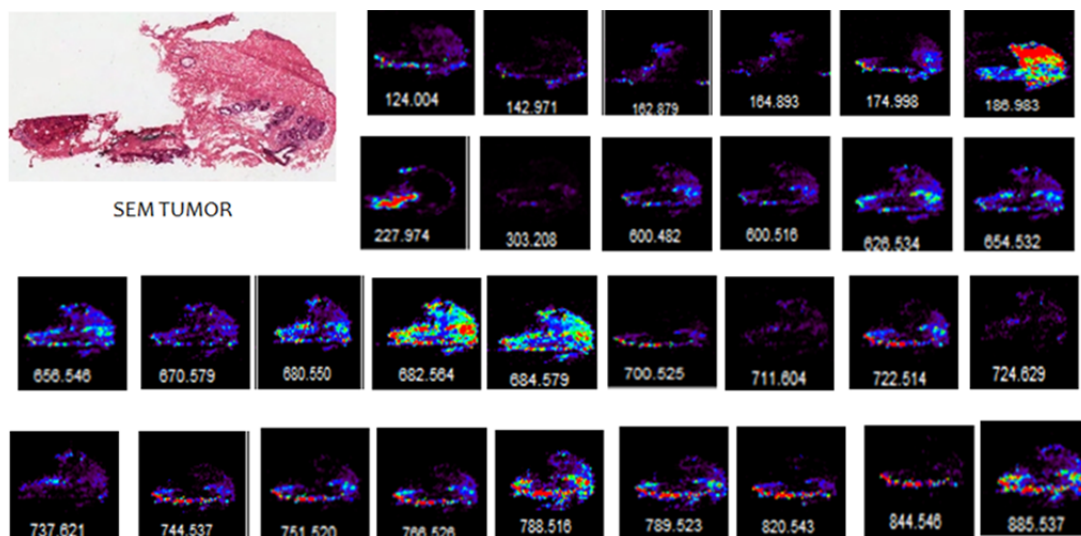


Figura S17 - Imagens moleculares 2D geradas pela conversão do dados obtidos por DESI MSI, no intervalo de m/z de 100 a 1200, para a amostra A6, SUBTIPO HER2. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*; HER2: *human epidermal growth factor receptor 2*).

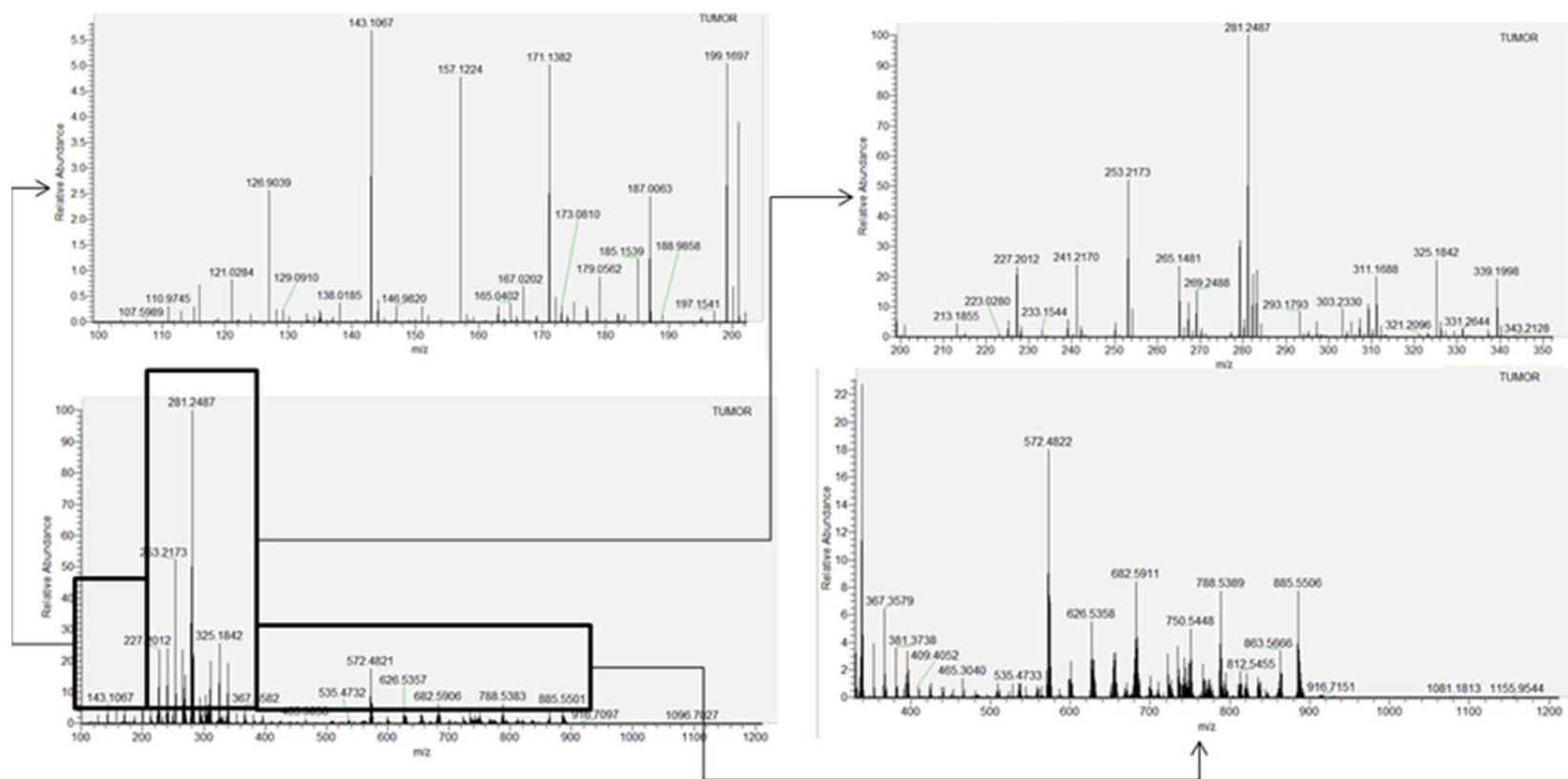


Figura S18 - Espectro de massas médio obtido por análises de DESI MSI no modo negativo para a região tumoral da amostra A6, SUBTIPO HER2. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*; HER2: *human epidermal growth factor receptor 2*).

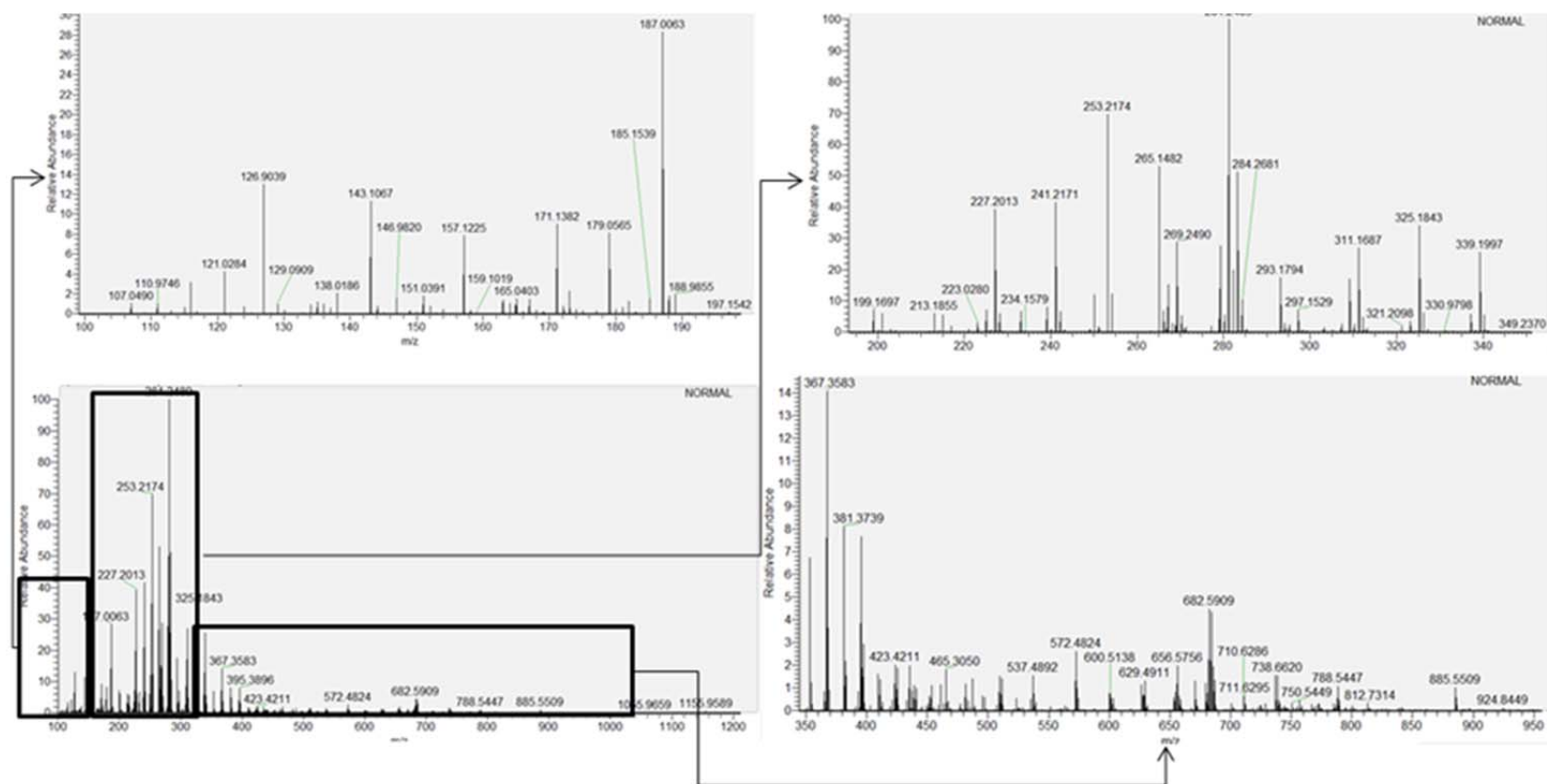


Figura S19 - Espectro de massas médio obtido por análises de DESI MSI no modo negativo para a região não tumoral (tecido normal adjacente ao tumor) da amostra A6, SUBTIPO HER2. (DESI MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*; HER2: *human epidermal growth factor receptor 2*).