

IDENTIFICAÇÃO DOS PERFIS LIPIDÔMICOS *IN SITU* DOS TUMORES BIFÁSICOS DA MAMA POR DESI-MS (*DESORPTION ELECTROSPRAY IONIZATION/ MASS SPECTROMETRY*)

MONIQUE BATISTA DA COSTA LEMOS

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

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Batista da Costa Lemos, Monique

Identificação dos perfis lipidômicos *in situ* dos tumores bifásicos da mama por DESI-MS (Desorption Electrospray Ionization/Mass Spectrometry) / Monique Batista da Costa Lemos - São Paulo, 2019.

166p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia.

Orientador: Victor Piana de Andrade

Descritores: 1. Tumor Filoide/Phyllodes Tumor. 2. Espectrometria de Massas por Ionização por Electrospray/Spectrometry, Mass, Electrospray Ionization. 3. Metabolômica/Metabolomics. 4. Neoplasias da Mama/Breast. 5. Química Analítica/Chemistry, Analytic.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus: detentor de toda ciência e sabedoria. Aos meus pais Quézia e Inaldo: certamente sem o apoio e a ajuda incondicional de vocês eu não chegaria até aqui. Ao meu esposo Tiago pelo exemplo de garra e determinação. À minha querida pequenina Lívia Catarina, minha inspiração, que me lembra todos os dias que o bom da vida é sorrir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Victor Piana de Andrade, pela orientação, apoio e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Marcos Nogueira Eberlin, por ter nos proporcionado realizar os experimentos no laboratório Thomson da Universidade Estadual de Campinas. Agradeço também ao seu aluno Pedro Vendramini, que realizou os experimentos no DESI-MS.

Agradeço à Dra. Adriana Leandra Santoro e à Dra. Júlia Raquel Lino que me deram suporte na instalação dos softwares, na identificação dos metabólitos e em demais questões da química analítica.

Ao Severino da Silva Ferreira do Departamento de Patologia Investigativa do A.C.Camargo Cancer Center que preparou as lâminas para utilizarmos em Campinas.

À Dra. Eloisa Olivieri, do Departamento de Patologia Investigativa do A.C.Camargo Cancer Center que me ajudou com o pedido e liberação do material congelado do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center.

À Marina França de Resende e Rafaela Batista do Departamento de Patologia Investigativa do A.C.Camargo Cancer Center que escanearam as lâminas coradas com *H&E* no *Aperio*.

Ao INCA, em especial ao Dr Claudio Gustavo Stefanoff (biobanco), Dra Maria Theresa de Souza Accioly (biobanco) e Luciana (biobanco) e à Dra Cristina Nascimento (anatomia patológica), que levantaram os casos e nos ajudaram com a liberação das amostras.

Ao Hospital do Câncer de Barretos, Fundação Pio XII, especialmente à Dra Ligia Kerr (anatomia patológica) que iniciou o processo para obtenção das amostras e ao Dr Vinícius Duval da Silva (anatomia patológica) que finalizou o processo, tornando possível recebermos as amostras do Biobanco.

Ao Rodrigo Drummond do Centro Internacional de Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center por ter realizado a análise estatística.

À Bárbara, estatística do A.C.Camargo Cancer Center, pelas dicas sobre os gráficos da análise visual.

À Suely Francisco, que me ajudou na obtenção de artigos e no uso do *Mendeley*.

Aos funcionários da pós-graduação que várias vezes me atenderam ao longo desses quase quatro anos.

RESUMO

Batista da Costa Lemos M. **Identificação dos perfis lipidômicos *in situ* dos tumores bifásicos da mama por DESI-MS (*Desorption Electrospray Ionization/ Mass Spectrometry*)**. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Os tumores bifásicos da mama formam um grupo heterogêneo de tumores que apresentam na histologia dois componentes, o epitelial e o estromal. Esses tumores podem ser benignos ou malignos, alguns podem recidivar ou dar metástase. O seu prognóstico varia conforme a sua classificação histológica, a presença de metástase e a adequabilidade do seu tratamento. Porém, por vezes, há ainda dificuldade em diferenciá-los quando há sobreposição das características histológicas que são utilizadas para realizar o diagnóstico no exame anatomopatológico. Visando um novo método para diferenciar esses tumores entre si, além do exame anatomopatológico habitual, buscou-se analisar esses tumores através de uma técnica da química analítica de ionização ambiente, utilizando espectrometria de massas, o DESI-MSI (*Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*). Foram utilizados cortes de amostras congeladas em lâminas para analisar no DESI-MSI e, através dessa análise, obteve-se os espectros de massas e as imagens químicas. A análise estatística foi realizada através do teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney*. Nesse estudo encontramos maior intensidade dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs); de fosfolípidios como as fosfatidilserina e fosfatidiletanolaminas; do ácido ascórbico e de peptídeos no sarcoma do estroma da mama e tumor *Phyllodes* maligno, comparados ao tumor *Phyllodes borderline* e, por sua vez, comparado ao tumor *Phyllodes* benigno, fibroadenomas e tecido normal. Alguns PUFAs, como o ácido araquidônico (m/z 303,2330) e o ácido adrênico (m/z 331,2643), são precursores dos eicosanóides e participam de vias pró-inflamatórias. Os PUFAs podem estar ligados a um fosfolípido da membrana celular e, quanto

mais estiver presente, menor a rigidez da membrana, o que diminui o gasto energético para a realização dos movimentos celulares, como a endocitose. O aumento da intensidade do ácido ascórbico nas células tumorais se deve provavelmente ao aumento da demanda metabólica de glicose pelas células tumorais; ocorrendo, portanto, aumento dos transportadores de glicose (GLUTs) e, como a molécula do ácido ascórbico e sua forma oxidada tem estrutura molecular semelhante à molécula da glicose, o ácido ascórbico seria carregado por esses transportadores para dentro da célula tumoral. A maior intensidade dos peptídeos no tecido maligno pode ser explicada pela maior demanda proteica da célula maligna; porém, além da importância dos peptídeos para construção das proteínas, sabe-se que alguns aminoácidos podem ser convertidos em metabólitos intermediários da glicólise aeróbia. Isso ocorre devido ao aumento da demanda de átomos de carbono para biossíntese de metabólitos. Essas diferenças lipídicas e metabólicas ocorrem pelo metabolismo diferenciado da célula maligna, a qual desenvolve mecanismos de adaptação para sobrevivência e proliferação. A análise das imagens químicas dos tumores bifásicos da mama obtidas por DESI-MSI mostrou que é possível diferenciar esses tumores. O uso futuro dessa técnica na rotina diagnóstica pode ser promissor devido a ser de execução rápida e de alta acurácia.

Descritores: Tumor Filoide. Espectrometria de Massas por Ionização por Electrospray. Metabolômica. Neoplasias da Mama. Química Analítica

SUMMARY

Batista da Costa Lemos M. [**Identification of lipidomic profiles in situ of breast biphasic tumors by DESI-MS (Desorption Electrospray Ionization/ Mass Spectrometry)**]. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Biphasic breast tumors form a heterogeneous group of tumors that present in histology two components, epithelial and stromal. These tumors may be benign or malignant, some may recur or metastasize. Its prognosis varies according to its histological classification, the presence of metastasis and the adequacy of its treatment. However, sometimes there is still difficulty in differentiating them when there is overlap of the histological features that are used to make the diagnosis in the pathological examination. Aiming at a new method to differentiate these tumors from each other, in addition to the usual pathological examination, we sought to analyze these tumors using an analytical chemistry technique of ambient ionization using mass spectrometry, the Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging (DESI-MSI). Frozen specimen sections were used to analyze the DESI-MSI and, through this analysis, mass spectra and chemical images were obtained. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon-Mann-Whitney test. In this study we found higher intensity of polyunsaturated fatty acids (PUFAs); phospholipids such as phosphatidylserine and phosphatidylethanolamines; ascorbic acid and peptides in breast sarcoma and malignant phyllodes tumor, compared to borderline phyllodes tumor and, in turn, compared to benign phyllodes tumor, fibroadenomas and breast normal tissue. Some PUFAs, such as arachidonic acid (m/z 303,2330) and adrenic acid (m/z 331,2643), are precursors of eicosanoids and participate in proinflammatory pathways. PUFAs may be linked to a cell membrane phospholipid and, the more it is present, the lower the membrane stiffness, which decreases the energy expenditure to perform cell movements, such as endocytosis. The increase in

ascorbic acid intensity in tumor cells is probably due to the increased metabolic demand for glucose by tumor cells; there is therefore an increase in glucose transporters (GLUTS) and, since the ascorbic acid molecule and its oxidized form have a similar molecular structure to the glucose molecule, the ascorbic acid would be carried by these transporters into the tumor cell. The higher intensity of peptides in malignant tissue may be explained by the higher protein demand of the malignant cell; However, in addition to the importance of peptides for protein construction, it is known that some amino acids can be converted into intermediate metabolites of aerobic glycolysis. This is due to the increased demand for carbon atoms for metabolite biosynthesis. These lipidomic and metabolomic differences occur due to the differentiated metabolism of the malignant cell, which develops adaptation mechanisms for survival and proliferation. Analysis of chemical images of biphasic breast tumors obtained by DESI-MSI showed that it is possible to differentiate these tumors. The future use of this technique in the diagnostic routine may be promising due to its fast execution and high accuracy.

Key-words: Phyllodes Tumor. Spectrometry, Mass, Electrospray Ionization. Metabolomics. Breast Neoplasms. Chemistry, Analytic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema representativo de uma possível progressão histológica das lesões bifásicas da mama.....	3
Figura 2	Representação esquemática do funcionamento da fonte de ionização do DESI-MS.....	9
Figura 3	Esquema da formação de imagens químicas por DESI-MSI	11
Figura 4	Cortes histológicos corados com <i>H&E</i> , diagnosticados no exame anatomopatológico com base nos critérios da OMS .	15-9
Figura 5	Demarcação das regiões de interesse	21
Figura 6	Espectrômetro de massas (modelo <i>Q Exactive</i>) acoplado a uma plataforma móvel DESI (<i>Omni Spray Ion Source 2-D</i> modelo OS-3201).....	23
Figura 7	Laboratório de Espectrometria de Massas ThoMSon da Universidade de Campinas (UNICAMP).....	23
Figura 8	Laboratório de Espectrometria de Massas ThoMSon da Universidade de Campinas (UNICAMP).....	24
Figura 9	À esquerda o espectrômetro de massas com a plataforma móvel acoplada, no detalhe à direita ampliação da imagem da plataforma móvel	24
Figura 10	Fonte DESI.....	25

Figura 11	Esquema representativo da formação das imagens químicas	27
Figura 12	Esquema representativo de como o estudo foi realizado.....	29
Figura 13	Imagens químicas obtidas por ionização negativa por DESI-MSI dos íons m/z 135,0302 e 175,0240 no TPM e TPB	31
Figura 14	Perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa m/z 100 a 1200.....	32-4
Figura 15	Perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa de m/z 200-400, correspondente aos ácidos graxos	35-6
Figura 16	Perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa de m/z 500-650, correspondente aos dímeros de ácidos graxos.....	37-9
Figura 17	Perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa de m/z 700-1000, correspondentes aos glicerofosfolipídios e esfingolipídios....	39-41
Figura 18	Sobreposição dos perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa de m/z 200-400, correspondente aos ácidos graxos.....	42-3
Figura 19	Sobreposição dos perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa de m/z 500-650, correspondente aos dímeros de ácidos graxos.....	43-4

Figura 20	Sobreposição dos perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa de m/z 700-1000, correspondente aos glicerofosfolipídios e esfingolipídios.....	45
Figura 21	Sobreposição dos perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa de m/z 100-1200	46
Figura 22	Imagens químicas obtidas por DESI-MSI do íon m/z 175,0240, pareadas com as imagens histológicas correspondentes.....	47
Figura 23	Espectros obtidos através da ionização por DESI-MS, pelo modo negativo, obtidos no <i>XCalibur</i> com mesma escala para comparação.....	48-50
Figura 24	Seleção das regiões de interesse (<i>H&E</i> sobreposto às imagens químicas obtidas por DESI-MSI)	52
Figura 25	Espectro de massas de m/z 300-310 e imagem química do íon m/z 303,2330 obtidos por DESI-MSI da mesma amostra S28 (TPM pareado com tecido histologicamente normal da mama)	53
Figura 26	Imagens químicas obtidas por DESI-MSI do íon m/z 303,2330; pareadas com as imagens histológicas correspondentes.....	54
Figura 27	Espectros de massas obtidos por DESI-MS pelo modo de ionização negativo.....	55

Figura 28	Imagens químicas obtidas por DESI-MSI do íon m/z 331,2643; pareadas com as imagens histológicas correspondentes.....	56
Figura 29	Espectros de massas obtidos através da ionização negativa por DESI-MSI de uma amostra de TPM	57
Figura 30	TPBo à esquerda e estroma mamário normal à direita	58
Figura 31	Imagens químicas da distribuição de diferentes íons m/z 187,0968, 279,2331, 124,0066, 303,2330 comparadas à imagem histológica de um TPBo e N (Amostra S17).....	59
Figura 32	Imagens químicas obtidas através da ionização negativa por DESI-MSI	60
Figura 33	Imagens químicas obtidas através da ionização negativa por DESI-MSI	61
Figura 34	Imagens químicas obtidas através da ionização negativa por DESI-MSI	62
Figura 35	Imagens químicas obtidas através da ionização negativa por DESI-MSI	63
Figura 36	Imagens químicas obtidas através da ionização negativa por DESI-MSI	64
Figura 37	Imagens químicas obtidas por DESI-MSI do íon m/z 885,5501; pareadas com as imagens histológicas correspondentes.....	65

Figura 38	Imagens químicas obtidas por DESI-MSI do íon m/z 885,5501; pareadas com as imagens histológicas correspondentes.....	66
Figura 39	Comparação da intensidade relativa do íon m/z 175,0240....	68
Figura 40	Distribuição do íon m/z 215,0323 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo	68
Figura 41	Distribuição do íon m/z 301,2177 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo	69
Figura 42	Distribuição do íon m/z 319,2277 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo	69
Figura 43	Distribuição do íon m/z 327,2332 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo	70
Figura 44	Distribuição do íon m/z 329,2488 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo	70
Figura 45	Comparação da intensidade relativa do íon m/z 303,2330....	71
Figura 46	Distribuição do íon m/z 331,2643 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo	71
Figura 47	Distribuição do íon m/z 335,2211 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo	72
Figura 48	Distribuição do íon m/z 337,2375 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo	72

Figura 49	Distribuição do íon m/z 391,2620 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo	73
Figura 50	Distribuição do íon m/z 535,4735 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo	73
Figura 51	Distribuição do íon m/z 611,5044 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo	74
Figura 52	Distribuição do íon m/z 633,5105 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo	74
Figura 53	Distribuição do íon m/z 637,5196 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo	75
Figura 54	Distribuição do íon m/z 637,5418 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo	75
Figura 55	Comparação da intensidade relativa do íon m/z 885,5501....	76
Figura 56	Perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização positiva por DESI-MS na faixa de m/z 100-1200	78-81
Figura 57	Perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização positiva por DESI-MS na faixa de m/z 350-650	81-4
Figura 58	Perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização positiva por DESI-MS na faixa de m/z 675-975	84-7
Figura 59	Sobreposição dos perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização positiva por DESI-MS na faixa de m/z 350-650, correspondente aos seguintes compostos	88-9

Figura 60	Sobreposição dos perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização positiva por DESI-MS na faixa de m/z 675-975	89-90
Figura 61	Sobreposição dos perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa de m/z 100-1200	91
Figura 62	Imagens químicas obtidas pela ionização positiva por DESI-MSI	92
Figura 63	Imagens químicas obtidas pela ionização positiva por DESI-MSI	93
Figura 64	Comparação entre a imagem química do íon m/z 430,2068 e a imagem histológica de uma amostra de TPM pareado com tecido histologicamente normal (amostra S22).....	94
Figura 65	Diagrama de <i>Venn</i> mostrando a quantidade de íons presentes em cada tipo de amostra, independente da intensidade dos íons	98
Figura 66	Diagrama de <i>Venn</i> mostrando a quantidade de íons presentes em cada tipo de TP, independente da intensidade dos íons.....	99
Figura 67	Comparação da intensidade relativa do íon m/z 572,4812 entre TPBo e FA.....	101
Figura 68	Comparação da intensidade relativa do íon m/z 335,2211 entre TPBo e FA.....	103

Figura 69	Comparação da intensidade relativa do íon m/z 337,2375 entre TPBo e FA.....	103
Figura 70	Comparação da intensidade relativa do íon m/z 393,2626 entre TPBo e FA.....	104
Figura 71	Comparação da intensidade relativa do íon m/z 521,4589 entre TPBo e FA.....	105
Figura 72	Comparação da intensidade relativa do íon m/z 572,4812 entre TPM e TPBo.....	107
Figura 73	Comparação da intensidade relativa do íon m/z 521,4589 entre TPM e TPBo.....	108
Figura 74	Espectro de massas obtido através da ionização pelo modo positivo por DESI-MS de um TPM e um TPB	113
Figura 75	Espectro de massas obtido através da ionização pelo modo positivo por DESI-MS de um TPM e um TPB	114
Figura 76	Busca pelo valor de m/z no <i>Metabolomics Workbench</i>	118
Figura 77	Estrutura molecular tridimensional do íon m/z 303,2330 (ácido araquidônico)	138
Figura 78	Estrutura molecular tridimensional do íon m/z 331,2643 (ácido adrênico)	139
Figura 79	Estrutura molecular tridimensional do íon m/z 885,5501 (PI)	141
Figura 80	Estrutura molecular tridimensional do íon m/z 175,0240 (ácido ascórbico).....	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios histológicos que norteiam a classificação dos tumores <i>Phyllodes</i>	2
Tabela 2	Massa experimental dos íons encontrados através da ionização pelo modo negativo através da análise por DESI-MSI	77
Tabela 3	Massa experimental dos íons encontrados através da ionização pelo modo positivo através da análise por DESI-MSI.....	95-6
Tabela 4	Íons que se apresentaram com maior intensidade no FA que no TPBo	100
Tabela 5	Íons que se apresentaram com maior intensidade no TPBo que no FA.....	102
Tabela 6	Íons que se apresentaram com maior intensidade no TPM que no TPBo	106
Tabela 7	Íons que se apresentaram com maior intensidade no TPBo que no TPM.....	107
Tabela 8	Íons que se apresentaram com maior intensidade no TPB e FA comparado ao TPM e TPBo.....	109
Tabela 9	Íons que se apresentaram com maior intensidade no TPM e TPBo comparado ao TPB e FA	109-11
Tabela 10	Íons que se apresentaram com maior intensidade no TPM comparado ao TPB	111-2

Tabela 11	Íons que se apresentaram com maior intensidade no TPB comparado ao TPM	113
Tabela 12	Íon que se apresentou em maior intensidade no TPM comparado ao FA.....	114
Tabela 13	Íons detectados nesse estudo com sua massa experimental e teórica, fórmula molecular e erro em ppm (ionização pelo modo negativo por DESI-MS).....	120
Tabela 14	Metabólitos identificados através dos bancos de dados <i>Metlin</i> , <i>LipidMaps</i> e <i>Metabolomics Workbench</i> (ionização pelo modo negativo por DESI-MS)	121-2
Tabela 15	Íons detectados nesse estudo com sua massa experimental e teórica, fórmula molecular e erro em ppm (ionização pelo modo positivo por DESI-MS)	123-5
Tabela 16	Metabólitos identificados através dos bancos de dados <i>Metlin</i> , <i>LipidMaps</i> e <i>Metabolomics Workbench</i> (ionização pelo modo positivo por DESI-MS).....	127-31
Tabela 17	Íons que diferenciaram, na análise estatística, o TPM do TPBo através da análise pelo DESI no modo negativo	147
Tabela 18	Íons que diferenciaram, na análise estatística, o grupo (TPB+FA) do grupo (TPM + TPBo) através da análise pelo DESI no modo positivo.....	147-8
Tabela 19	Íons que diferenciaram, na análise estatística, o TPB do TPM através da análise pelo DESI no modo positivo ...	149

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AG	Ácido graxo
CAR	Carnitina Acilada
Cer / Sph	Bases de ceramidas / esfingolipídio
CerP / S1P	Cer / Sph-1-fosfato
CGAs	Campos de grande aumento
DESI-MS	<i>Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i> (sugestão de tradução para o português: Dessorção Induzida por Ionização <i>Electrospray</i> Acoplada à Espectrometria de Massas)
DESI-MSI	<i>Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging</i> (sugestão de tradução para o português: Imageamento por Dessorção Induzido por Ionização <i>Electrospray</i> Acoplada à Espectrometria de Massas)
DG	Di (acil alquil) glicerol
DGDG	Digalactosildiacylglicerol
FA	Fibroadenoma
FA JUV	juvenil
FA mix	Fibroadenoma mixóide
FA hiperc	Fibroadenoma hiper celular
FA comp	Fibroadenoma complexo
GL	Glicerolipídios
GP	Glicerofosfolipídios
H&E	Hematoxilina e eosina
HexCer	Hexosilceramida
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LacCer	Lactoceramida
LacSph	Lactosilceramida
LisoSM	Lisoesfingomielina
LPA	Ácido lisofosfatídico

LPC	Lisofosfatidilcolina
LPE	Lisofosfatidiletanolamina
LPG	Lisofosfatidilglicerol
LPI	Lisofosfatidilinositol
LPS	Lisofosfatidilserina
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MBCL	Monique Batista da Costa Lemos
MG	Monoacilglicerol
MGDG	Monogalactosildiacilglicerol
MIPC	Manosil-inositol-fosfoceramida
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> (sugestão de tradução para o português: espectrometria de massas em <i>tandem</i>)
N	Tecido histologicamente normal
NAT	N-acil-aurina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PE-Cer	Fosfatidiletanolamina-ceramida
PG	Fosfatidilglicerol
PI	Fosfatidilinositol
PIP	Glicerofosfoinositol fosfato
ppm	parte por milhão
PS	Fosfatidilserina
PUFA	Ácido graxo poliinsaturado
ROIs	Regiões de Interesse
SARC	Sarcoma do Estroma da Mama
SHexCer	Sulfatídeo
SM	Esfingomielina
SP	Esfingolipídios
Sph	Esfingosina

ST	Esterol-lipídios
TG	Tri (acil alquil) glicerol
TP	Tumor <i>Phyllodes</i>
TPB	Tumor <i>Phyllodes</i> benigno
TPBo	Tumor <i>Phyllodes borderline</i>
TPM	Tumor <i>Phyllodes</i> maligno
WE	Éster de cera

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Fibroadenoma e Tumor Phyllodes: os Tumores Bifásicos da Mama...	1
1.2	Classificação dos Tumores Phyllodes	1
1.3	Recorrência, Metástase, Prognóstico e Tratamento.....	3
1.4	Diagnóstico e Desafios	4
1.5	DESI-MSI e a Detecção de Metabólitos	8
1.6	DESI-MSI e o Estudo dos Lipídios na Oncologia	11
2	OBJETIVOS	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1	Materiais	14
3.2	Preparo das Lâminas	15
3.3	Análises Histológicas	20
3.4	Obtenção dos Espectros de Massas	22
3.5	Obtenção das Imagens Químicas	26
3.6	Processamento dos Dados.....	28
4	RESULTADOS	30
4.1	DESI-MSI.....	30
4.2	Ionização no Modo Negativo	31
4.2.1	Gráficos obtidos a partir da análise visual das imagens químicas.....	66
4.2.2	Íons encontrados através da ionização negativa por DESI-MSI.....	76
4.3	Ionização no modo Positivo.....	78
4.3.1	Íons encontrados através da ionização positiva por DESI-MSI	95
4.4	Análise Estatística	97
4.4.1	Ionização Negativa	97
4.4.2	Ionização Positiva.....	108
4.5	Identificação dos Íons.....	114

5	DISCUSSÃO	132
5.1	DESI-MSI e os Exames Anatomopatológicos.....	132
5.2	Lipídios, Metabólitos e Câncer	134
5.2.1	Ácido araquidônico e ácido adrênico.....	137
5.2.2	Fosfolipídios	139
5.2.3	Ácido ascórbico	141
5.2.4	Ceramidas	143
5.2.5	Colesterol	143
5.2.6	Peptídeos	145
5.2.7	Painel de metabólitos para diferenciar os tumores bifásicos enignos e malignos.....	146
5.2.8	Considerações e perspectivas futuras.....	150
6	CONCLUSÃO	153
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157

ANEXO

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

APÊNDICES

Apêndice 1 Lista de Tabelas de 1 a 4 referentes aos íons detectados na ionização pelo modo negativo e positivo e suas respectivas massa experimental, teórica, fórmula molecular e sugestão de identificação

Apêndice 2 Fotos de cortes histológicos corados em *H&E*, provenientes das peças cirúrgicas dos tumores *Phyllodes* que tinham tecido congelado no biobanco do A.C.Camargo Cancer Center e que foram utilizados no DESI-MS

Apêndice 3 Tumores *Phyllodes* no A.C.Camargo Cancer Center - levantamento em 19 anos

1 INTRODUÇÃO

1.1 FIBROADENOMA E *TUMOR PHYLLODES*: OS TUMORES BIFÁSICOS DA MAMA

Os tumores bifásicos da mama compreendem os fibroadenomas (FAs) e os tumores *Phyllodes* (TPs). Esses tumores são chamados de bifásicos devido à presença de dois componentes histológicos: o epitelial e o estromal. O TP foi descrito pela primeira vez em 1838 por Johannes Müller e, inicialmente, foi chamado de *Cystossarcoma Phyllodes* (FIKS 1981). O fibroadenoma é o tumor benigno mais comum da mama feminina e comumente ocorre em mulheres jovens (20-30 anos). Em contrapartida, os TPs são raros, somam menos de 1% dos tumores mamários (ROWELL et al. 1993) e acometem mulheres na quarta e quinta décadas de vida, com casos isolados em crianças ou adolescentes (ASOGLU et al. 2004).

1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES *PHYLLODES*

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os TPs em três categorias: TP benigno (TPB), TP *borderline* (TPBo) e TP maligno (TPM). Essa classificação é baseada em atributos anatomopatológicos como atipia celular, número de mitoses, celularidade estromal, aspecto das bordas tumorais, supercrescimento estromal e presença de elementos heterólogos.

O TPB apresenta atipia mínima, 0-4 mitoses em 10 campos de grande aumento (CGAs), baixa celularidade, margens bem definidas a expansivas, ausência de supercrescimento estromal e ausência de elementos heterólogos. O TPBo apresenta atipia moderada, 5-9 mitoses em 10 CGAs, celularidade estromal moderada, margens expansivas a infiltrativas, presença ou não de supercrescimento estromal e ausência de elementos heterólogos. E o TPM apresenta atipia intensa, 10 ou mais mitoses em 10 CGAs, alta celularidade estromal, margens infiltrativas, supercrescimento estromal - a presença de supercrescimento estromal é considerada quando há pelo menos um campo de grande aumento em que só é visualizado estroma, sem nenhum elemento epitelial - e presença ou não de elementos heterólogos (Tabela 1). A presença de pelo menos um elemento heterólogo, como osteossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, rabdomyossarcoma, dentre outros, em meio ao estroma tumoral, já permite classificar o tumor como TPM (LAKHANITAN et al. 2012).

Tabela 1 - Critérios histológicos que norteiam a classificação dos tumores *Phyllodes*

Critérios histológicos	<i>TP benigno</i>	<i>TP borderline</i>	<i>TP maligno</i>
Atipia nuclear	Discreta	Moderada	Intensa
Mitoses	< ou = 4/10 CGA	5 a 9/10 CGA	> ou = 10/10 CGA
Supercrescimento estromal	Ausente	Presente Ausente	ou Presente
Característica das margens	Bem definida ou Expansiva	Expansiva Infiltrativa	ou Infiltrativa
Celularidade estromal	Baixa a Moderada	Moderada a Alta	Moderada a Alta
Elemento heterólogo	-	-	Ausente ou Presente

Os tumores bifásicos da mama apresentam um espectro heterogêneo, no qual, estima-se haver uma progressão histológica do fibroadenoma para o TP; do TPB para o TPBo e por sua vez, para o TPM (PISCUOGLIO et al. 2016) (Figura 1).

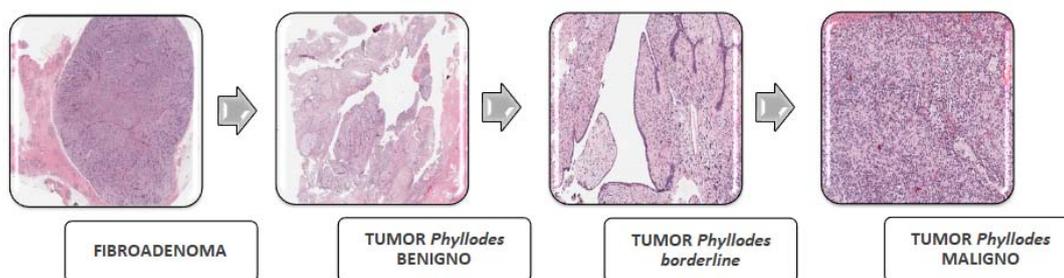


Figura 1 - Esquema representativo de uma possível progressão histológica das lesões bifásicas da mama.

1.3 RECORRÊNCIA, METÁSTASE, PROGNÓSTICO E TRATAMENTO

Não se observa recidiva nos FAs, todavia estudos prévios apontam que a recorrência local dos TPB, TPBo e TPM é, respectivamente, 10-17%, 14-25% e 23-30% (TAN et al. 2016a). Metástases no TP podem ocorrer tanto no momento do diagnóstico quanto tardiamente, algumas surgindo até 12 anos após o diagnóstico. As metástases ocorrem em TPB, TPBo e TPM, nas seguintes porcentagens: 0,13; 1,62 e 16,71%, respectivamente (TAN et al. 2016a). As metástases são mais comuns para os pulmões, pleura e osso (KESSINGER et al. 1972), já as metástases intracranianas são raras e geralmente associadas à disseminação sistêmica (TIWARI et al. 2017). Esses

tumores mostram diferentes taxas de metástase e recorrência local, por isso, é importante estudá-los e diagnosticá-los corretamente.

O fibroadenoma juvenil é o que mais se assemelha histologicamente ao TPB, mas essa semelhança é apenas histológica, visto que o fibroadenoma não gera metástase como ocorre em alguns TPs (TAN et al. 2016a). O prognóstico dos FAs é bom; o prognóstico do TP, em geral, também é bom em qualquer tipo histológico, se não houver doença metastática e se a exérese da lesão for completa e com margens livres, confirmadas no exame anatomopatológico (TAN et al. 2016a).

O tratamento do FA pode ser cirúrgico ou expectante, dependendo da idade da paciente e do tamanho do tumor. O tratamento do TP é cirúrgico, com margens de 1 a 10mm (SHAABAN e BARTHELMES 2017; TREMBLAY-LEMAY et al. 2017); porém no caso do TPB, mesmo com margens positivas, a conduta de escolha pode ser expectante (TAN et al. 2016a).

1.4 DIAGNÓSTICO E DESAFIOS

Os TPs são pouco estudados, provavelmente devido à baixa incidência, contudo chamam a atenção pela recorrência e capacidade de dar metástase, variável entre seus grupos, diferindo dos FAs por essas singularidades e por aspectos histopatológicos. No entanto, por vezes, o diagnóstico diferencial entre alguns FAs e os TPBs, e entre os TPBs e TPMs pode ser um desafio devido à sobreposição dos achados histopatológicos.

Através de exames radiológicos como ultrassonografia das mamas e mamografia, associados à clínica, é possível suspeitar da presença de um FA ou de um TP, mas o diagnóstico padrão-ouro é o exame anatomopatológico (VENTER et al. 2015; TAN et al. 2016a). Após a suspeita de uma lesão bifásica da mama em um exame radiológico, pode-se realizar uma biópsia por agulha grossa (*core biopsy*). No entanto, a análise de fragmentos da *core biopsy* tem sensibilidade moderada, devido à heterogeneidade tumoral, pois ela retrata uma pequena área do tumor e, quando se trata de um tumor com áreas heterogêneas, há a possibilidade de ser representada uma área benigna e em outro polo do tumor haver uma área maligna não representada; essa possibilidade não ocorre na análise anatomopatológica do espécime cirúrgico, se o mesmo for bem estudado. Entretanto, a análise anatomopatológica pode ser limitada, devido a sobreposição de características microscópicas e devido à ausência de elementos diagnósticos bem demarcados; portanto, o resultado pode se tornar subjetivo, dependente da interpretação individual e, por conseguinte possibilita uma baixa concordância entre os patologistas (KOMENAKA et al. 2003; JACOBS et al. 2005; TAN et al. 2005; DESSAUVAGIE et al. 2018; GIRI 2009).

Devido a heterogeneidade tumoral e a fim de reduzir essas dúvidas diagnósticas, o tumor deve ser amplamente estudado na macroscopia: deve-se representar áreas que se mostrem diferentes macroscopicamente com o objetivo de se caracterizar corretamente a lesão. Sendo assim, faz-se necessário associar novas ferramentas de apoio diagnóstico a fim de realizar

o diagnóstico diferencial entre essas lesões de forma mais acurada, para melhorar a terapêutica e o seguimento clínico desses pacientes.

Como forma de complementar a realização deste diagnóstico, já se utiliza a imunohistoquímica em alguns casos, principalmente em *core biopsies* e também a biologia molecular, essa mais restrita a pesquisa, contudo sem alcançar os resultados pretendidos para realizar um diagnóstico assertivo. Sobre a imunohistoquímica utilizada nas *core biopsies*, os anticorpos p63 e p40 são positivos focalmente nos TPs e positivos difusamente nos carcinomas metaplásicos. O anticorpo CD34 é positivo em TPs, principalmente nos de menor grau histológico e a beta-catenina tem expressão nuclear aberrante no estroma dos TPs, bem como em carcinomas metaplásicos. Segundo GINTER et al. (2016), a expressão imunohistoquímica do anticorpo pHH3 pode ajudar a identificar melhor a atividade mitótica nesses tumores, em relação a contagem manual. Outros estudos que utilizaram imunohistoquímica mostram que a expressão dos anticorpos p53 e CD117 está relacionada com malignidade, sendo mais comum nos TPMs que nos demais (TAN et al. 2005). A proteína *Yes-associated* (YAP) também está relacionada a um pior prognóstico, sua expressão é maior no estroma dos TPs e aumenta com a progressão histológica para o polo maligno (KIM et al. 2014).

Já os estudos de biologia molecular mostram que as mutações mais comuns encontradas nos tumores bifásicos da mama são a mutação no éxon 2 do gene MED12 e mutação no promotor do TERT (PISCUOGLIO et al. 2016). A mutação no MED12 é mais encontrada em FAs e TPBs e sua frequência decresce com a progressão para o polo maligno, estando presente

em torno de 51% dos TPBs, 27% dos TPBs e menos de 1% dos TPMs (YOON et al. 2016). Essa mutação está presente também em 59% dos FAs, mas está ausente em outras neoplasias fusocelulares da mama, portanto se mostra útil para diferenciar outras lesões fusocelulares da mama dos FAs e dos TPs (LIEN et al. 2016).

A mutação clonal no promotor TERT também diferencia os FAs dos TPs, pois está ausente nos FAs e presente em boa parte dos TPs, sendo mais prevalente nos malignos (68%), em relação aos TPBs (57%) e em relação aos benignos (18%). A mutação do TERT está também relacionada à recorrência e à progressão para o polo maligno (PISCUOGLIO et al. 2016).

Outras mutações em genes associados ao câncer também foram encontradas em TPs, como mutações nos genes PIK3CA, RB1, FLNA, KMT2D, além de amplificação de EGFR e perda do gene supressor tumoral PTEN (GATALICA et al. 2016; LIU et al. 2016; TAN et al. 2016b). Algumas dessas mutações determinam progressão rápida da doença, como o PTEN e o RB1 (KIM et al. 2018). Algumas são mais encontradas em casos de recidiva, como alterações nos genes RARA e ZNF703 e outras em casos com metástase, como alterações no SETD2, BRCA2 e TSC1 (KIM et al. 2018). Mutações no neurofibromin 1 (NF1), IGF1R e EGFR foram identificadas apenas em tumores malignos (CANI et al. 2015).

Os estudos imunohistoquímicos, moleculares e genéticos ainda não trouxeram resultados definitivos para realizar o diagnóstico diferencial dessas lesões. Portanto, são necessários trabalhos posteriores nessa área e a busca de novos métodos diagnósticos para associar ao exame anatomopatológico.

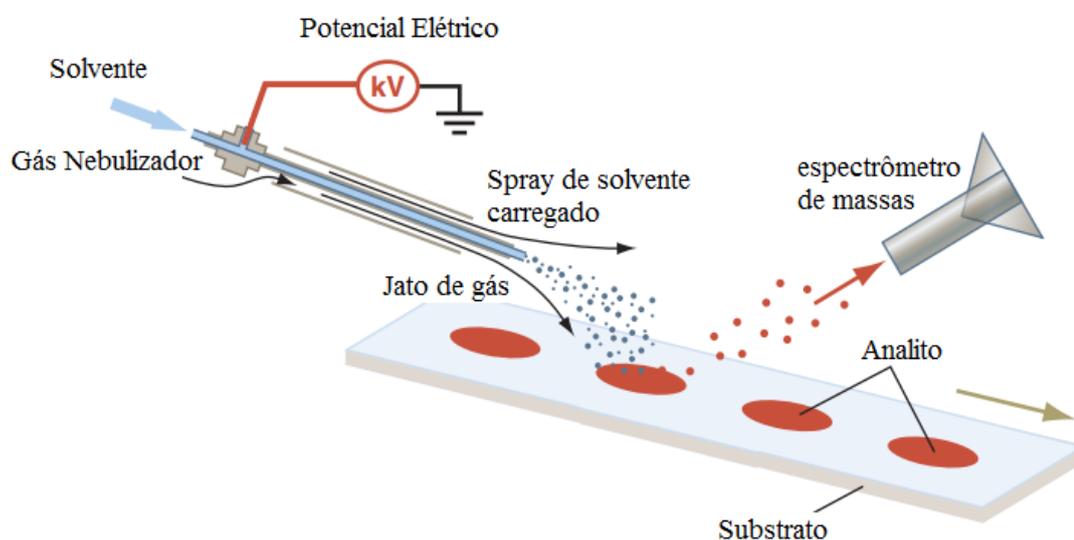
1.5 DESI-MSI E A DETECÇÃO DE METABÓLITOS

A Espectrometria de Massas (MS, sigla proveniente do nome em inglês *Mass Spectrometry*) é uma técnica da química analítica capaz de fornecer informações sobre um composto orgânico ou inorgânico como: massa molecular e a estrutura molecular, através da razão massa-carga (m/z) da substância ionizada (SKOOG et al. 2006). Com esta técnica é possível avaliar a metabolômica de uma amostra biológica, por exemplo, detectar carboidratos, lipídios, peptídeos e outros metabólitos.

Em 2004 surgiu uma técnica alternativa de ionização ambiente chamada *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry*-DESI-MS sugestão de tradução para o português: Dessorção Induzida por Ionização *Electrospray* Acoplada à Espectrometria de Massas) (TAKÁTS et al. 2004). A utilização da espectrometria de massas na área médica teve um crescimento exponencial após o desenvolvimento da fonte de ionização DESI (*Desorption Electrospray Ionization* - possível tradução para o português: Dessorção Induzida por Ionização *Electrospray*) em 2004 pelo professor R. Graham Cooks da Universidade de Purdue. Esta fonte de ionização permite realizar a análise de amostras no seu estado natural, com o mínimo de preparo da amostra. Ao acoplar a fonte de ionização DESI ao espectrômetro de massas - técnica chamada de DESI-MS, é possível obter resultados com rapidez, alta sensibilidade e alta especificidade (COOKS et al. 2006). CHEN et al. (2018) mostrou no seu estudo em que utilizou DESI-MS para diferenciar neoplasia

pulmonar de tecido normal, que a sensibilidade variou de 36,7 a 70% e a especificidade variou de 86,7 a 96,7%.

No método DESI-MS, um *spray* de gotículas de solventes eletricamente carregados é direcionado à amostra. Ao atingir determinado ponto da amostra em alta velocidade, as moléculas da amostra são dissolvidas nessas gotas eletricamente carregadas e são liberadas da superfície da amostra, nesse momento, portanto, é promovida a dessorção dos analitos da superfície e a ionização dos mesmos por transferência de carga. Com um fluxo de *spray* contínuo, as gotículas com íons da amostra são impulsionadas até a entrada do espectrômetro de massas onde são coletadas através do vácuo e analisadas no interior do espectrômetro de massas (EBERLIN et al. 2011) (Figura 2).

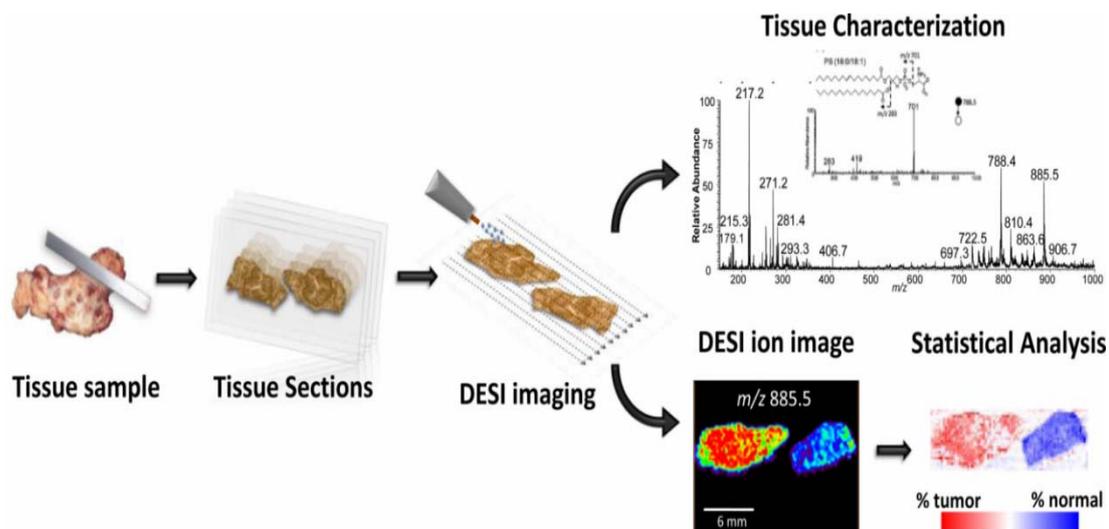


Fonte: Adaptado de COOKS et al. (2006).

Figura 2 - Representação esquemática do funcionamento da fonte de ionização do DESI-MS.

A fonte de ionização DESI permite o acoplamento a uma plataforma móvel, resultando em uma nova aplicação para a MS: a obtenção de imagens químicas bidimensionais que podem ser correlacionadas com a imagem histológica, técnica denominada *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging*, DESI-MSI (possível tradução para o português: Imageamento por Dessorção Induzida por Ionização *Electrospray* Acoplada à Espectrometria de Massas).

A técnica DESI-MSI analisa a amostra *in situ*, diretamente em uma lâmina, cobrindo toda a região bidimensionalmente. Tomando como exemplo a análise de um determinado tecido, é possível identificar a massa/carga (m/z) dos metabólitos presentes em cada região dessa amostra, além da intensidade relativa desses íons. Ainda pode-se correlacionar as imagens químicas formadas com as regiões histológicas na mesma lâmina corada com hematoxilina e eosina (*H&E*), posteriormente ao experimento (EBERLIN et al. 2011; PARROT et al. 2018) (Figura 3).



Fonte: EBERLIN et al. (2011)

Figura 3 - Esquema da formação de imagens químicas por DESI-MSI. As amostras de tecido congelado são seccionadas e montadas em lâminas de vidro, em seguida são diretamente analisadas por DESI-MS. Posteriormente são obtidos os espectros de massas e as imagens químicas que podem ser correlacionadas com as imagens histológicas.

1.6 DESI-MSI E O ESTUDO DOS LIPÍDIOS NA ONCOLOGIA

A partir do ano de 2010, a técnica DESI-MSI tem sido muito utilizada para estudar o perfil lipídico de tumores, buscando biomarcadores que possibilitem diferenciar os tecidos e auxiliar no seu diagnóstico (EBERLIN et al. 2010). Com essa correlação é possível saber se há diferentes intensidades relativas dos íons correspondentes a metabólitos em uma determinada área de tecido normal da mama quando comparada a uma região em que há tecido tumoral. Ainda é possível saber se uma área com necrose e uma área com tumor viável apresentam perfis lipídômicos diferentes (TATA et al. 2016).

As imagens químicas obtidas pelo DESI-MSI e sua interface com a análise anatomopatológica já foi utilizada na análise de diversos órgãos

humanos, diferenciando tecido normal de tecido tumoral de cérebro (EBERLIN et al. 2012), pulmão (CHEN et al. 2018), mama (CALLIGARIS et al. 2014; GUENTHER et al. 2015; PORCARI et al. 2018), estômago (EBERLIN et al. 2014), pâncreas (EBERLIN et al. 2016), próstata (KERIAN et al. 2015; BANERJEE et al. 2017; BRZOZOWSKI et al. 2018), testículo (MASTERSON et al. 2011), rim (DILL et al. 2010) e bexiga urinária (DILL et al. 2011); também foi usada na detecção de áreas de necrose em câncer de mama (TATA et al. 2016) e para diferenciar metástase de carcinoma da mama e carcinoma da tireoide em linfonodos, diferenciando o tecido linfoide do tecido metastático (ZHANG et al. 2017). Outra aplicação dessa técnica é no exame intraoperatório, fornecendo em poucos minutos informações sobre o tecido, se tumoral ou normal (EBERLIN et al. 2013; SANTAGATA et al. 2014).

Porém até o momento, não há estudos que utilizaram DESI-MSI na diferenciação dos FAs, TPs ou sarcomas do estroma da mama (SARC).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é obter e comparar os perfis lipidômicos dos tumores bifásicos da mama obtidos através da técnica DESI-MSI, propondo biomarcadores que diferenciem esses tumores tanto entre si, quanto em relação ao tecido histologicamente normal da mama.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

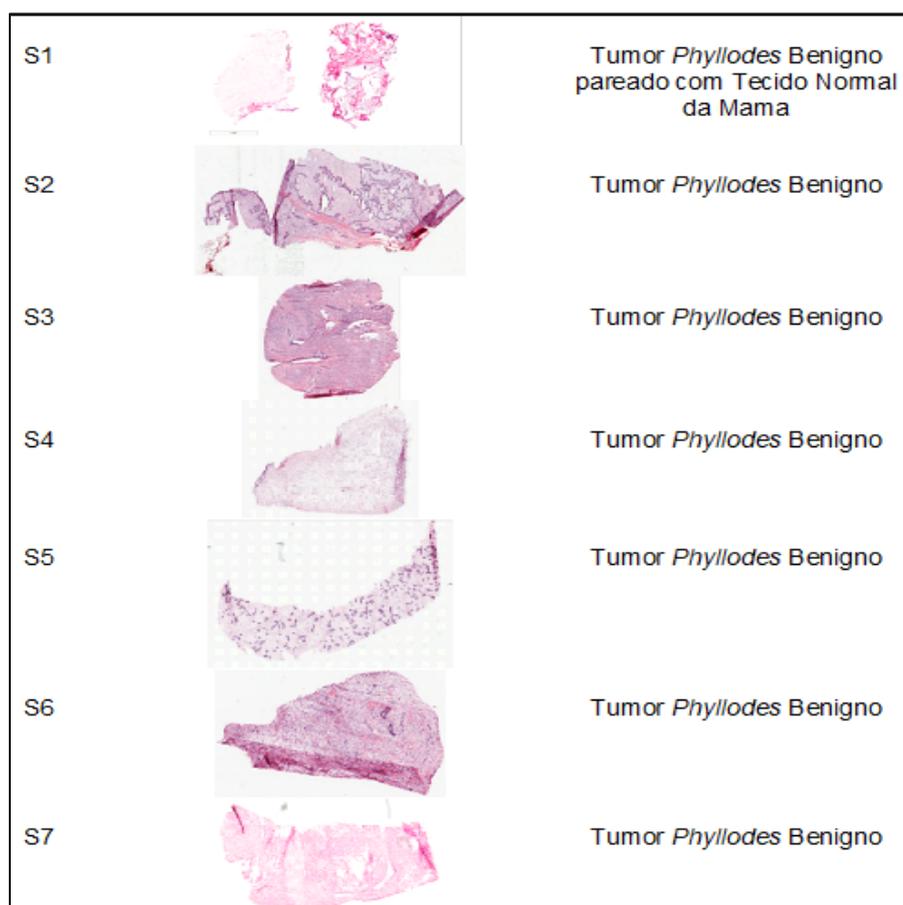
3.1 MATERIAIS

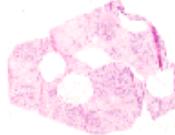
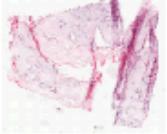
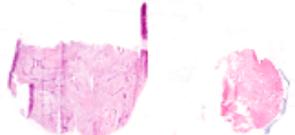
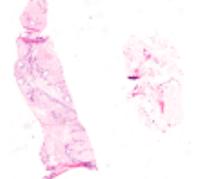
Foram incluídos no estudo pacientes de qualquer sexo e idade portadores de TPBs, TPBo ou TPM, além de pacientes com FA juvenil, complexo, mixóide ou hiper celular que tenham feito a exérese dessas lesões e cujo material biológico (tecido tumoral) tenha sido congelado e armazenado no Biobanco do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center ou nos biobancos do Instituto Nacional do Câncer (INCA) ou do Hospital do Câncer de Barretos. Essas amostras congeladas foram utilizadas para análise por DESI-MSI.

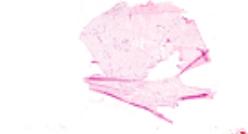
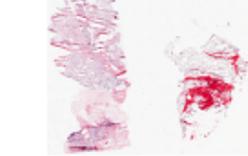
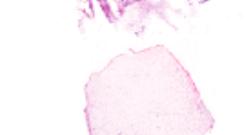
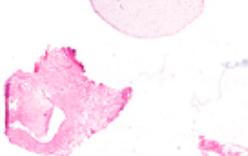
Selecionamos 2 FA juvenis, 2 FA complexos, 2 FA mixóides, 1 FA hiper celular, 10 TPB, 8 TPBo, 24 TPM e 2 SARCAs, algumas dessas amostras tinham tecido mamário normal pareado. Os diagnósticos histológicos foram feitos por patologistas especialistas em patologia mamária de cada hospital que forneceu as amostras (A.C.Camargo Cancer Center, INCA e Hospital de Barretos) e foram revisados pela patologista MBDCL para confirmar o diagnóstico previamente dado.

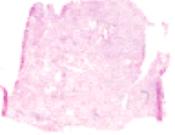
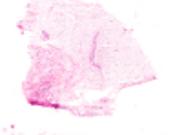
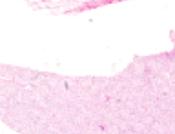
3.2 PREPARO DAS LÂMINAS

Os tecidos frescos congelados mantidos a -80°C , provenientes do biobanco do A.C. Camargo Cancer Center e dos biobancos do INCA e Hospital do Câncer de Barretos, foram cortados em criótomo a -30°C com espessura de 14 micrômetros; esses cortes foram postos em lâminas, algumas com a amostra tumoral pareada com tecido normal. As lâminas foram armazenadas a -80°C até o uso no DESI-MSI. De cada caso foram confeccionadas 3 lâminas, uma lâmina de cada caso foi corada com *H&E* (Figura 4). As outras lâminas foram utilizadas no DESI-MSI.



S8		Tumor <i>Phyllodes</i> Benigno pareado com Tecido Normal da Mama
S9		Tumor <i>Phyllodes</i> Benigno
S10		Tumor <i>Phyllodes</i> Benigno pareado com Tecido Normal da Mama
S11		Tumor <i>Phyllodes</i> <i>borderline</i>
S12		Tecido mamário histologicamente normal
S13		Tumor <i>Phyllodes</i> <i>borderline</i> pareado com Tecido Normal da Mama
S14		Tumor <i>Phyllodes</i> <i>borderline</i>
S15		Tumor <i>Phyllodes</i> <i>borderline</i> pareado com Tecido Normal da Mama
S16		Tumor <i>Phyllodes</i> <i>borderline</i> pareado com Tecido Normal da Mama
S17		Tumor <i>Phyllodes</i> <i>borderline</i> pareado com Tecido Normal da Mama
S18		Tumor <i>Phyllodes</i> <i>borderline</i> pareado com Tecido Normal da Mama

S19		Tumor <i>Phyllodes</i> <i>borderline</i>
S20		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno pareado com Tecido Normal da Mama
S21		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno pareado com Tecido Normal da Mama
S22		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno pareado com Tecido Normal da Mama
S23		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno
S24		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno
S25		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno
S26		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno pareado com Tecido Normal da Mama
S27		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno
S28		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno
S29		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno pareado com Tecido Normal da Mama

S30		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno
S31		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno
S32		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno
S33		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno
S34		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno
S35		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno
S36		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno
S37		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno
S38		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno
S39		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno
S40		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno
S41		Tumor <i>Phyllodes</i> Maligno

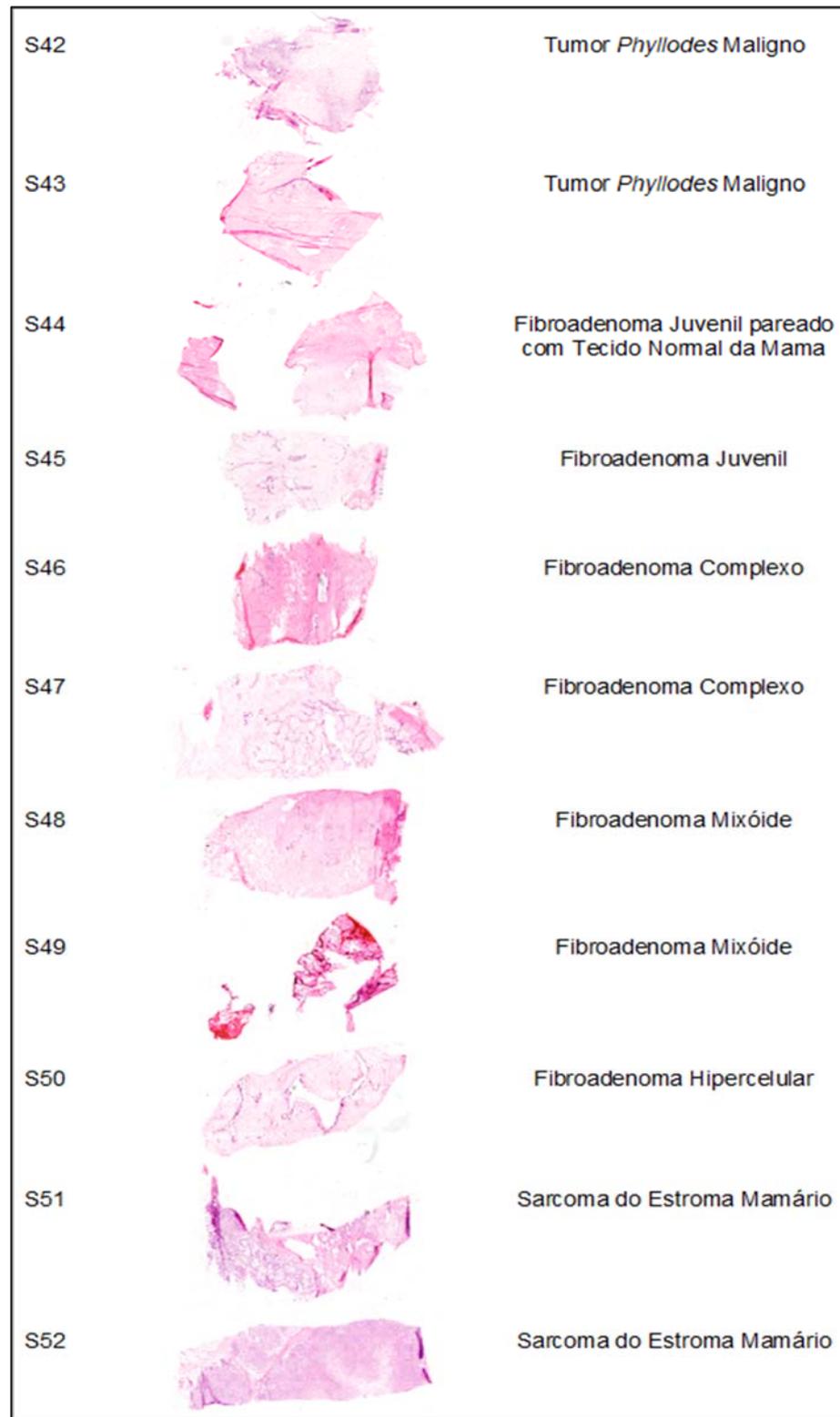


Figura 4 - Cortes histológicos corados com *H&E*, diagnosticados no exame anatomopatológico com base nos critérios da OMS.

3.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

As lâminas coradas com *H&E* foram analisadas em um microscópio óptico Olympus BX-52 e posteriormente escaneadas através do ScanScope XT (*Aperio Technologies*). As imagens obtidas após o escaneamento foram visualizadas através do *software ImageScope (Aperio ePathology Leica)*. Nessa etapa as regiões de interesse contendo áreas tumorais e áreas de tecido normal foram demarcadas pela patologista MBCL (Figura 5). As amostras foram separadas por grupos de acordo com cada tipo histológico: fibroadenoma juvenil, complexo, mixóide e hiper celular; TPB, TPBo e TPM e SARC.



Figura 5 - Demarcação das regiões de interesse. À esquerda TPBo e à direita demarcação de área correspondente ao estroma mamário normal.

3.4 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE MASSAS

As lâminas que não foram coradas e que continham em sua superfície o tecido congelado dos diversos tumores em estudo, foram analisadas individualmente pela técnica DESI-MSI. Foi utilizado o espectrômetro de massas *Q Exactive Hybrid Quadrupole - Orbitrap* (Thermo Fisher Scientific - Alemanha) (Figura 6). Esse instrumento está situado no Laboratório Thomson do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP (Figuras 7 e 8). Ele apresenta um poder de resolução de 140.000 FWHM e um erro na precisão de massa de no máximo 5 partes por milhão (ppm).

Acoplado a esse instrumento havia uma fonte de ionização DESI (*Omni Spray Ion Source 2-D* modelo OS-3201 da empresa *Prosolia*, EUA) (Figura 9 e 10). Essa fonte de ionização é uma plataforma móvel capaz de executar movimentos bidimensionais.

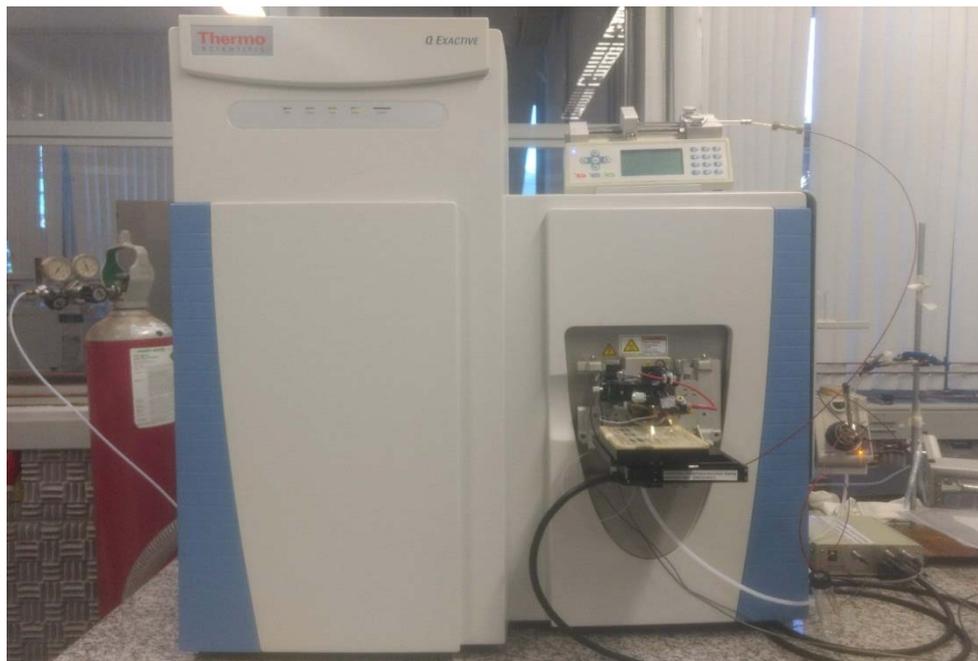


Figura 6 - Espectrômetro de massas (modelo Q Exactive) acoplado a uma plataforma móvel DESI (Omni Spray Ion Source 2-D modelo OS-3201).



Figura 7 - Laboratório de Espectrometria de Massas ThoMSon da Universidade de Campinas (UNICAMP).



Figura 8 - Laboratório de Espectrometria de Massas ThoMSon da Universidade de Campinas (UNICAMP).

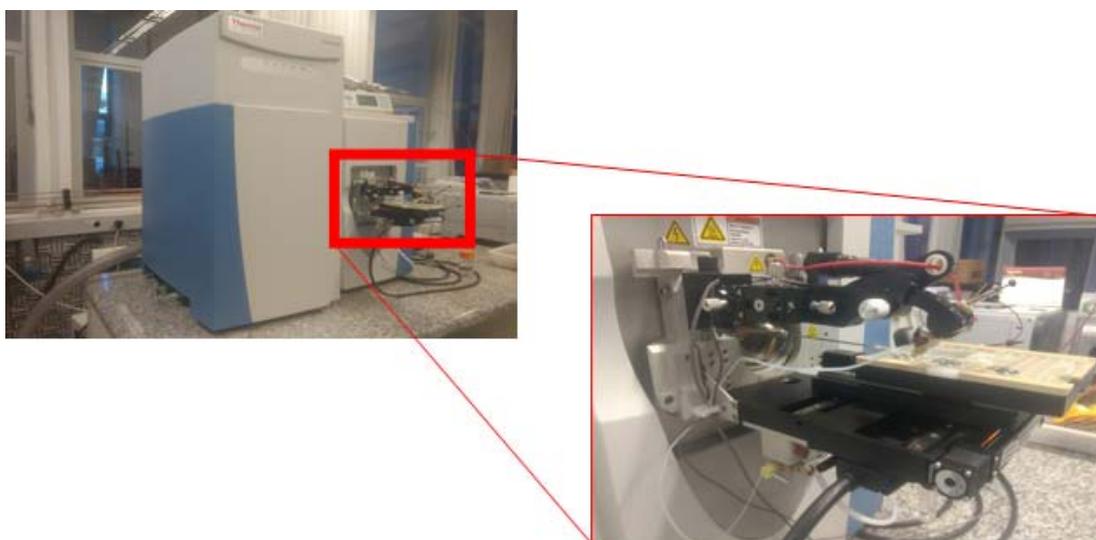
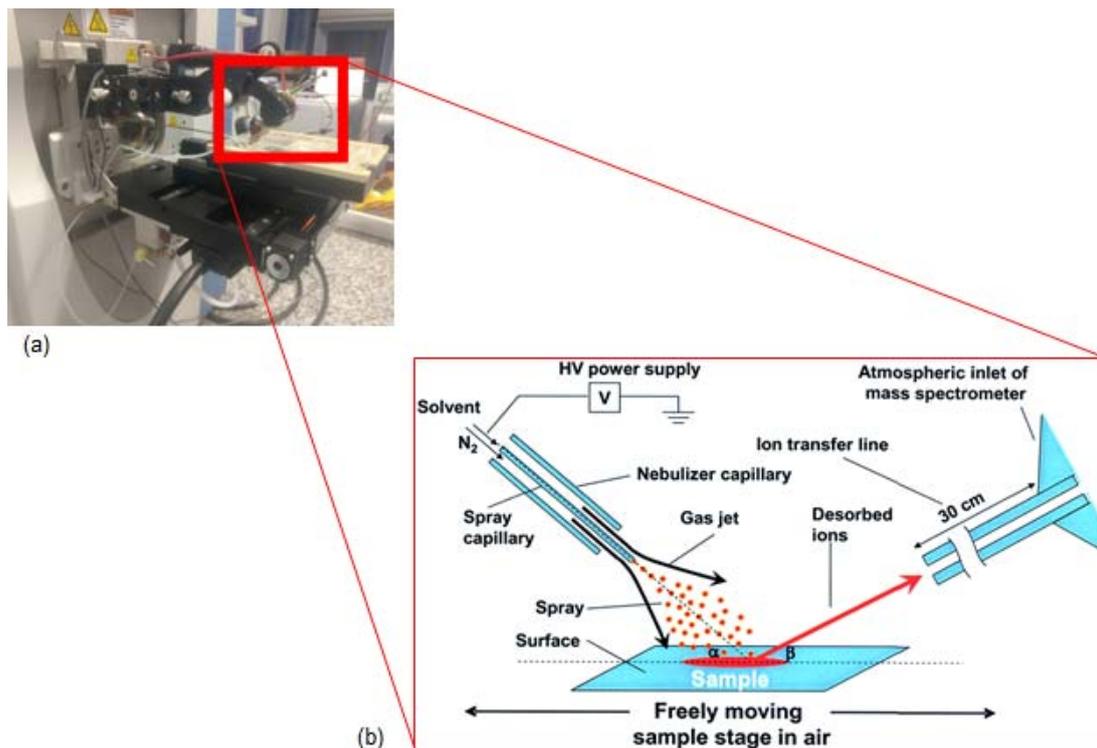


Figura 9 - À esquerda o espectrômetro de massas com a plataforma móvel acoplada, no detalhe à direita ampliação da imagem da plataforma móvel. Laboratório de Espectrometria de Massas ThoMSon da Universidade de Campinas (UNICAMP).



Fonte: (a) Arquivo pessoal, (b) TAKATS et al. (2004).

Figura 10 - Fonte DESI. a) fonte móvel acoplada ao espectrômetro. b) esquema de como o *electrospray* atinge a amostra e as gotículas eletricamente carregadas são desorvidas e adentram o espectrômetro de massas.

Os parâmetros utilizados nesse estudo na operação do espectrômetro de massas e da fonte de ionização foram: voltagem do capilar de 5,0 kV, temperatura do capilar de 300°C, resolução de 70.000; o solvente utilizado para o *spray* foi metanol com o fluxo de 1,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ e a faixa de massa analisada foi de 100 a 1200 m/z nos modos de ionização negativo e positivo. As lâminas com as amostras congeladas foram postas na plataforma móvel, que se moveu com velocidade de 740 $\mu\text{m}/\text{seg}$ e passos de 200 μm entre cada linha sucessiva. O tamanho do *pixel* foi 200 μm x 200 μm . As condições apresentadas, inclusive a geometria da fonte, foram resultantes de uma

otimização do método para a obtenção da melhor resposta dos sinais e consequentemente, melhor resolução da imagem.

Os espectros de massas foram processados pelo *software Qual Browser XCalibur*. Para cada linha da amostra analisada, obtivemos um arquivo *.raw* que, aberto no *software XCalibur* nos forneceu um espectro de massas (Figura 11).

3.5 OBTENÇÃO DAS IMAGENS QUÍMICAS

Após a análise de cada amostra no DESI-MS obtivemos de 45 a 85 arquivos com a extensão *.raw*, para cada amostra. Cada arquivo *.raw* corresponde à análise de uma linha da amostra. A quantidade de arquivos com a extensão *.raw* variou de 45 a 85 conforme o tamanho da amostra, ou seja, amostras menores, após analisadas, tiveram menos arquivos *.raw* que amostras maiores. Os arquivos com extensão *.raw* foram abertos no *software XCalibur* no qual foi possível mapear cada amostra bidimensionalmente num gráfico *x/y* e adquirir o espectro de massas de cada ponto de cada topografia. Também, através do *software XCalibur* e dos arquivos *.raw* supracitados, é possível comparar vários pontos *x/y*, seja da mesma amostra ou de amostras diferentes.

Posteriormente, através do *software Firefly* (versão 2.1.05), os arquivos com a extensão *.raw* da mesma amostra foram convertidos em conjunto em um arquivo de imagem com extensão *.img* para ser utilizado no *software Biomap*, ou seja, para cada amostra foi obtido um arquivo *.img* que

corresponde ao conjunto dos arquivos *.raw* daquela mesma amostra (Figura 11).

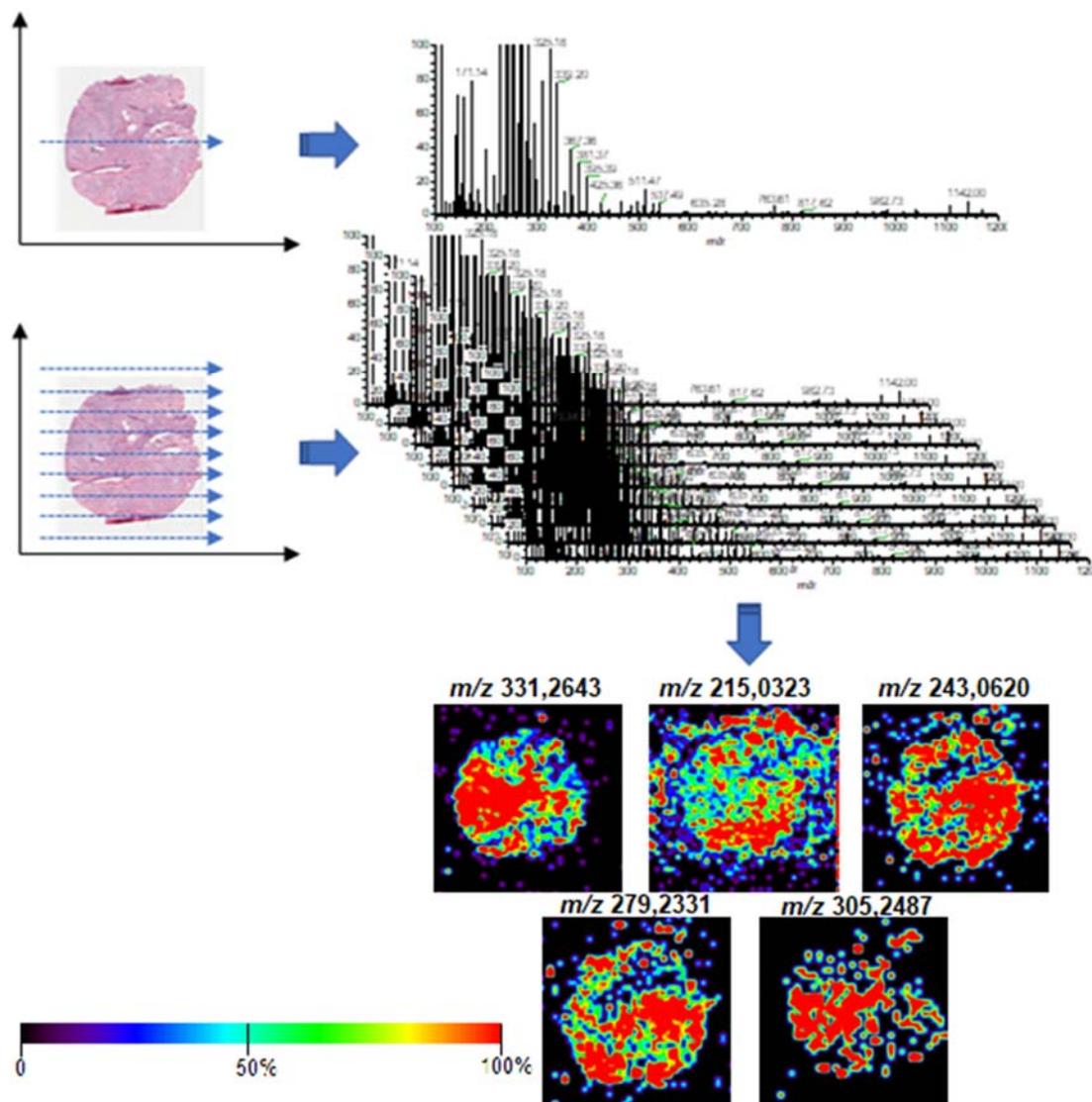


Figura 11 - Esquema representativo da formação das imagens químicas. A análise de cada linha da amostra gera um arquivo *.raw*. A análise de todas as linhas da amostra gera um conjunto de arquivos *.raw* que, quando convertidos em um só arquivo *.img*, nos fornece as imagens químicas.

3.6 PROCESSAMENTO DOS DADOS

O imageamento pelo DESI é feito da seguinte forma, cada arquivo *.img* nos fornece várias imagens químicas para cada amostra, cada uma dessas imagens químicas representa um determinado íon. Portanto, selecionamos visualmente todos os íons que deram imagem correspondente à imagem histológica. Após, identificamos as regiões de interesse no *H&E* e selecionamos a área correspondente no Biomap, para cada amostra. Após, obtivemos as listas das intensidades médias de cada íon em cada amostra, para cada região de interesse.

Os íons selecionados visualmente a partir das imagens químicas foram identificados nas listas das intensidades médias dos íons. Esses íons que geraram imagens químicas foram então utilizados para a realização das análises estatísticas, as quais foram efetuadas através do teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney* (BAUER 1972), para fazer as comparações entre diferentes tumores entre si e entre tumor e tecido mamário normal.

O esquema representativo abaixo mostra o passo a passo de como o estudo foi realizado (Figura 12).

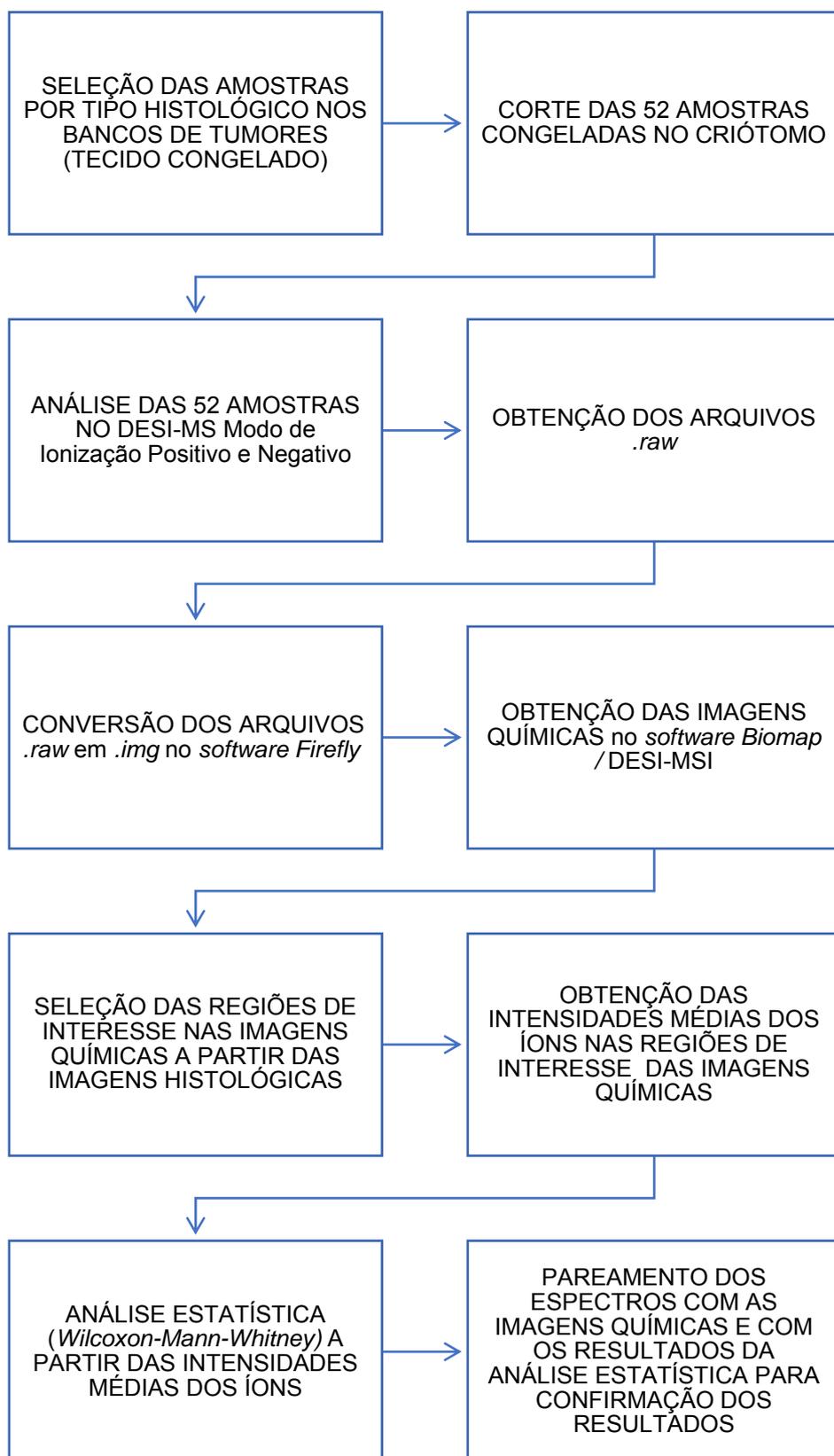


Figura 12 - Esquema representativo de como o estudo foi realizado.

4 RESULTADOS

4.1 DESI-MSI

As amostras foram analisadas por DESI-MSI e, após, os arquivos brutos foram convertidos em arquivos de imagens e processados no *software Biomap*. Cada imagem formada foi visualizada em sequência com intervalo de m/z 0,33Da. Essas imagens nos propiciam observar a distribuição de cada íon em um gráfico de cores tipo *rainbow*, cuja região topográfica com menor intensidade do íon apresenta a cor preta a roxa e a região com maior intensidade do íon apresenta a cor vermelha (Figura 13).

Observa-se também na Figura 13 que o íon m/z 135,0302 (referente ao possível metabólito Treonato) está presente em toda a região amostral, o que é verificado pela escala de cores, porém sua intensidade diferencia-se em cada área da amostra, em algumas áreas está com intensidade mais baixa (cor azul) e em outras com intensidade mais alta (cor vermelha). Verifica-se que o íon m/z 175,0240 (referente ao possível metabólito ácido ascórbico) está presente em alta intensidade (cor vermelha) em toda a região amostral, com poucas áreas em baixa intensidade.

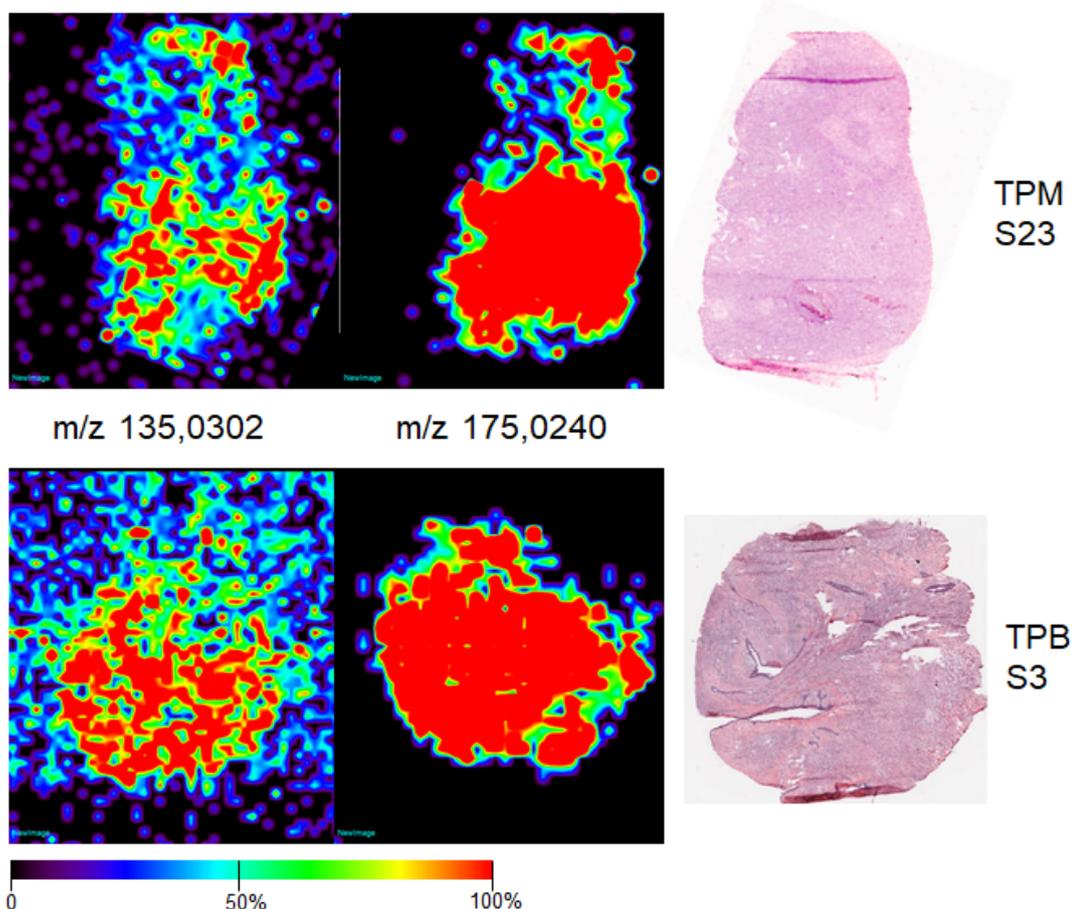
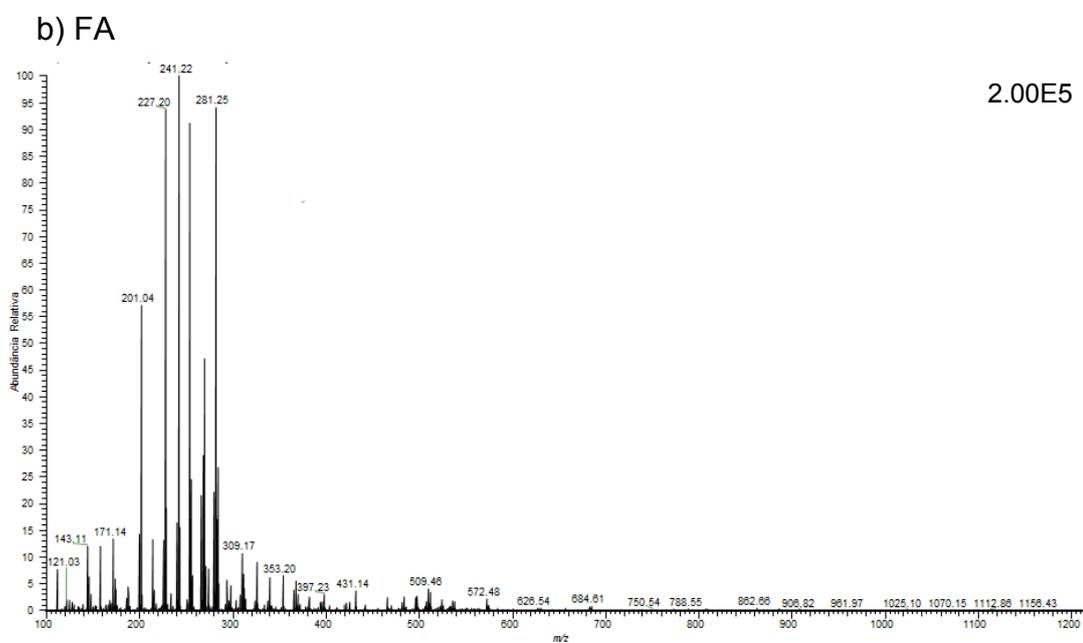
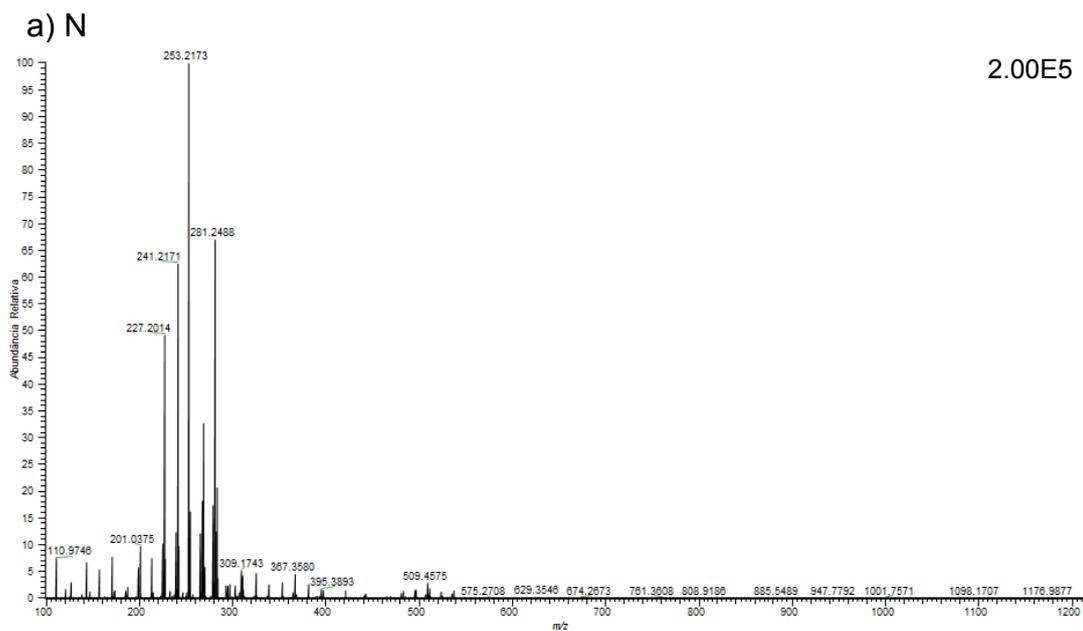


Figura 13 - Imagens químicas obtidas por ionização negativa por DESI-MSI dos íons m/z 135,0302 e 175,0240 no TPM e TPB. Amostras S23 e S3, respectivamente.

4.2 IONIZAÇÃO NO MODO NEGATIVO

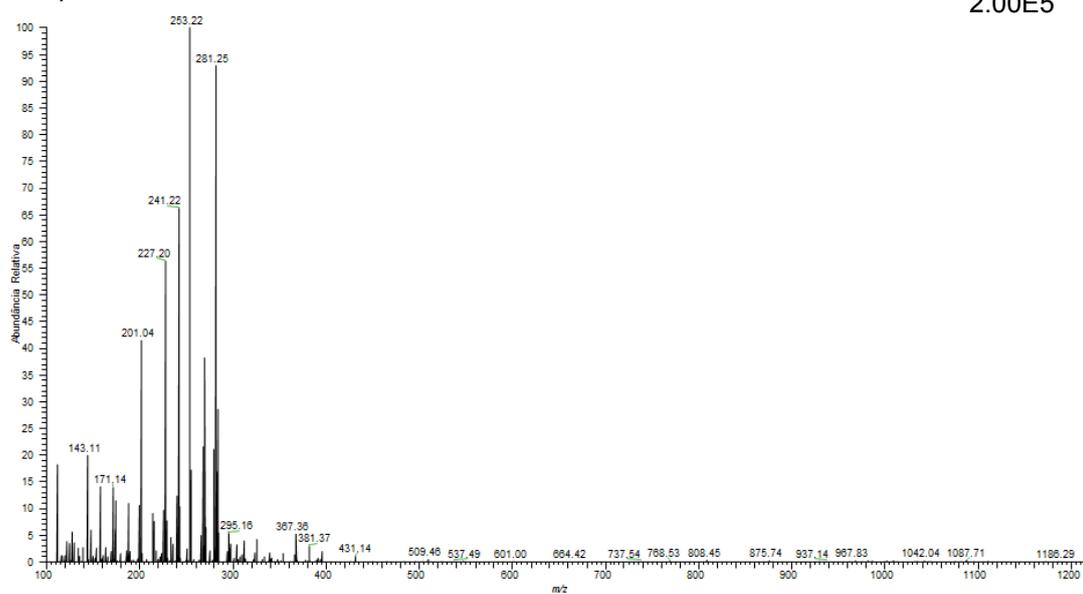
A comparação dos espectros de massas na faixa de m/z analisada (100-1200) (Figura 14) nos mostra diferenças entre a intensidade relativa dos metabólitos. Para se demonstrar a diferença do perfil lipídico em cada amostra utilizada neste trabalho, dividiu-se o espectro de massas em partes em que são mais propícias para cada tipo de lipídio, as Figuras 15 a 17 comparam cada uma com cada tipo de tecido. Na faixa de m/z 200-400, correspondente

aos ácidos graxos (Figura 15), ou na faixa de m/z 500-650, correspondente aos dímeros de ácidos graxos (Figura 16) e também na faixa de m/z 700-1000, correspondente aos glicerofosfolipídios e esfingolipídios (Figura 17) observamos diferenças entre os espectros de massas.



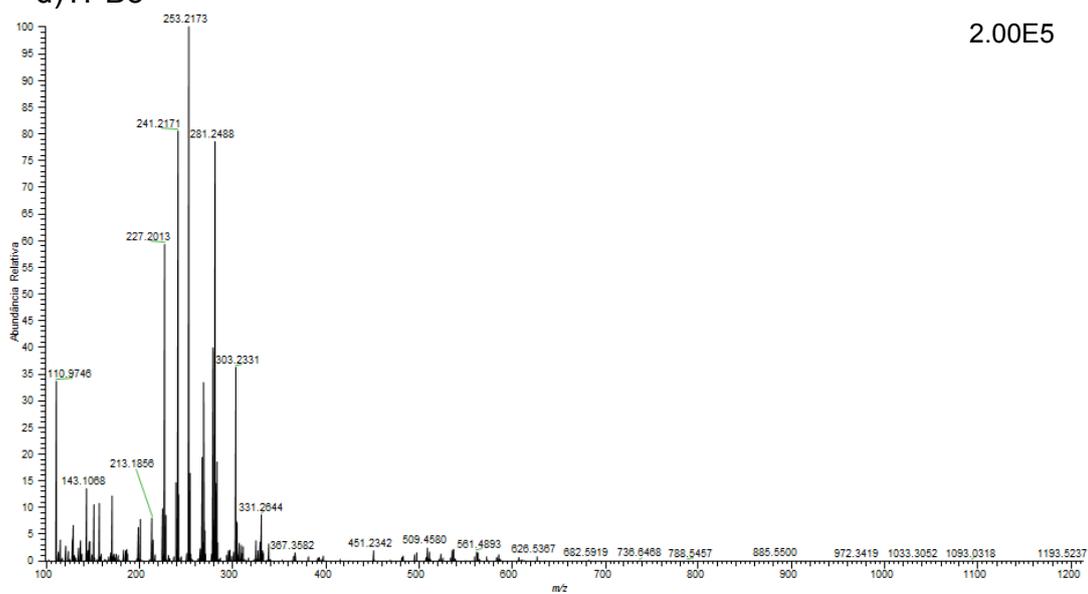
c) TPB

2.00E5

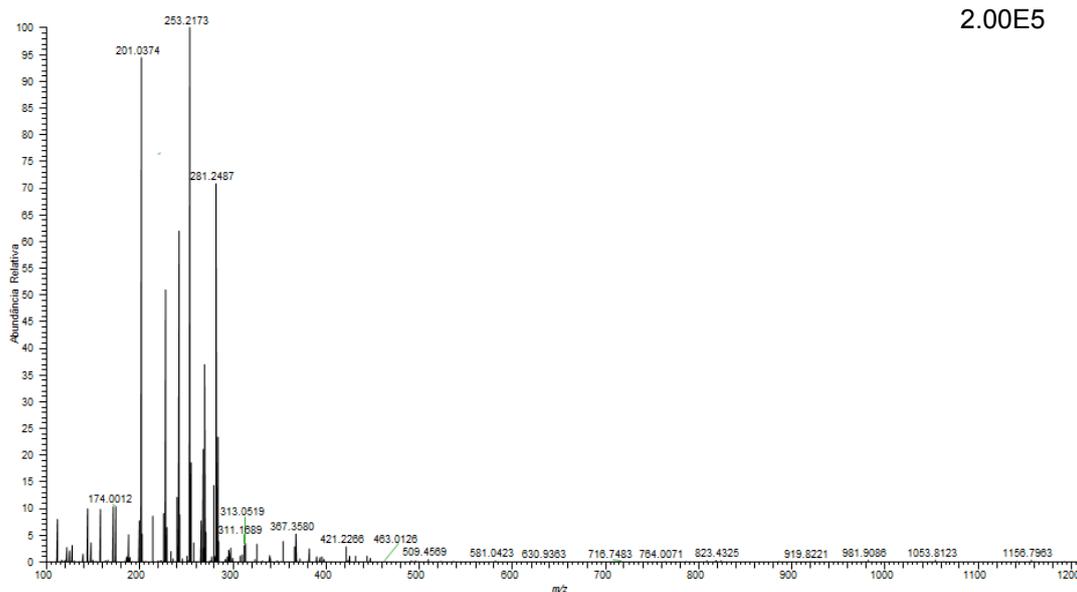


d) TPBo

2.00E5



e) TPM



f) SARC

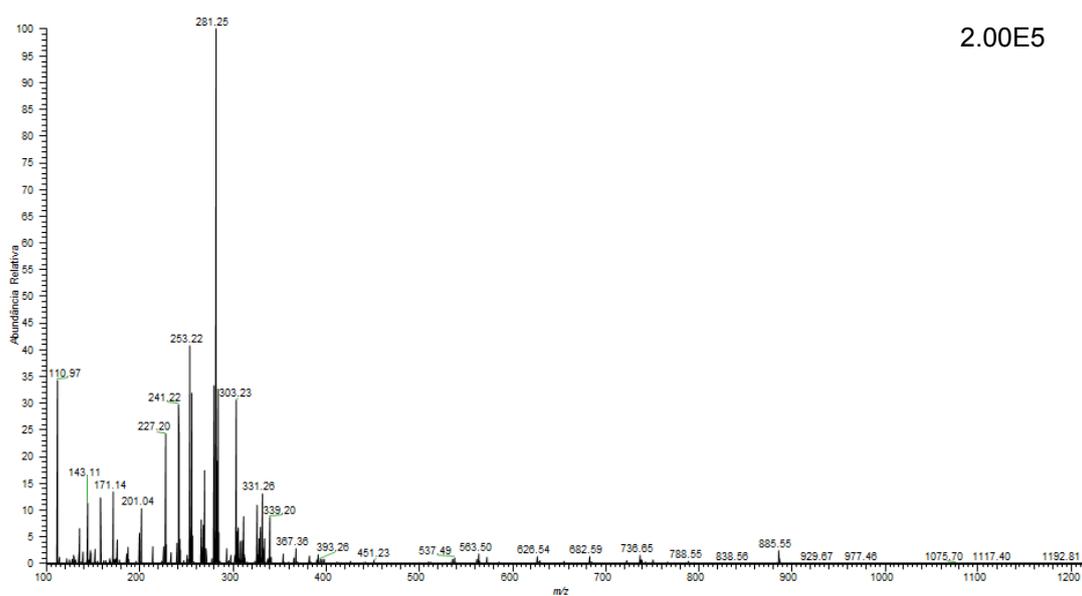
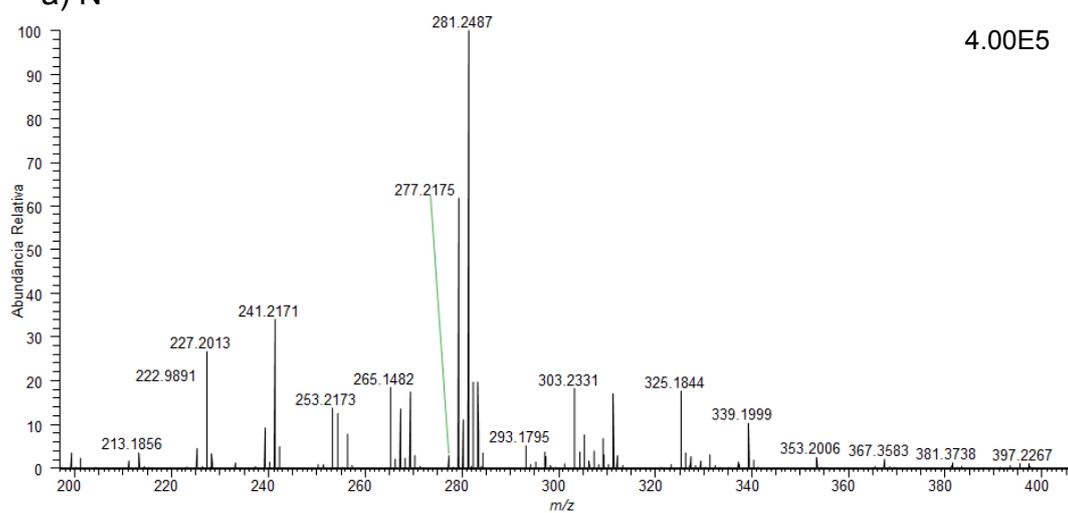


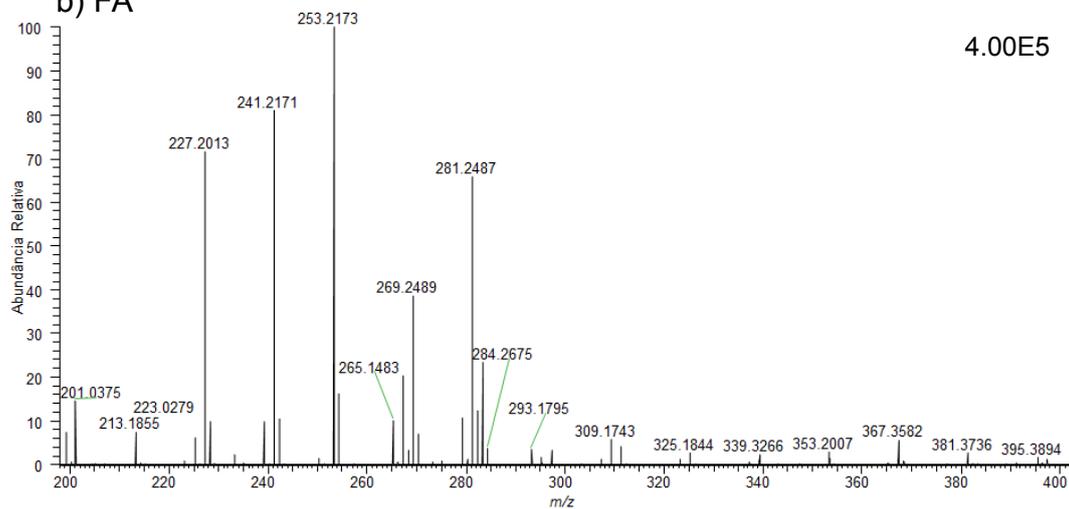
Figura 14 - Perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa m/z 100 a 1200. a) N; b) FA; c) TPB; d) TPBo; e) TPM; e f) SARC.

a) N



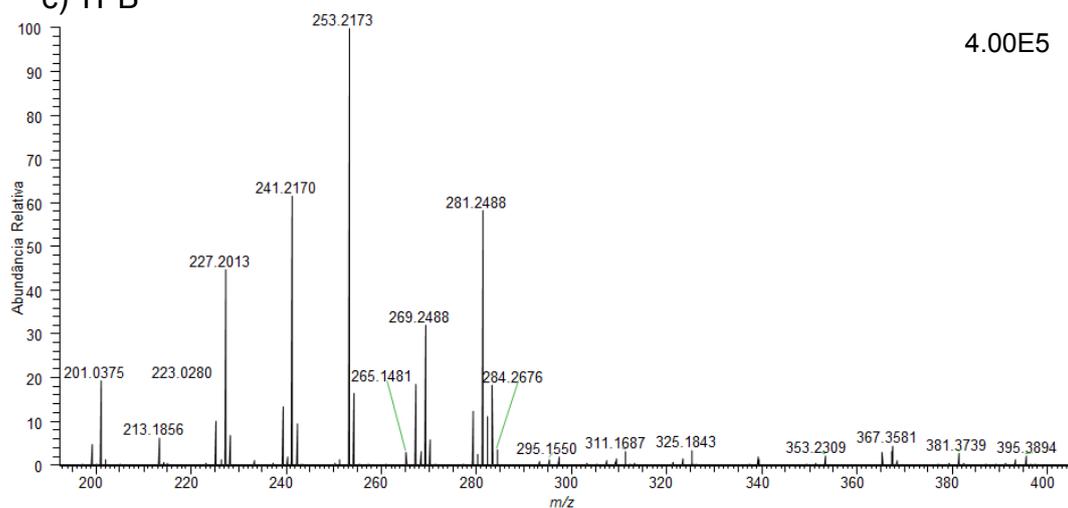
4.00E5

b) FA



4.00E5

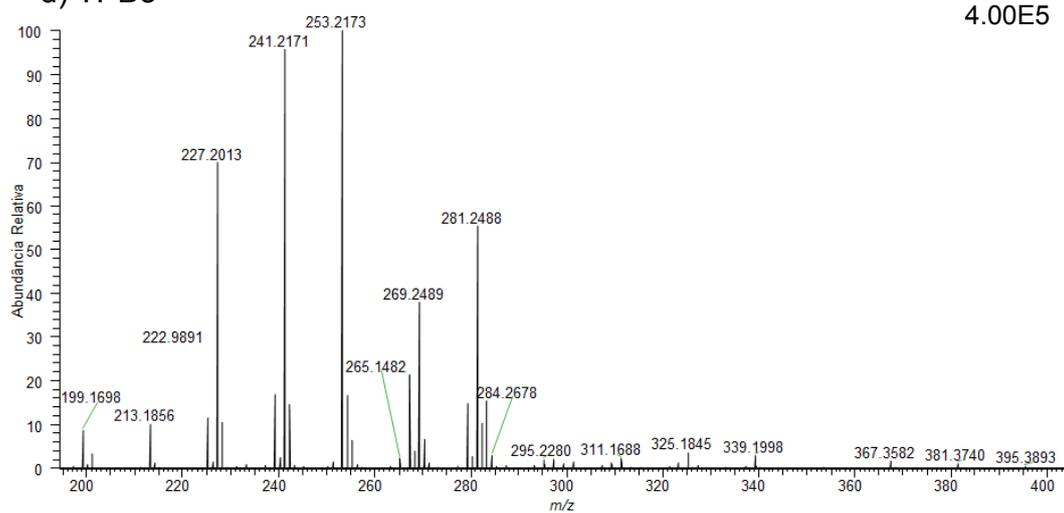
c) TPB



4.00E5

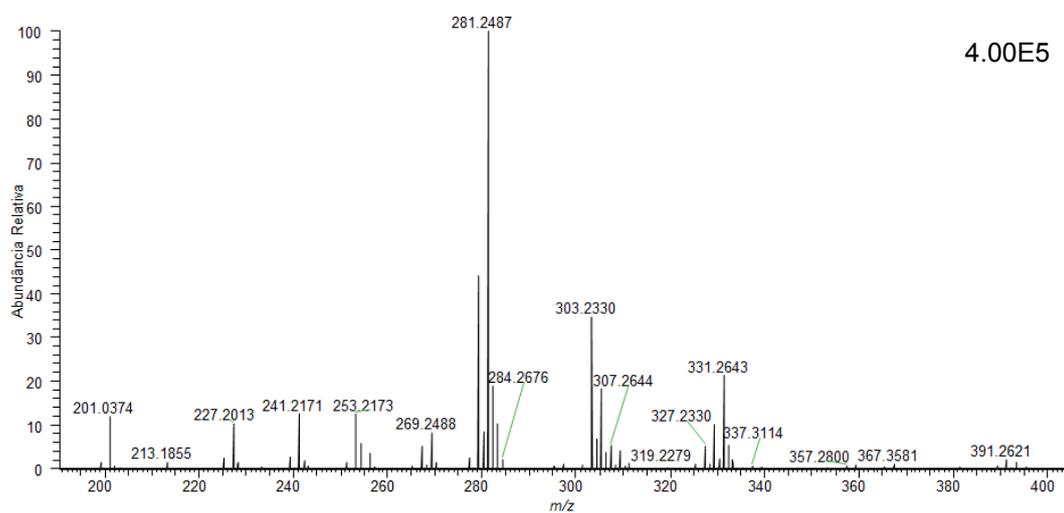
d) TPBo

4.00E5



e) TPM

4.00E5



f) SARC

3.00E5

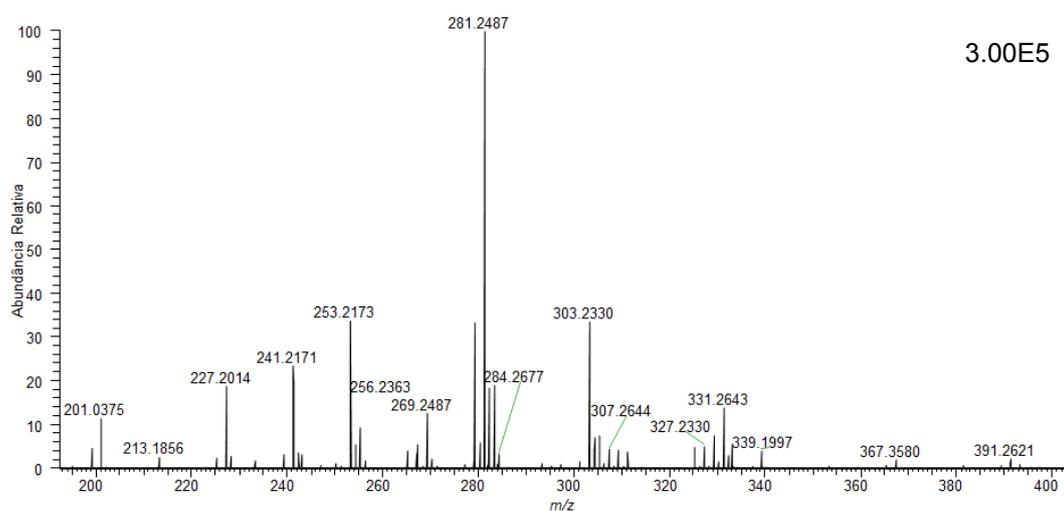
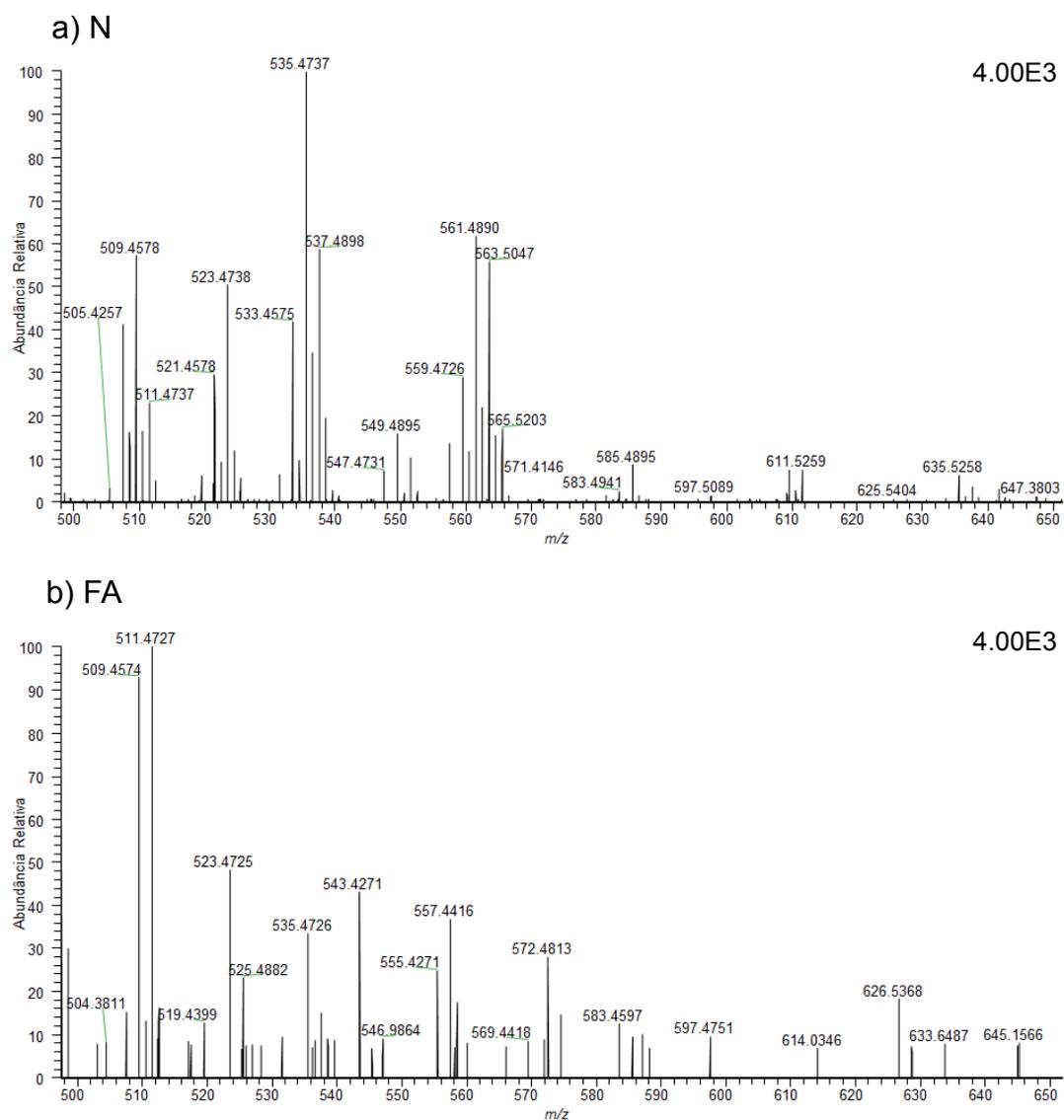
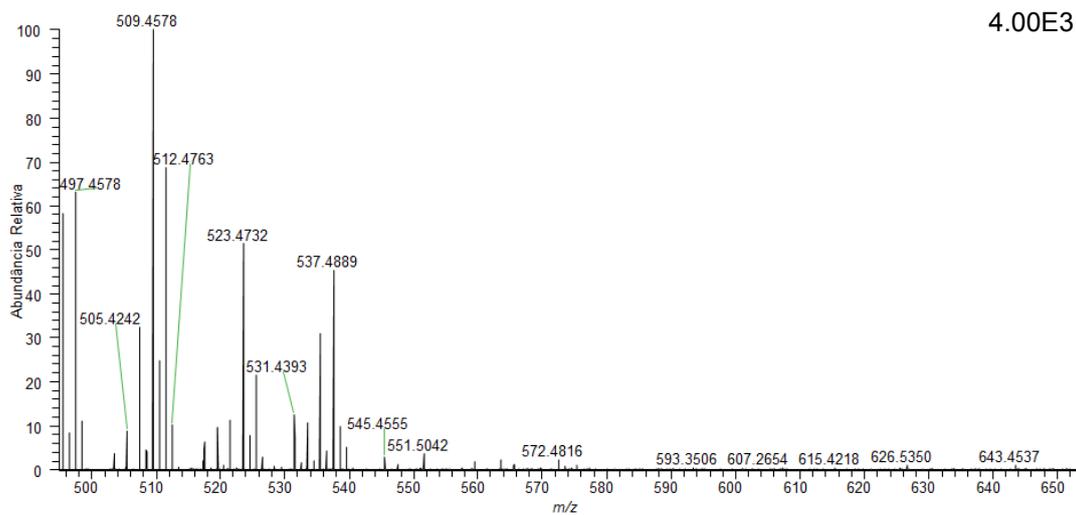


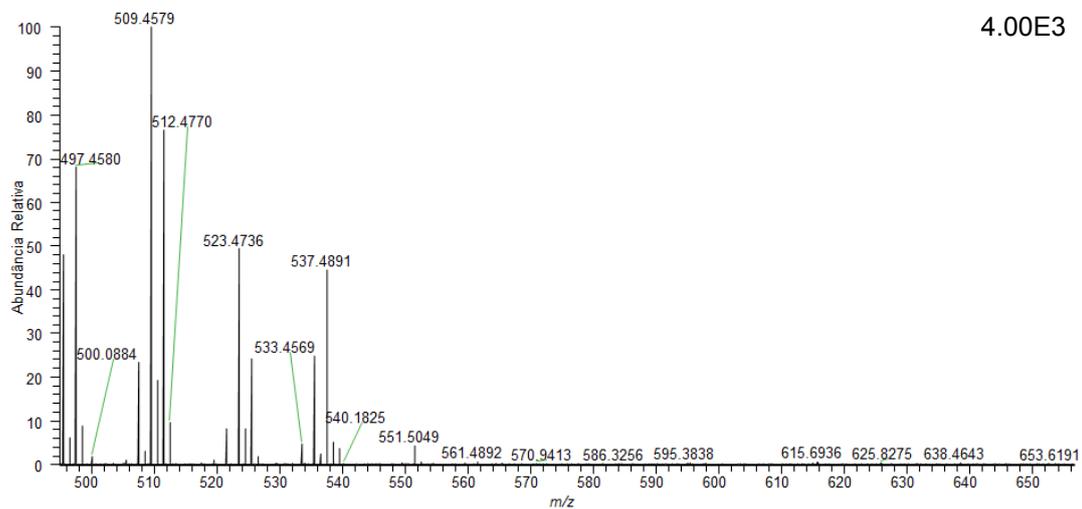
Figura 15 - Perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa de m/z 200-400, correspondente aos ácidos graxos. a) N; b) FA; c) TPB; d) TPBo; e) TPM; e f) SARC.



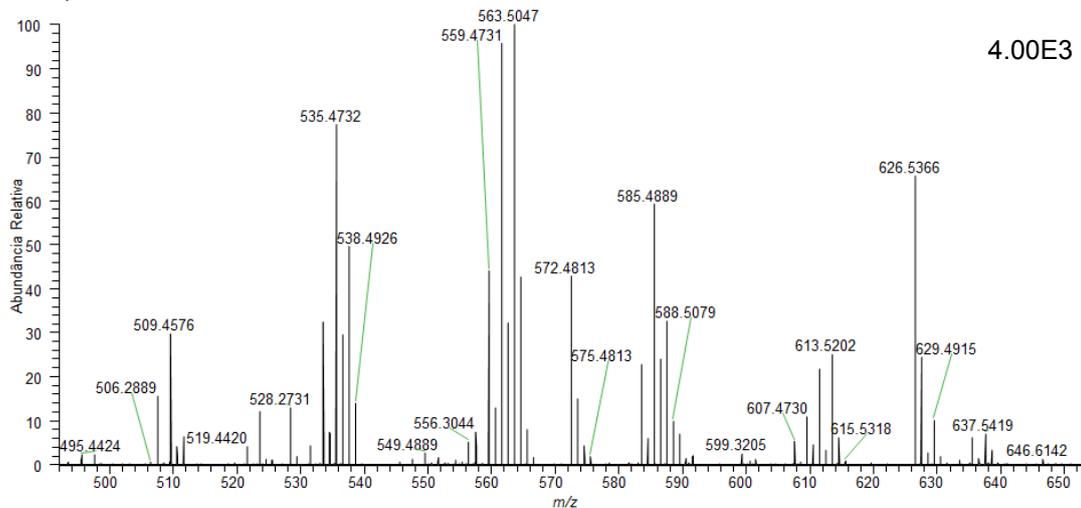
c) TPB



d) TPBo



e) TPM



f) SARC

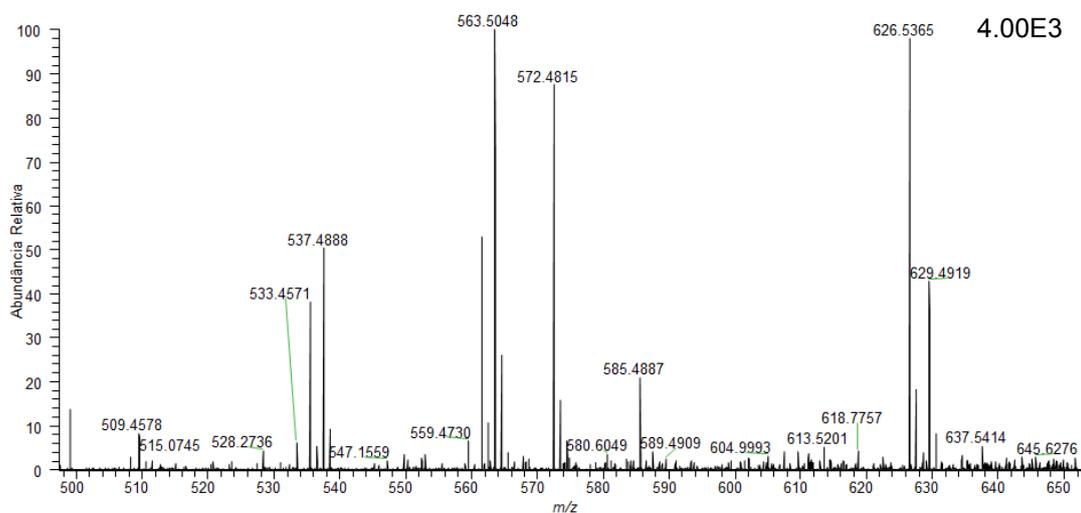
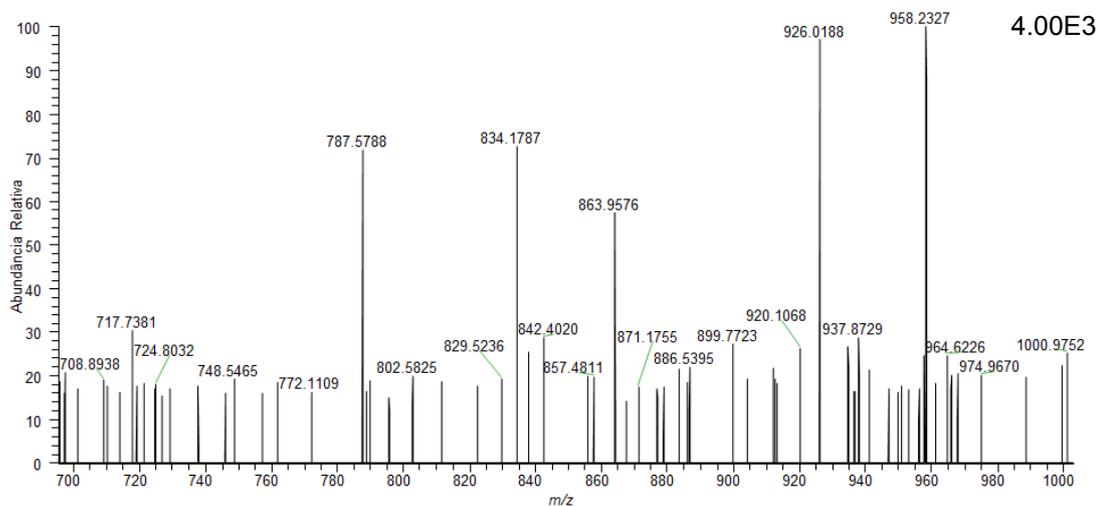
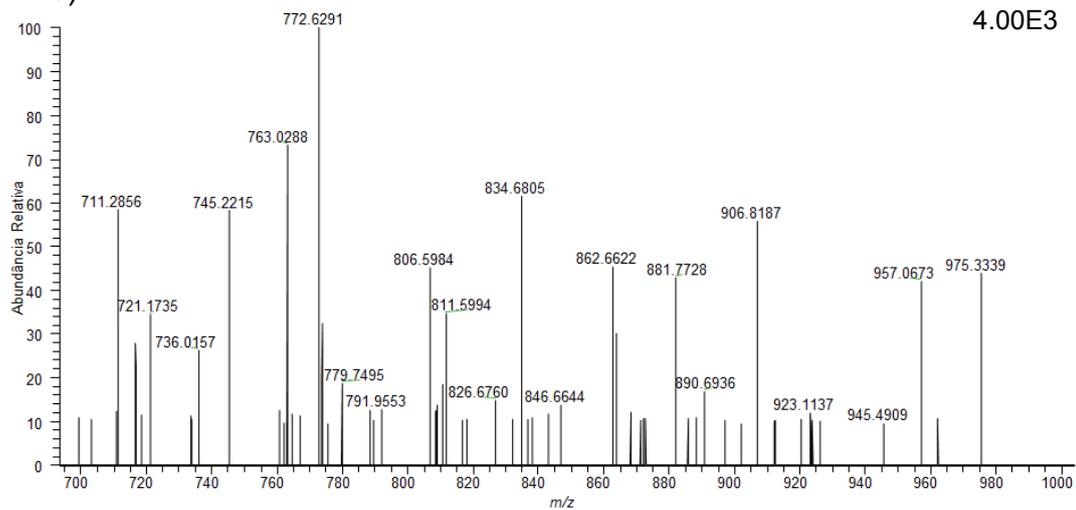


Figura 16 - Perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa de m/z 500-650, correspondente aos dímeros de ácidos graxos. a) N; b) FA; c) TPB; d) TPBo; e) TPM; e f) SARC.

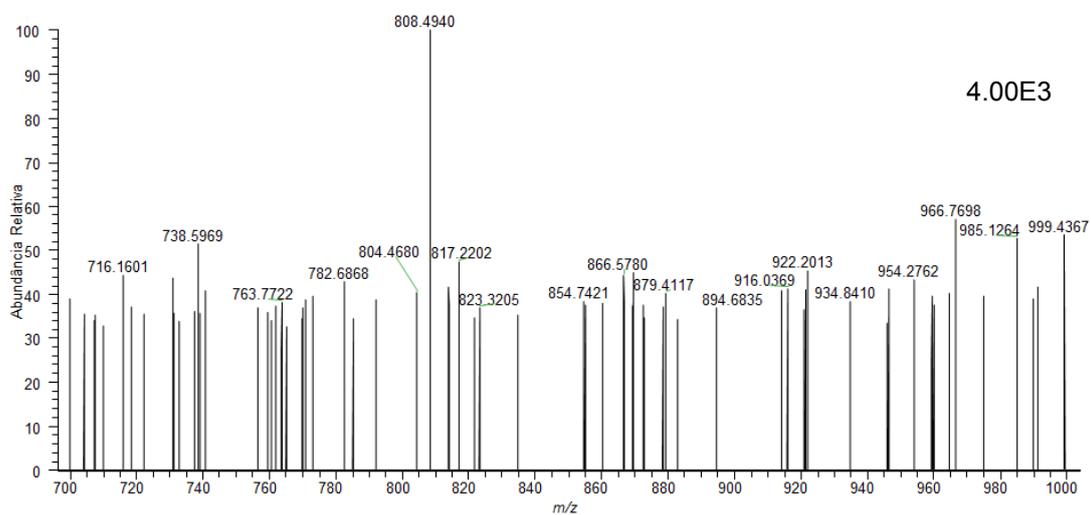
a) N



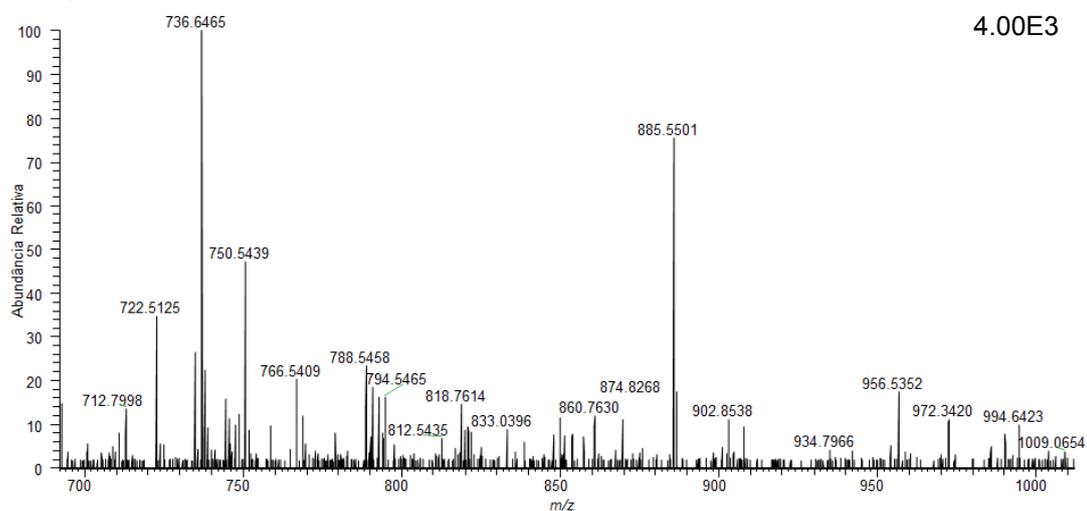
b) FA



c) TPB



d) TPBo



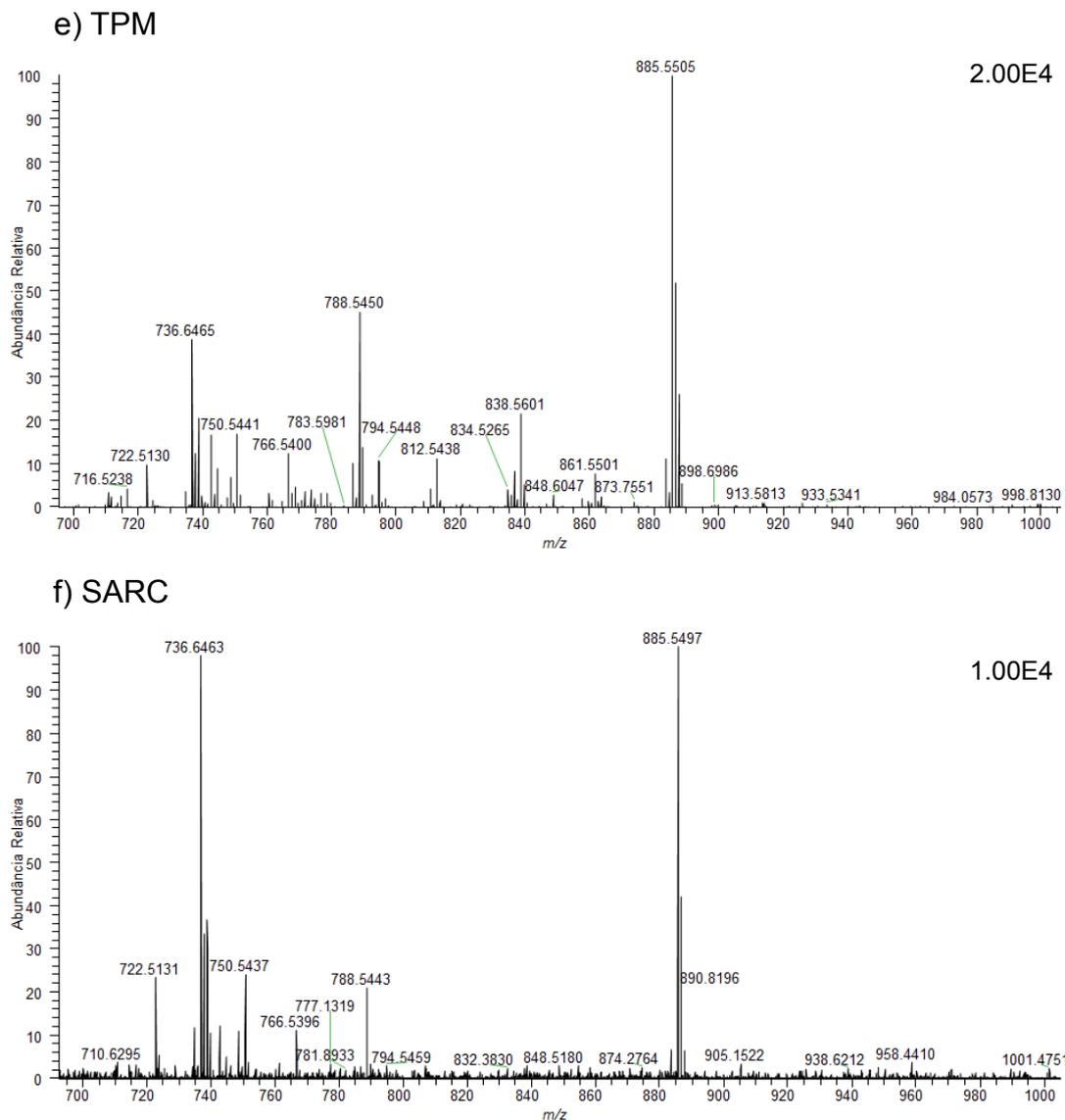
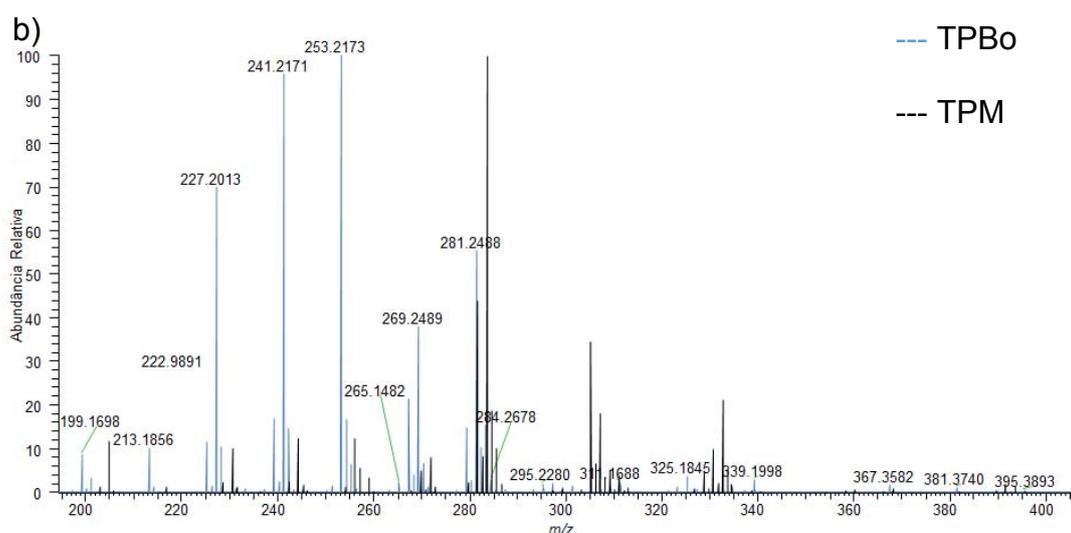
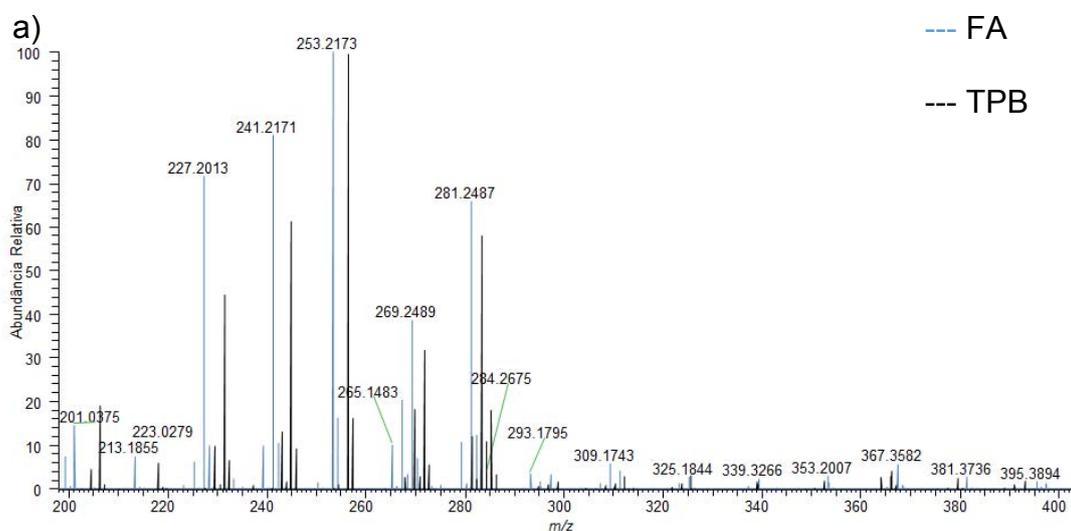


Figura 17 - Perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa de m/z 700-1000, correspondentes aos glicerofosfolipídios e esfingolipídios. a) N; b) FA; c) TPB; d) TPBo; e) TPM; e f) SARC.

A seguir é possível comparar no mesmo plano cartesiano as semelhanças e diferenças entre os espectros de massas entre os diferentes tipos de tecido. A Figura 18 apresenta sobreposições dos perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa de m/z 200-400, correspondente aos ácidos graxos. A Figura 18.a apresenta o

perfil do FA em azul e o perfil do TPB em preto; a Figura 18.b apresenta o perfil do TPBo em azul e o perfil do TPM preto; e na Figura 18.c apresenta o perfil do TPM em azul e o perfil do SARC em preto. O mesmo é feito para a faixa de m/z 500-650 (Figura 19), quanto na faixa de m/z 700-1000 (Figura 20). A Figura 21 mostra a comparação entre os espectros do tecido histologicamente normal da mama e o TPM na faixa de m/z .100-1200.



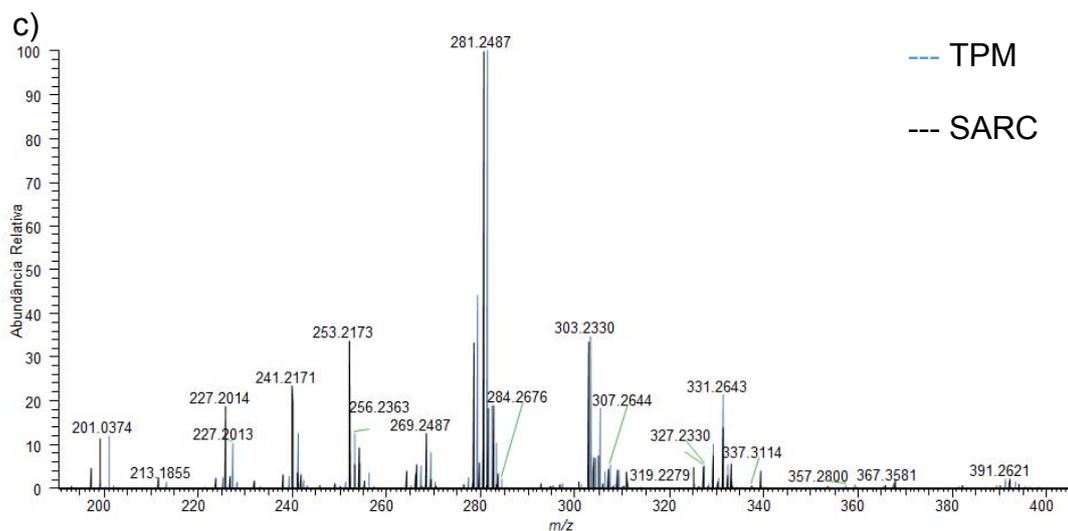
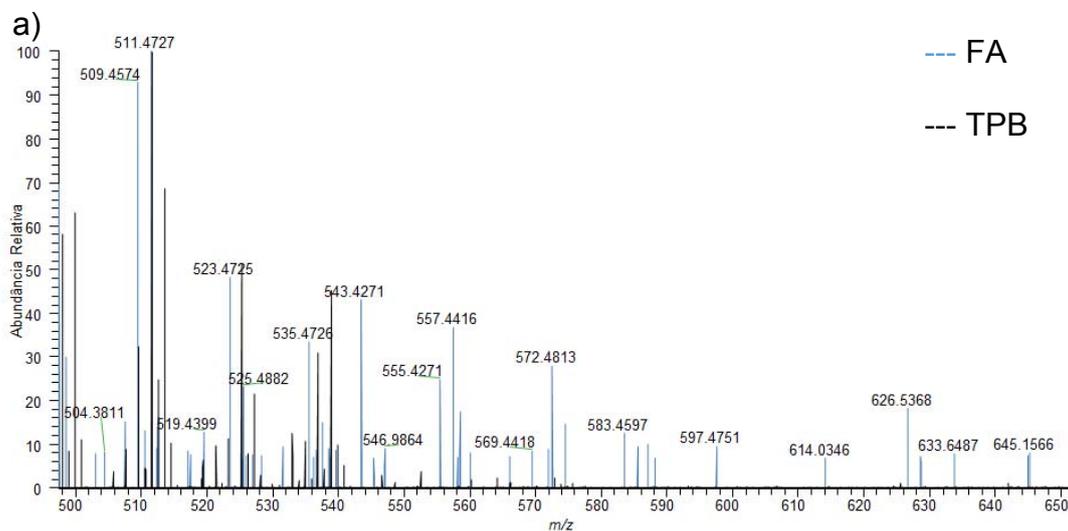


Figura 18 - Sobreposição dos perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa de m/z 200-400, correspondente aos ácidos graxos. a) FA com espectro de massas em azul e TPB com espectro de massas em preto; b) TPBo com espectro de massas em azul e TPM com espectro de massas em preto e c) TPM com espectro de massas em azul e SARC com espectro de massas em preto.



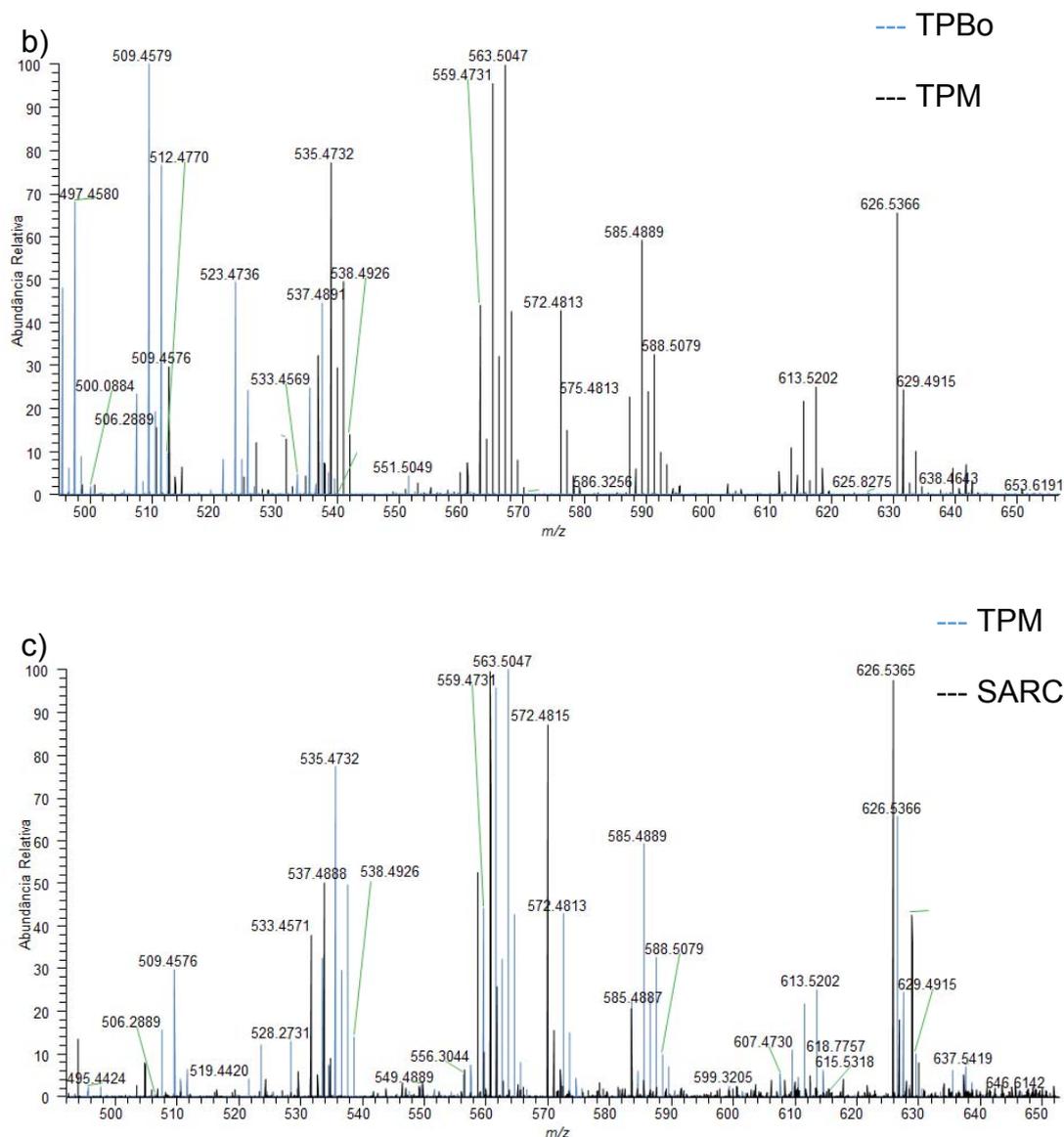


Figura 19 - Sobreposição dos perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa de m/z 500-650, correspondente aos dímeros de ácidos graxos. a) FA com espectro de massas em azul e TPB com espectro de massas em preto; b) TPBo com espectro de massas em azul e TPM com espectro de massas em preto e c) TPM com espectro de massas em azul e SARC com espectro de massas em preto.

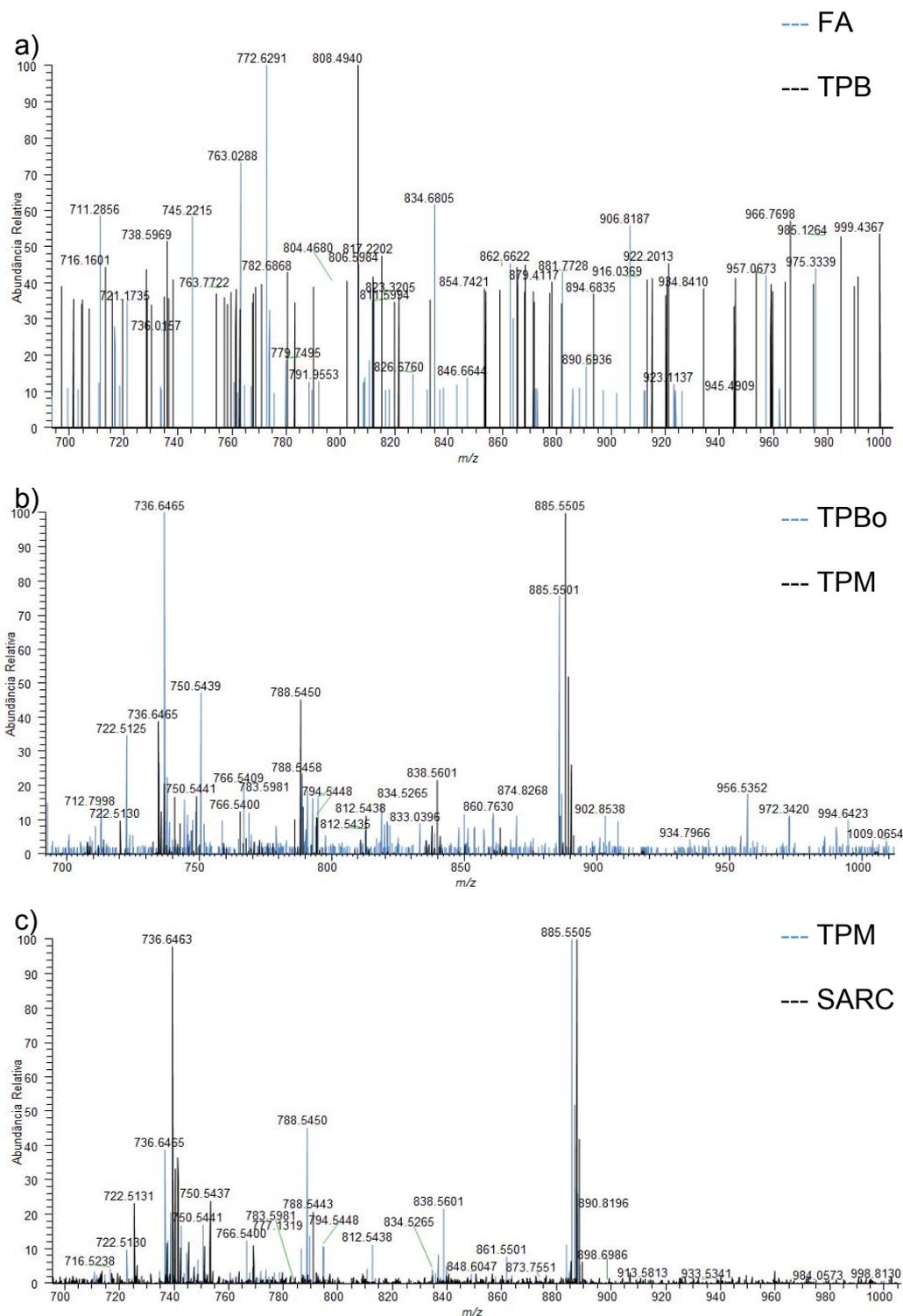


Figura 20 - Sobreposição dos perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa de m/z 700-1000, correspondente aos glicerosfolipídios e esfingolipídios. a) FA com espectro de massas em azul e TPB com espectro de massas em preto; b) TPBo com espectro de massas em azul e TPM com espectro de massas em preto e c) TPM com espectro de massas em azul e SAR com espectro de massas em preto.

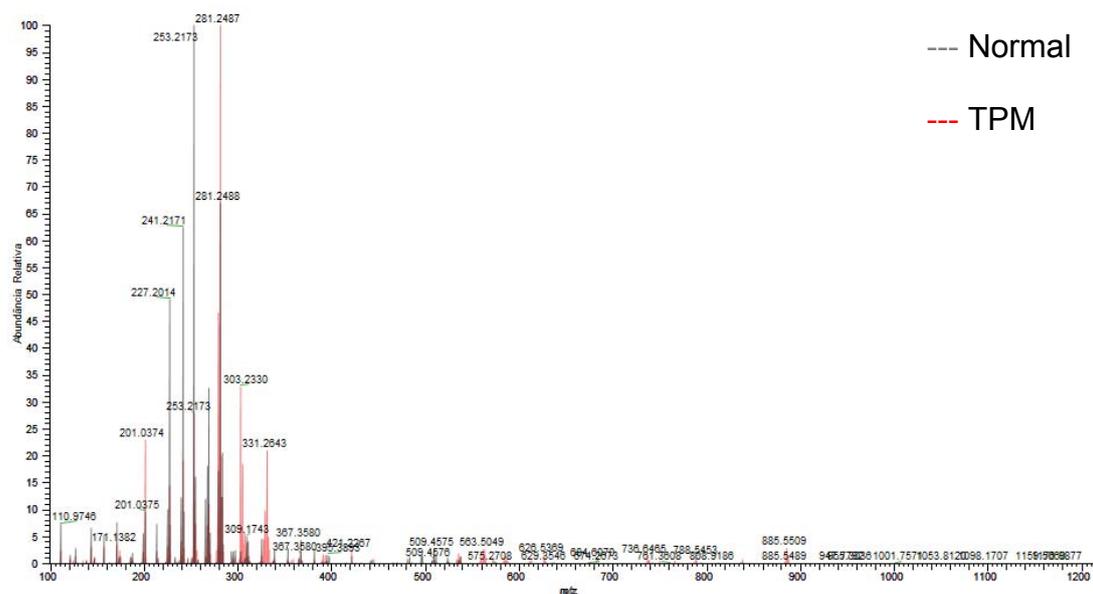


Figura 21 - Sobreposição dos perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa de m/z 100-1200. Tecido histologicamente normal em cinza e TPM em vermelho.

Comparando espectros e imagens químicas na mesma escala, observamos que o íon m/z 175,0240, correspondente possivelmente ao ácido ascórbico, teve maior intensidade relativa no SARC e TPM, comparando com TPB, FA e tecido histologicamente normal (Figuras 22 e 23).

m/z 175,0240

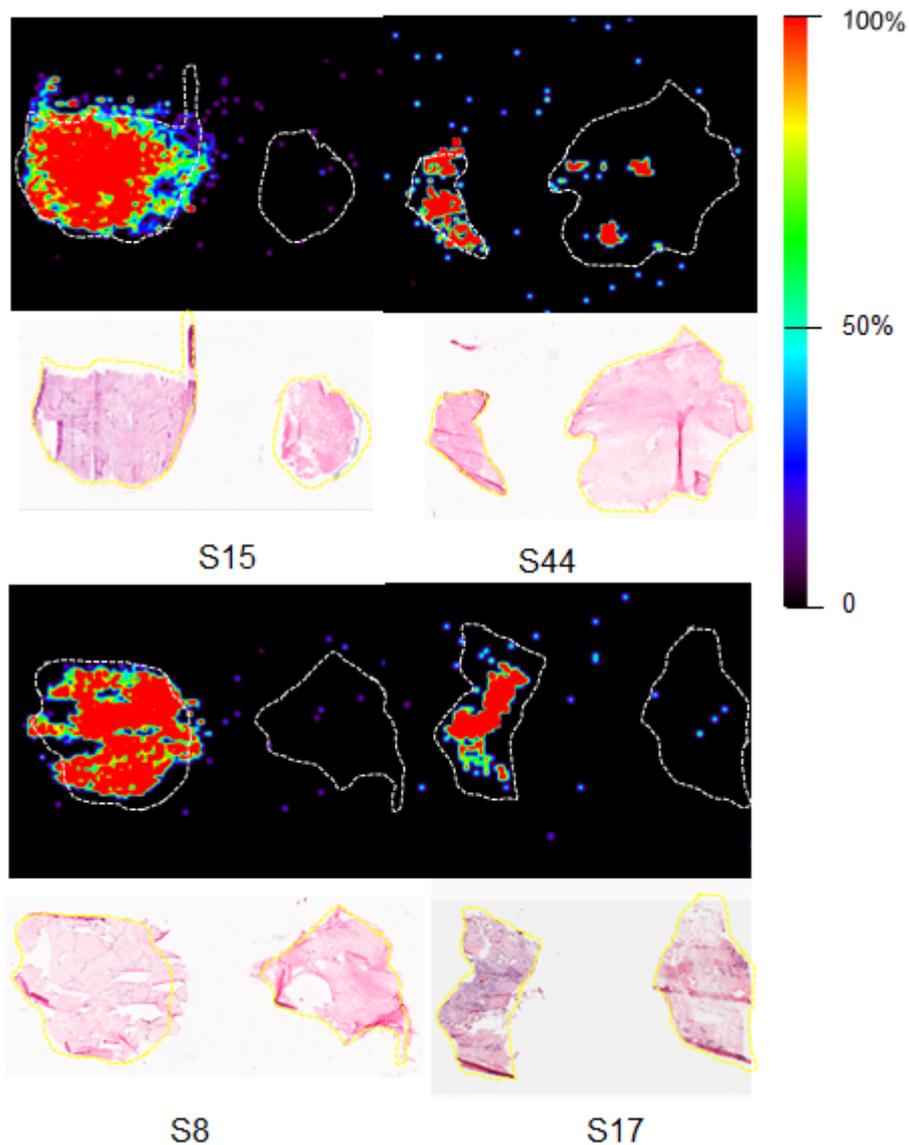
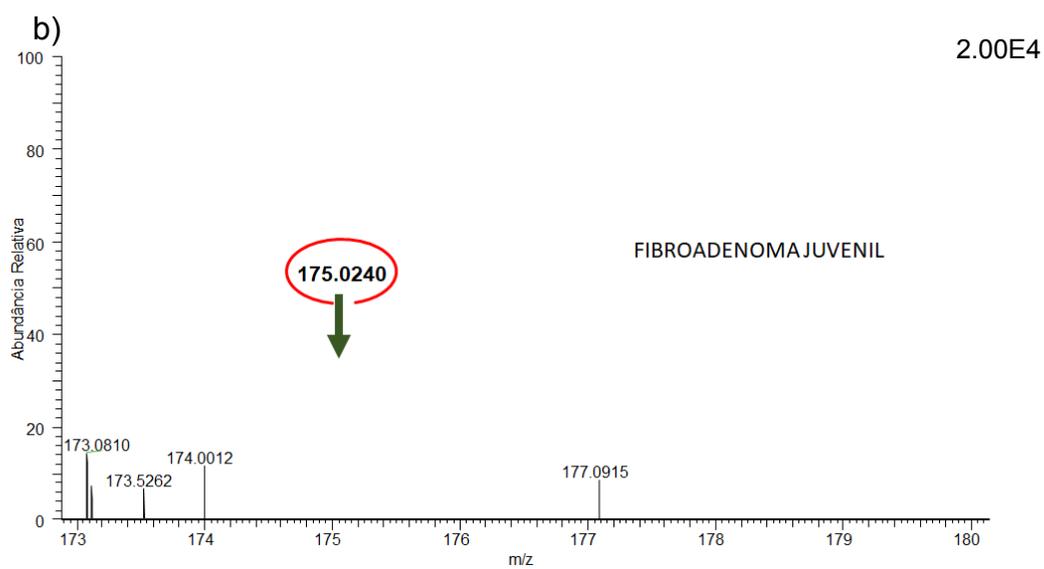
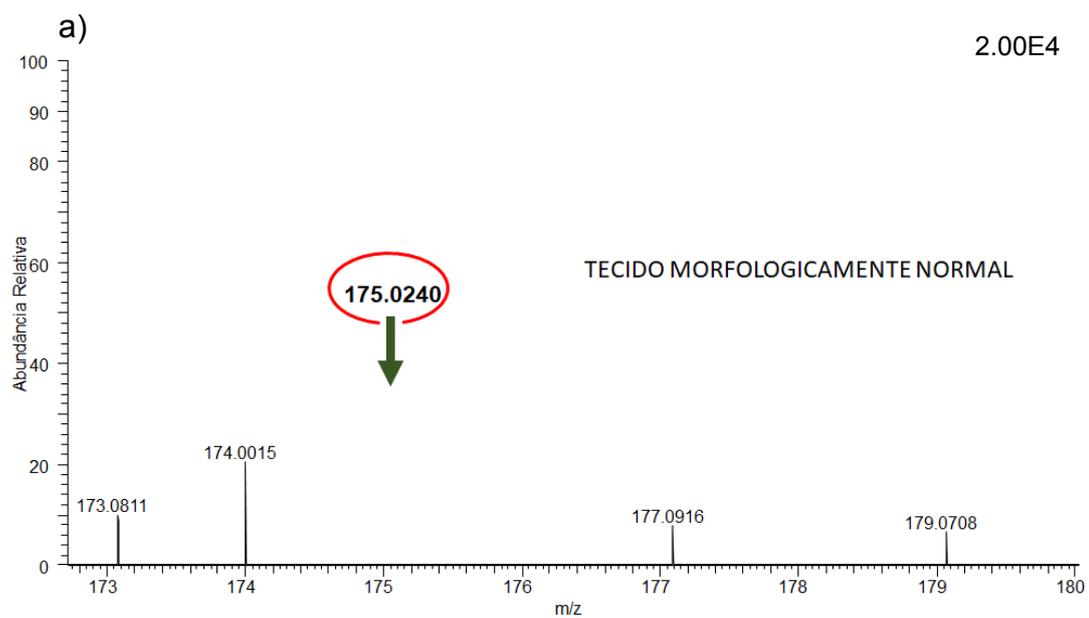
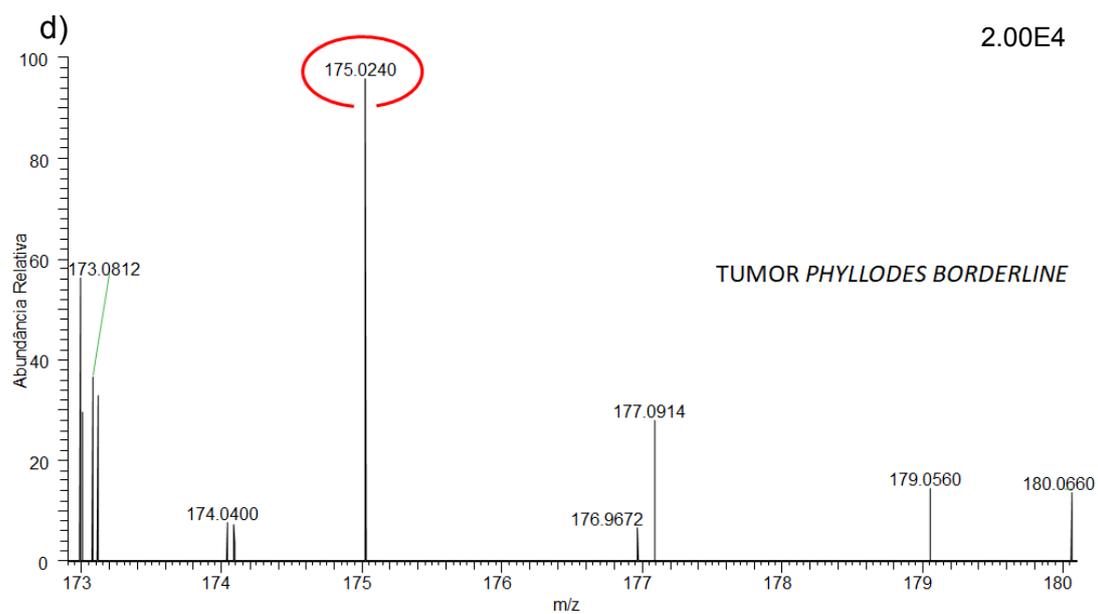
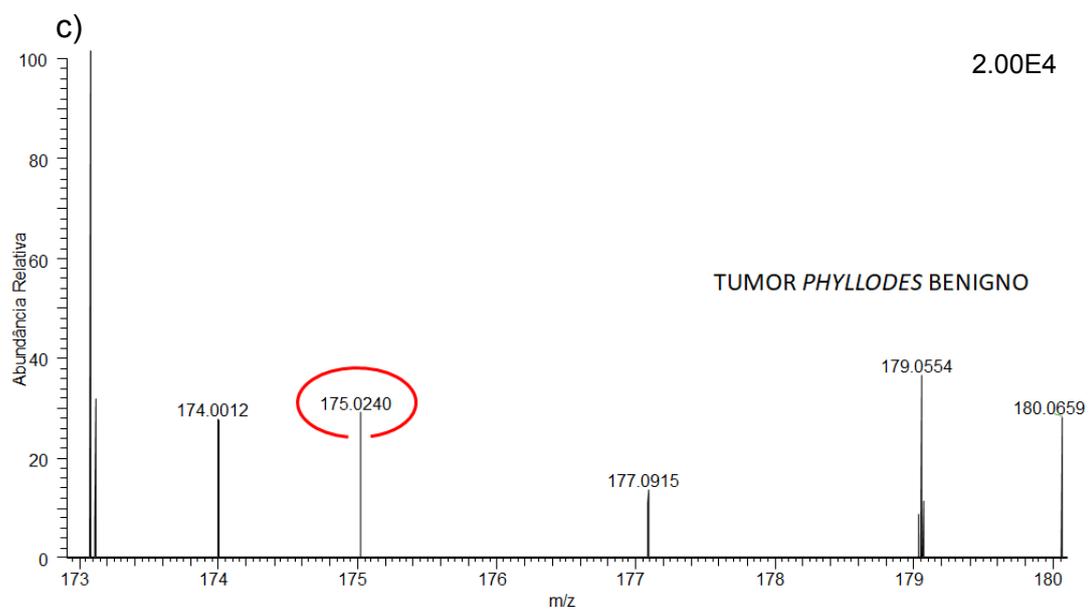


Figura 22 - Imagens químicas obtidas por DESI-MSI do íon m/z 175,0240, pareadas com as imagens histológicas correspondentes. Tumor à esquerda e tecido histologicamente normal à direita. O íon m/z 175,0240 teve maior intensidade relativa no tecido neoplásico, comparado ao tecido normal da mama.





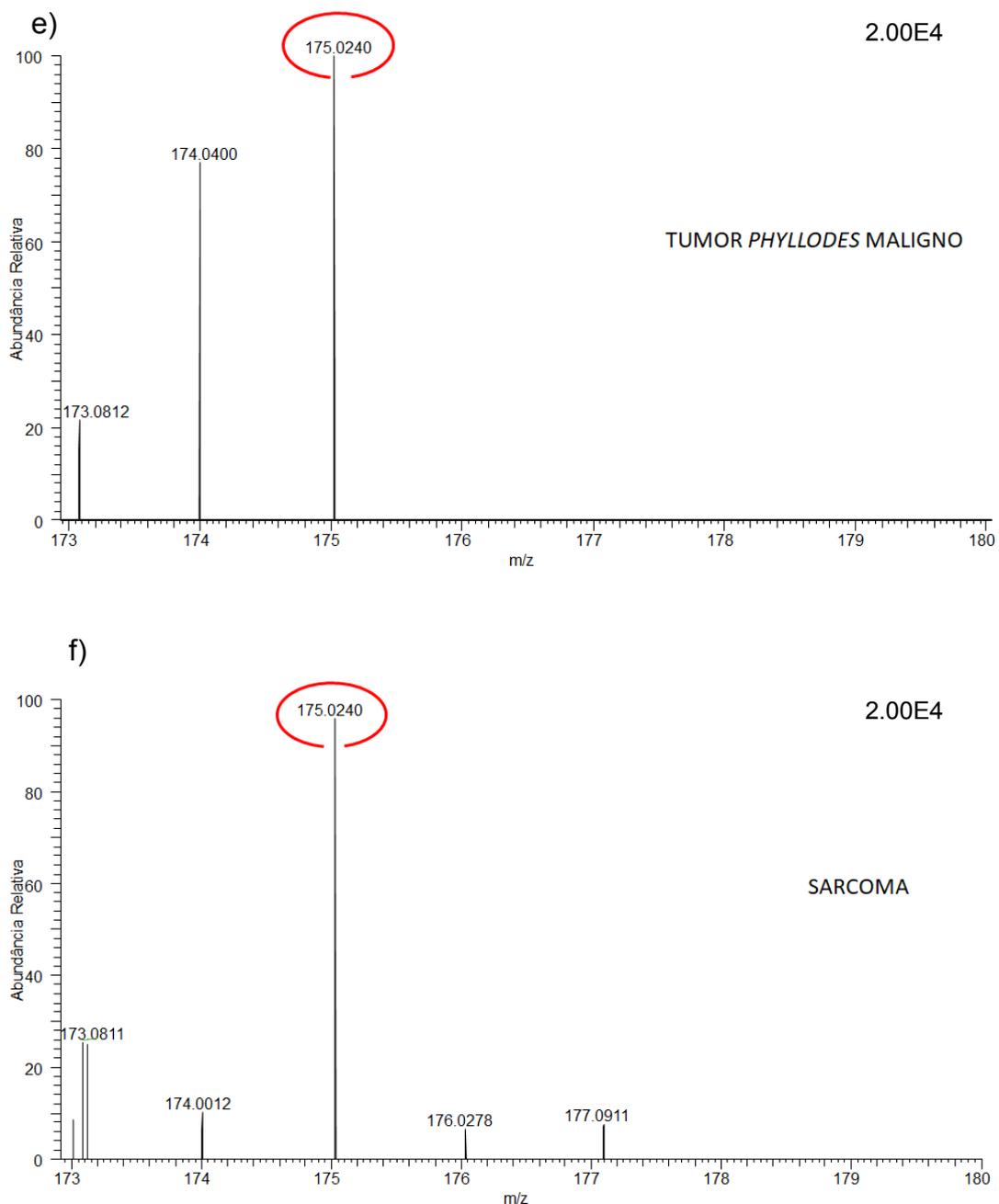


Figura 23 - Espectros obtidos através da ionização por DESI-MS, pelo modo negativo, obtidos no *XCalibur* com mesma escala para comparação. a) Tecido histologicamente normal da mama; b) Fibroadenoma juvenil; c) TPB; d) TPBo; e) TPM e f) SARC.

Um exemplo da comparação das imagens químicas com a imagem histológica está apresentado na Figura 24. Na Figura 24.a observa-se o corte histológico corado com *H&E* (TPBo à esquerda e tecido mamário histologicamente normal à direita). Na Figura 24.b foi realizada a demarcação das regiões de interesse (ROIs) na imagem histológica correspondente a tumor e ao estroma mamário normal, respectivamente. A Figura 24.c é a imagem química obtida para o íon m/z 303,2330 (referente possivelmente ao ácido araquidônico). E finalmente na Figura 24.d foi realizado a sobreposição da imagem química com o corte histológico. É possível observar que o íon m/z 303,2330 se apresentou em alta intensidade no tumor (em vermelho), em baixa a moderada intensidade (em azul) em uma pequena área do estroma mamário, e em baixa intensidade ou ausente (em roxo) no tecido adiposo normal da mama. Portanto, o íon m/z 303,2330 está presente no tumor e em áreas de estroma mamário, principalmente próximo aos ductos, correspondendo provavelmente ao estroma intralobular do qual o tumor deriva.

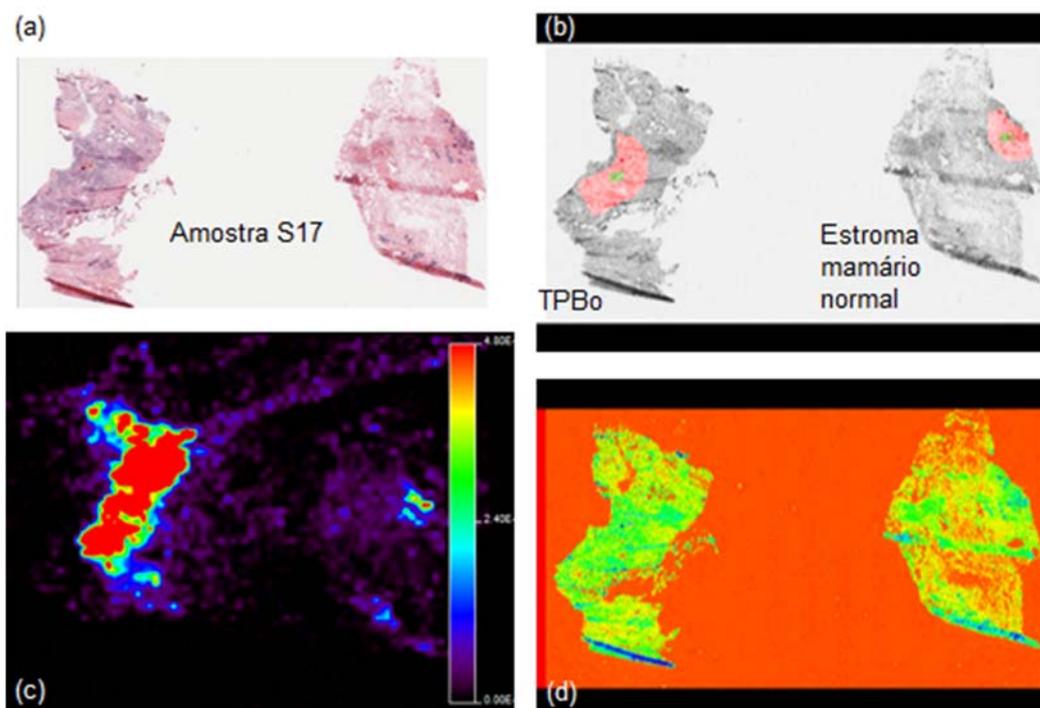


Figura 24 - Seleção das regiões de interesse (*H&E* sobreposto às imagens químicas obtidas por DESI-MSI). a) Foto do corte histológico corado com *H&E* obtido através do *ImageScope* (*Aperio*). b) Demarcação das regiões de interesse na foto do corte histológico através do *software Biomap* (TPBo à esquerda e estroma mamário normal à direita). c) Imagem química visualizada através do esquema de cores *rainbow* correspondente ao íon m/z 303,2330 obtida no *software Biomap*. d) Sobreposição da imagem (b) e (c) através do *software Biomap*.

Comparando a presença desse íon em um espectro de massas obtido através de um arquivo *.raw*, observamos que, numa mesma lâmina de tecido tumoral pareado com tecido mamário morfológicamente normal, o íon m/z 303,2330 apresentou maior abundância relativa no espectro representativo do tecido tumoral (Figura 25). Através das imagens químicas também podemos observar que esse íon distingue bem tecidos tumorais de tecidos normais, como mostrado na Figura 26.

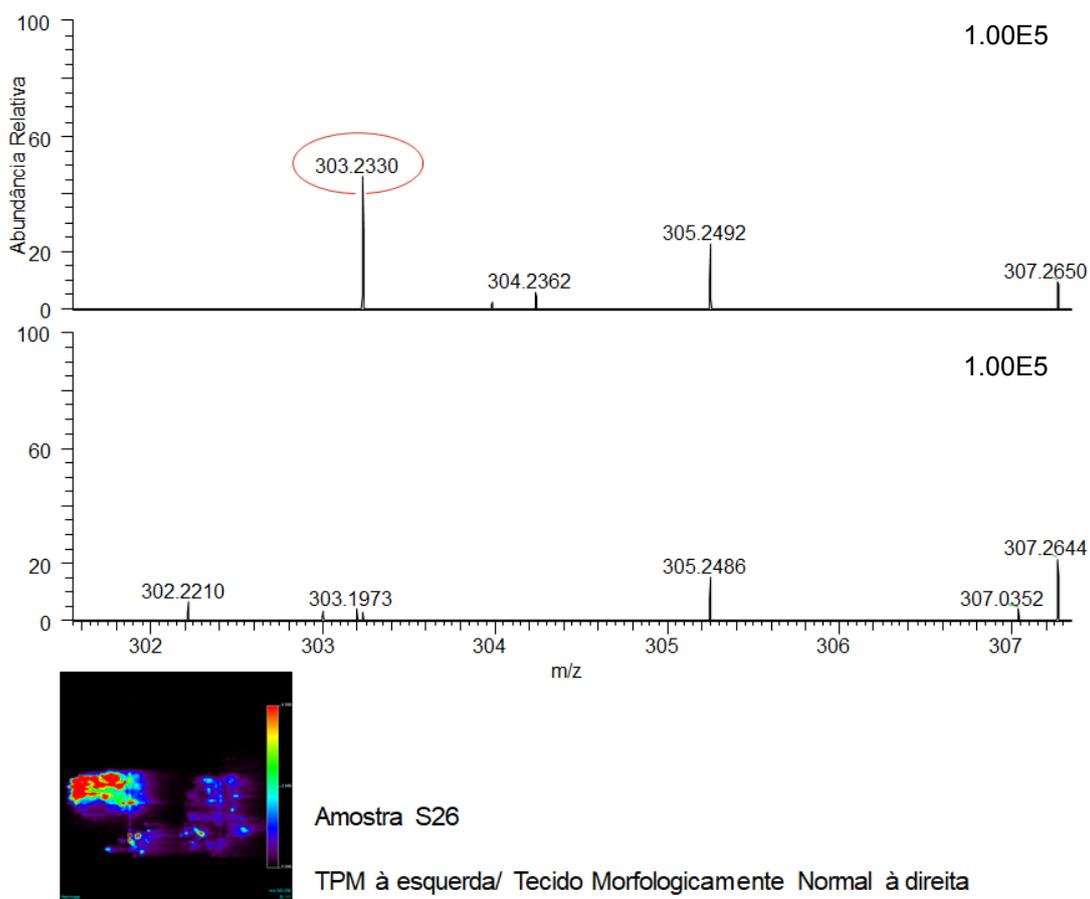


Figura 25 - Espectro de massas de m/z 300-310 e imagem química do íon m/z 303,2330 obtidos por DESI-MSI da mesma amostra S28 (TPM pareado com tecido histologicamente normal da mama). A comparação da intensidade relativa do íon m/z 303,2330 tanto através do espectro de massas, quanto por análise visual da imagem química nos revela uma maior intensidade desse íon no tecido tumoral.

m/z 303,2330

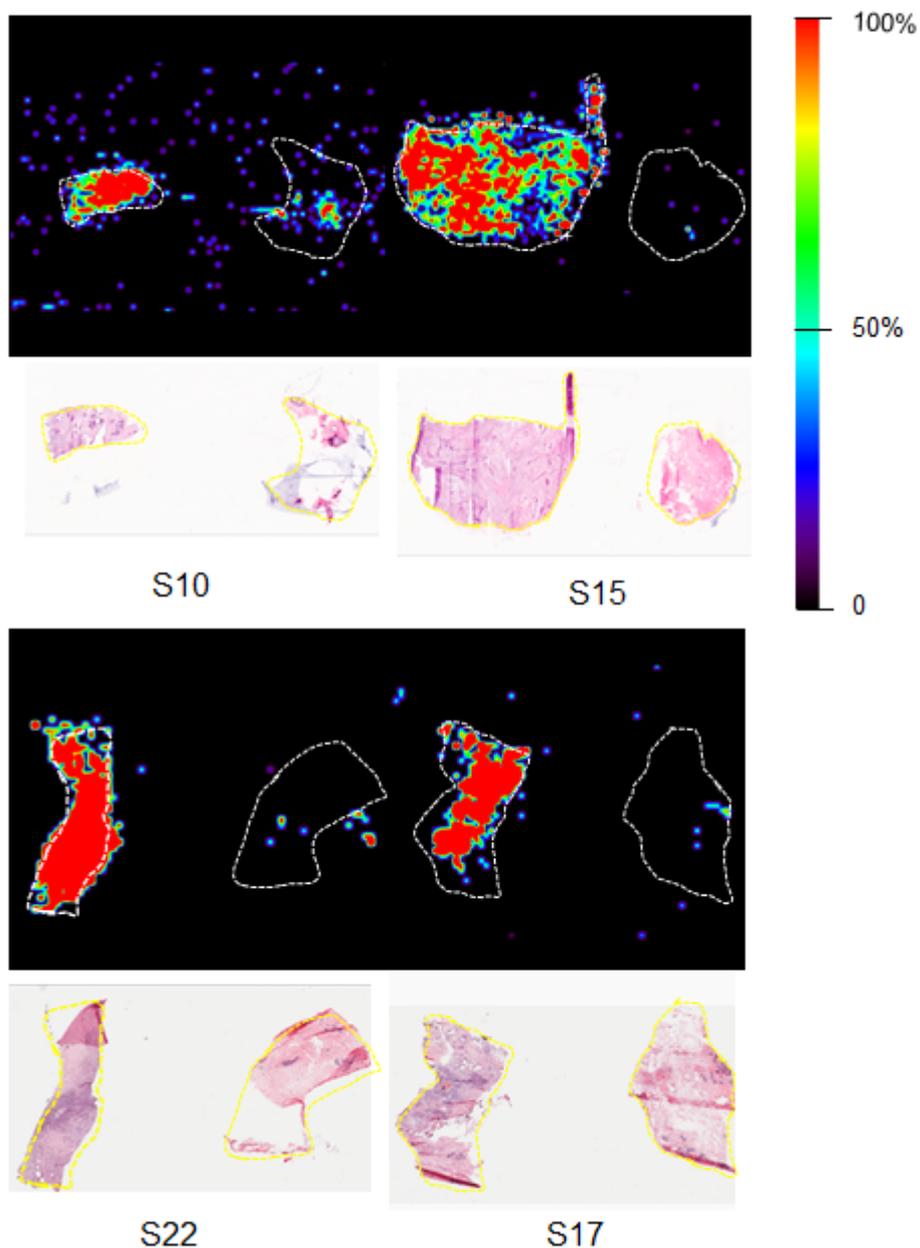


Figura 26 - Imagens químicas obtidas por DESI-MSI do íon m/z 303,2330; pareadas com as imagens histológicas correspondentes. Tumor à esquerda e tecido histologicamente normal à direita. Nota-se que o íon m/z 303,2330 tem maior intensidade relativa no tecido neoplásico, comparado ao tecido normal da mama.

Na Figura 27 é apresentada a comparação dos espectros de massa referentes a uma amostra de TPBo (Figura 27.a) e uma amostra de estroma mamário normal (Figura 27.b). Os dois espectros de massas apresentam a intensidade relativa dos metabólitos detectados por ionização negativa em um ponto da amostra, determinado bidimensionalmente no plano cartesiano. Ao comparar os dois espectros, é possível observar que há diferenças no perfil dos íons, nota-se que o íon m/z 303,2330 está presente no tecido tumoral e ausente no tecido normal.

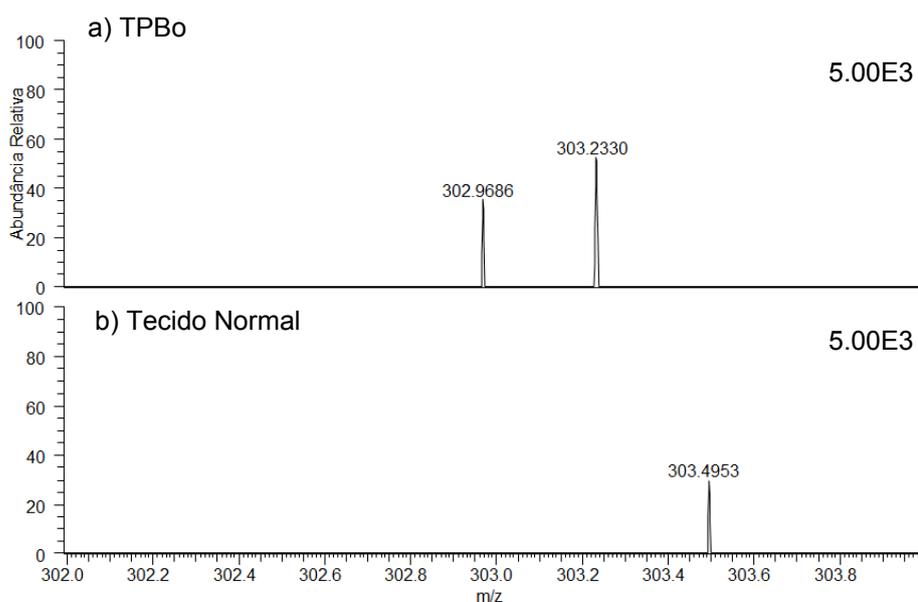


Figura 27 - Espectros de massas obtidos por DESI-MS pelo modo de ionização negativo. a) amostra de TPBo. b) tecido mamário normal. Notam-se diferenças na intensidade relativa dos íons representados (Amostra S17).

O íon m/z 331,2643, possivelmente correspondente ao ácido adrênico, se apresentou em maior intensidade nos tecidos tumorais comparados ao tecido histologicamente normal, o que pode ser verificado nas seguintes imagens químicas (Figura 28).

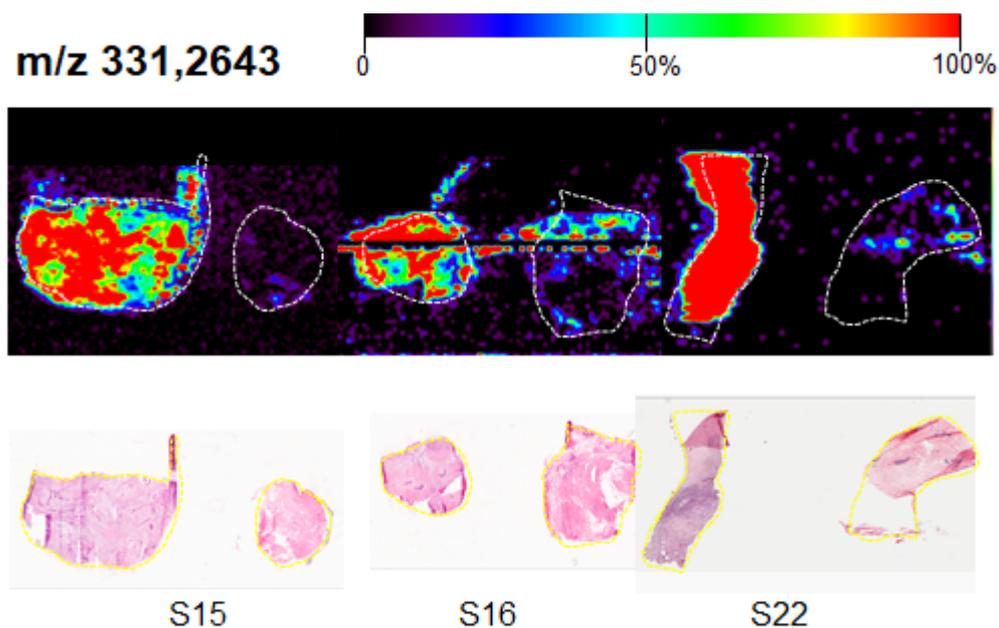


Figura 28 - Imagens químicas obtidas por DESI-MSI do íon m/z 331,2643; pareadas com as imagens histológicas correspondentes. Tumor à esquerda e tecido histologicamente normal à direita. Nota-se que o íon m/z 331,2643 tem maior intensidade relativa no tecido neoplásico, comparado ao tecido normal da mama.

Ambos, o ácido araquidônico e o adrênico são ácidos graxos poliinsaturados. No mesmo espectro de massas de um TPM, verificam-se picos correspondentes a esses íons e, nas imagens químicas, observa-se a alta intensidade desses íons (Figura 29).

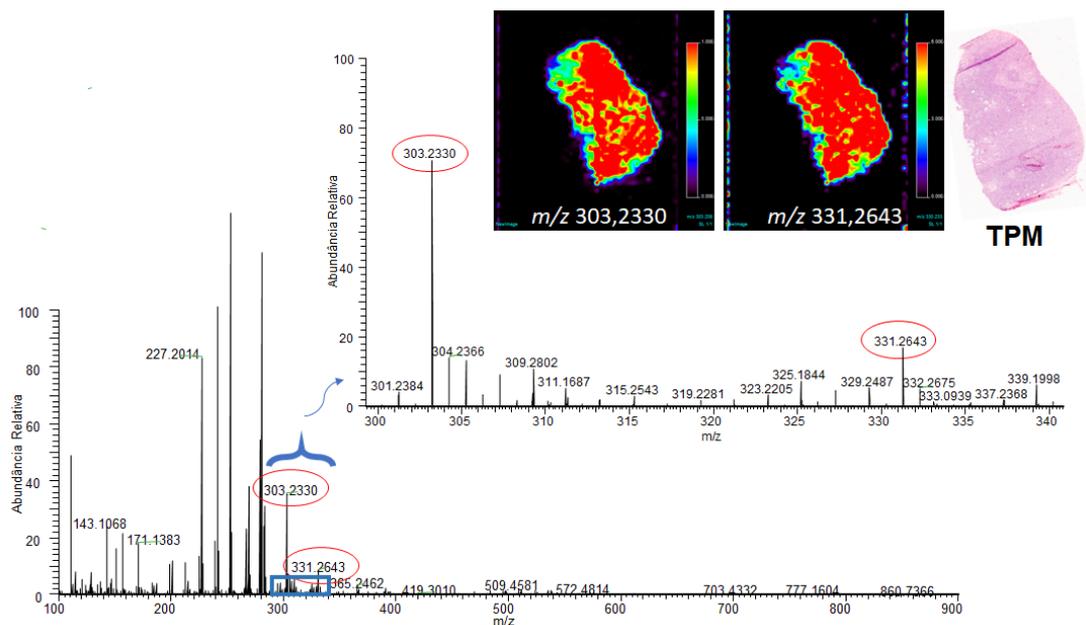


Figura 29 - Espectros de massas obtidos através da ionização negativa por DESI-MSI de uma amostra de TPM. No canto superior direito está a imagem histológica pareada às suas imagens químicas. Os íons em destaque m/z 303,2330 e 331,2643 correspondem possivelmente ao ácido araquidônico e ácido adrênico, respectivamente.

Alguns íons têm distribuições semelhantes nos tecidos tumorais e normais, por exemplo, o íon m/z 215,0323 está presente em alta intensidade tanto no tecido TPBo quanto no tecido normal (Figura 30).

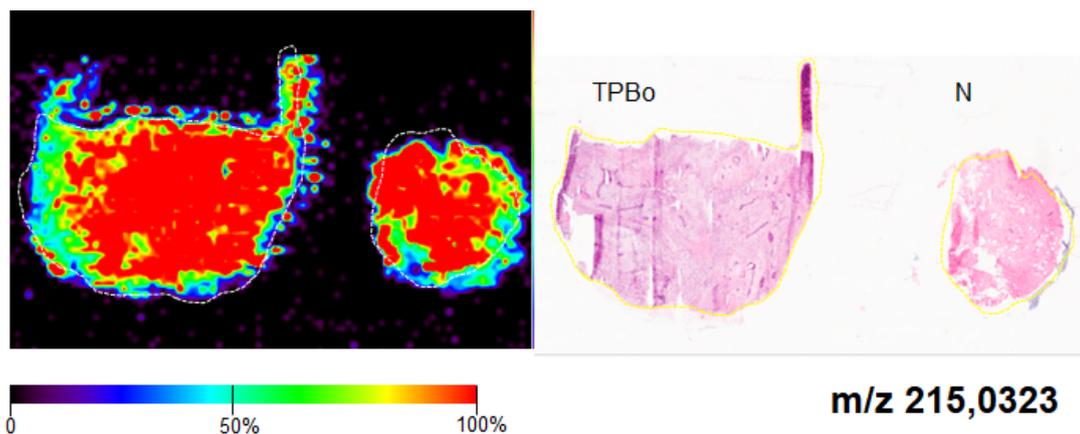


Figura 30 - TPBo à esquerda e estroma mamário normal à direita. Nota-se na imagem química que o íon m/z 215,0323 está presente em ambos os tecidos.

As Figuras 31, 32 e 33 mostram que o perfil metabolômico dos tecidos tumorais diferem dos tecidos normais em relação a intensidade e distribuição de diversos íons.

A Figura 31 apresenta imagens químicas de íons, por exemplo, os íons m/z 187,0968, 279,2331, 124,0066, 303,2330 que possuem distribuições diferentes comparando o tumor e o tecido normal. Verifica-se que o íon m/z 187,0968 está presente em intensidade mais elevada no tecido normal comparado ao TPBo. O contrário acontece para os íons m/z 279,2331, 124,0066, 303,2330 que estão presentes em maior intensidade no TPBo comparando-o ao tecido normal.

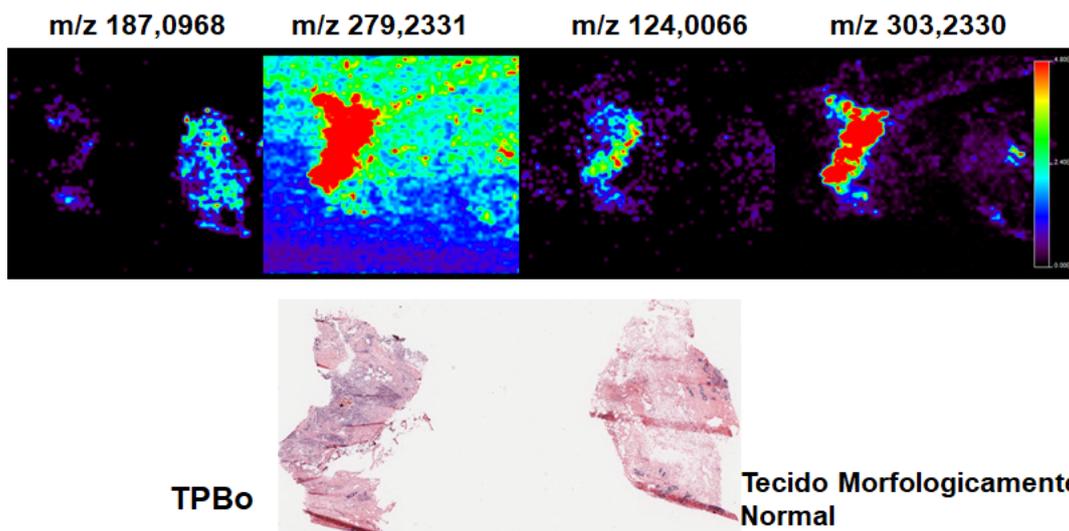


Figura 31 - Imagens químicas da distribuição de diferentes íons m/z 187,0968, 279,2331, 124,0066, 303,2330 comparadas à imagem histológica de um TPBo e N (Amostra S17).

A Figura 32 apresenta a comparação do TPBo e do tecido normal na amostra S15. Primeiramente, observa-se que o íon m/z 135,0302 se apresenta em alta intensidade no TPBo e em intensidade muito baixa, confundindo-se com o ruído, no tecido normal. Ao avaliar o íon m/z 124,0066, nota-se que este íon tem alta intensidade no TPBo, e, no tecido normal, se apresenta em baixa intensidade, quase ausente. O íon m/z 187,0968 está presente em ambos os tecidos, porém verifica-se que a intensidade deste íon é menor no tecido tumoral. O íon m/z 215,0323, está presente em intensidades iguais em ambos os tecidos. É possível observar nas imagens químicas desses íons que a distribuição topográfica é diferente.

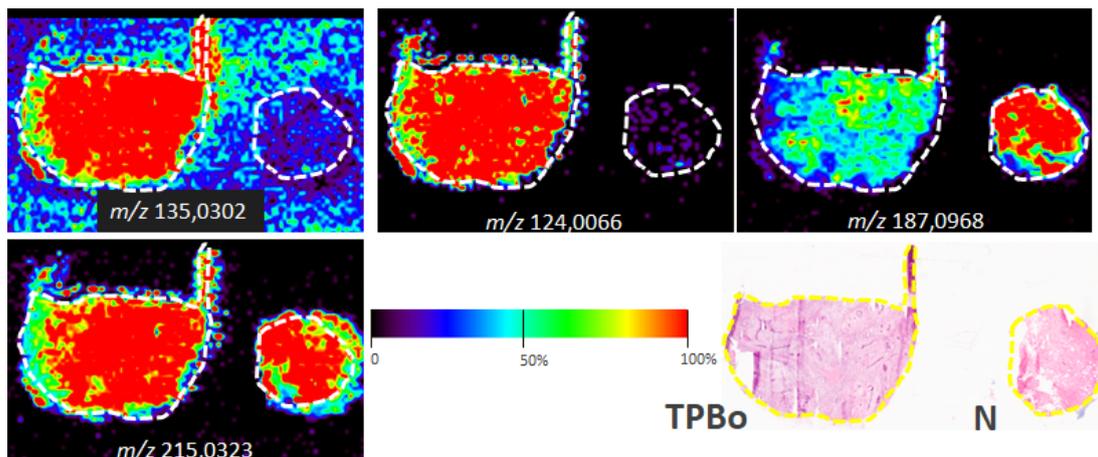


Figura 32 - Imagens químicas obtidas através da ionização negativa por DESI-MSI. Distribuição topográfica de diferentes íons em uma amostra de TPBo e N (Amostra S15).

A Figura 33 apresenta algumas imagens químicas obtidas da amostra S22, comparando tecido com TPM e o tecido normal. Observa-se que os íons m/z 279,2331 e 327,2332 estão presentes em alta intensidade por toda extensão do TPM, e, em pontos isolados e em baixa intensidade, no tecido normal. O contrário ocorre para o íon m/z 187,0968, o qual está presente exclusivamente no tecido normal.

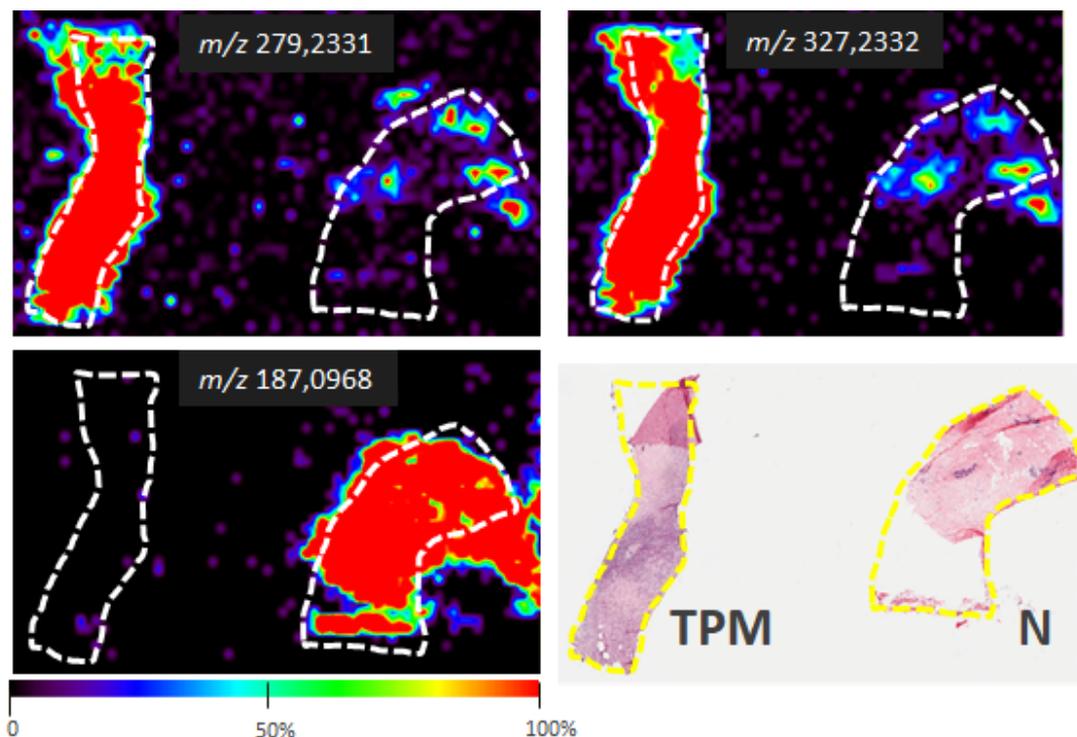


Figura 33 - Imagens químicas obtidas através da ionização negativa por DESI-MSI. Distribuição topográfica de diferentes íons em uma amostra de TPM e N (Amostra S22).

A seguir são apresentadas as imagens químicas encontradas de três íons típicos de tumores e FA. A Figura 34 apresenta a distribuição do íon m/z 628,5913 nas amostras S14 (TPBo), S15 (TPBo e normal) e S25 (TPM). A Figura 35 apresenta a distribuição do íon m/z 279,2331 nas amostras S9 (TPB), S3 (TPB), S17 (TPBo e normal), S22 (TPM e normal), S35 (TPM), S23 (TPM), S51(SARC) e S52(SARC). A Figura 36 apresenta a distribuição do íon m/z 585,4890 nas amostras S28 (TPM), S23 (TPM), S50 (FA hiper celular), S51(SARC) e S35 (TPM).

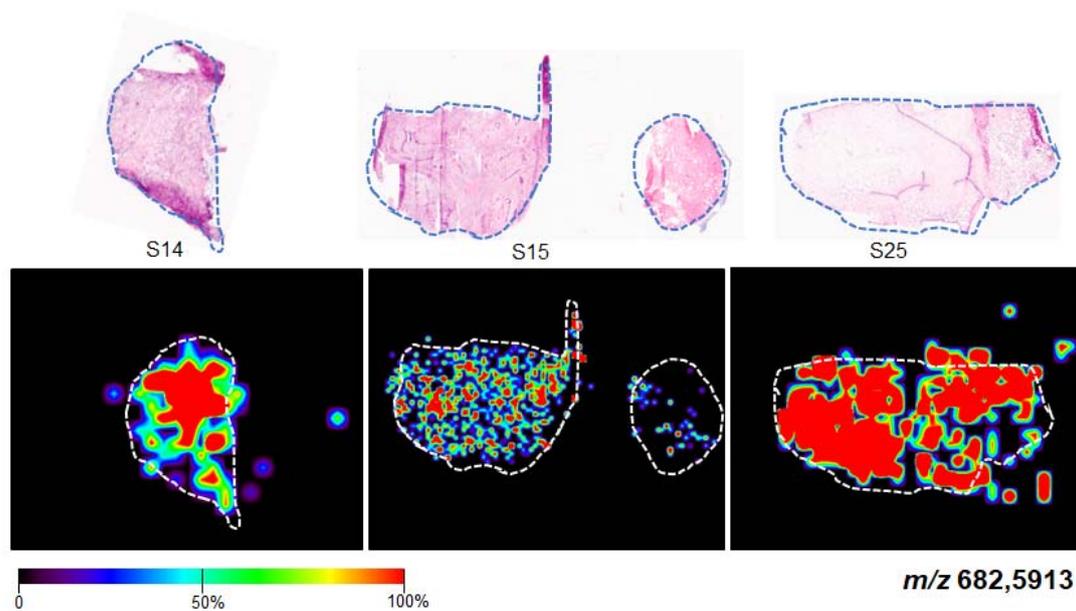


Figura 34 - Imagens químicas obtidas através da ionização negativa por DESI-MSI. Distribuição topográfica do íon m/z 682,5913 entre as diferentes amostras de tecido tumoral ou de tecido tumoral pareado com tecido normal.

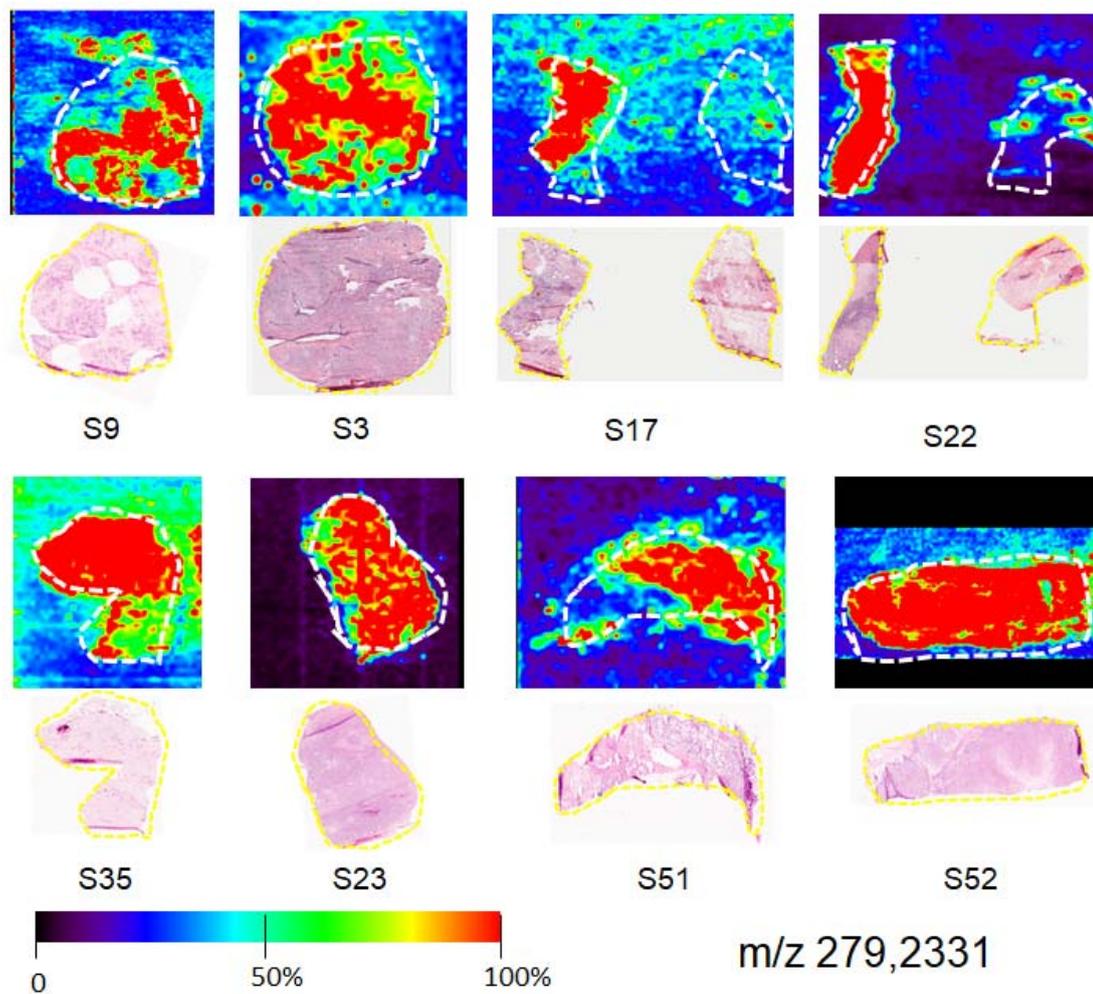


Figura 35 - Imagens químicas obtidas através da ionização negativa por DESI-MSI. Distribuição topográfica do íon m/z 279,2331 em diferentes amostras de tecido tumoral ou de tecido tumoral pareado com tecido normal da mama.

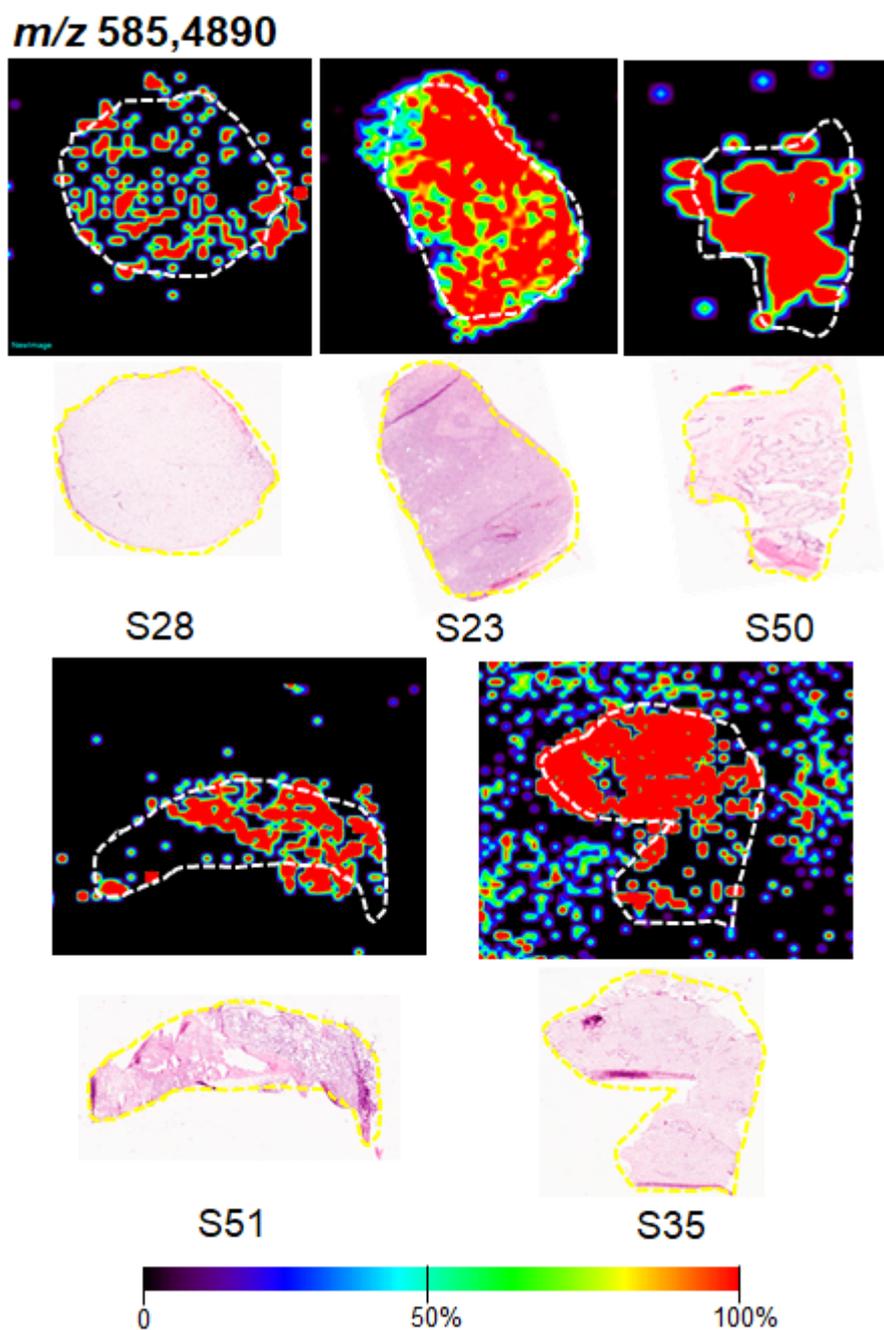


Figura 36 - Imagens químicas obtidas através da ionização negativa por DESI-MSI. Distribuição topográfica do íon m/z 585,4890 entre as diferentes amostras de tecido tumoral.

Na Figura 37 observa-se que as imagens químicas correspondentes aos tumores apresentam maior intensidade do íon m/z 885,5501 que o tecido histologicamente normal; na Figura 38, observam-se diversos tumores e a intensidade relativa do íon m/z 885,5501.

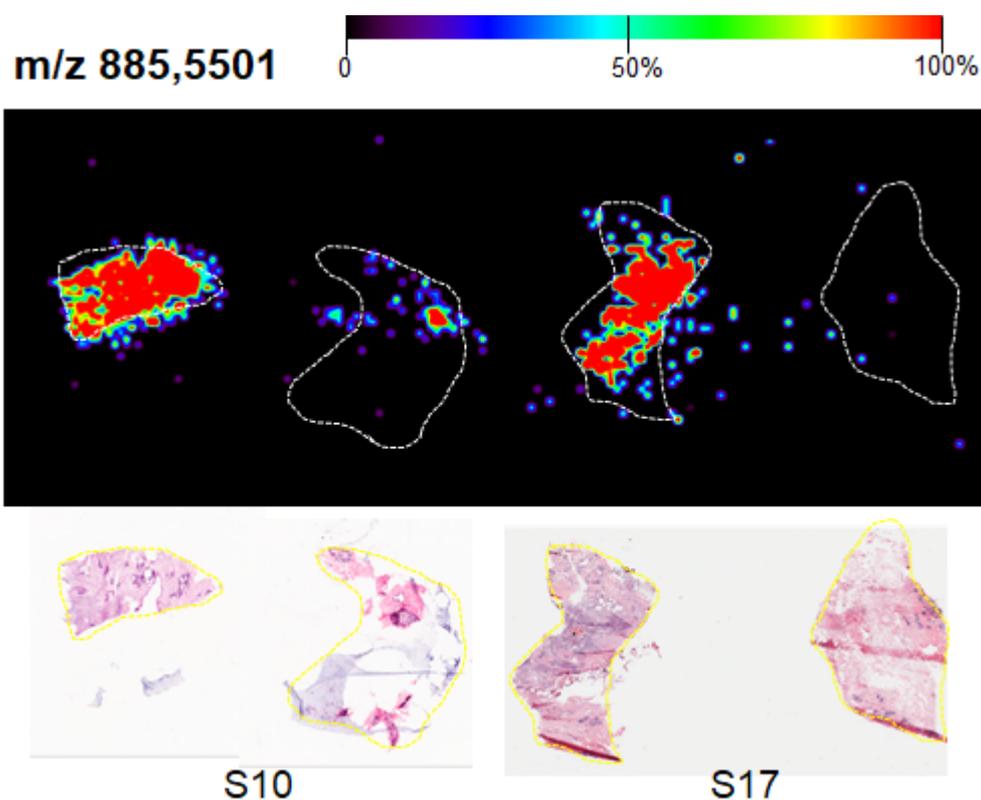


Figura 37 - Imagens químicas obtidas por DESI-MSI do íon m/z 885,5501; pareadas com as imagens histológicas correspondentes. Tumor à esquerda e tecido histologicamente normal à direita. Nota-se que o íon m/z 885,5501 tem maior intensidade relativa no tecido neoplásico, comparado ao tecido normal da mama.

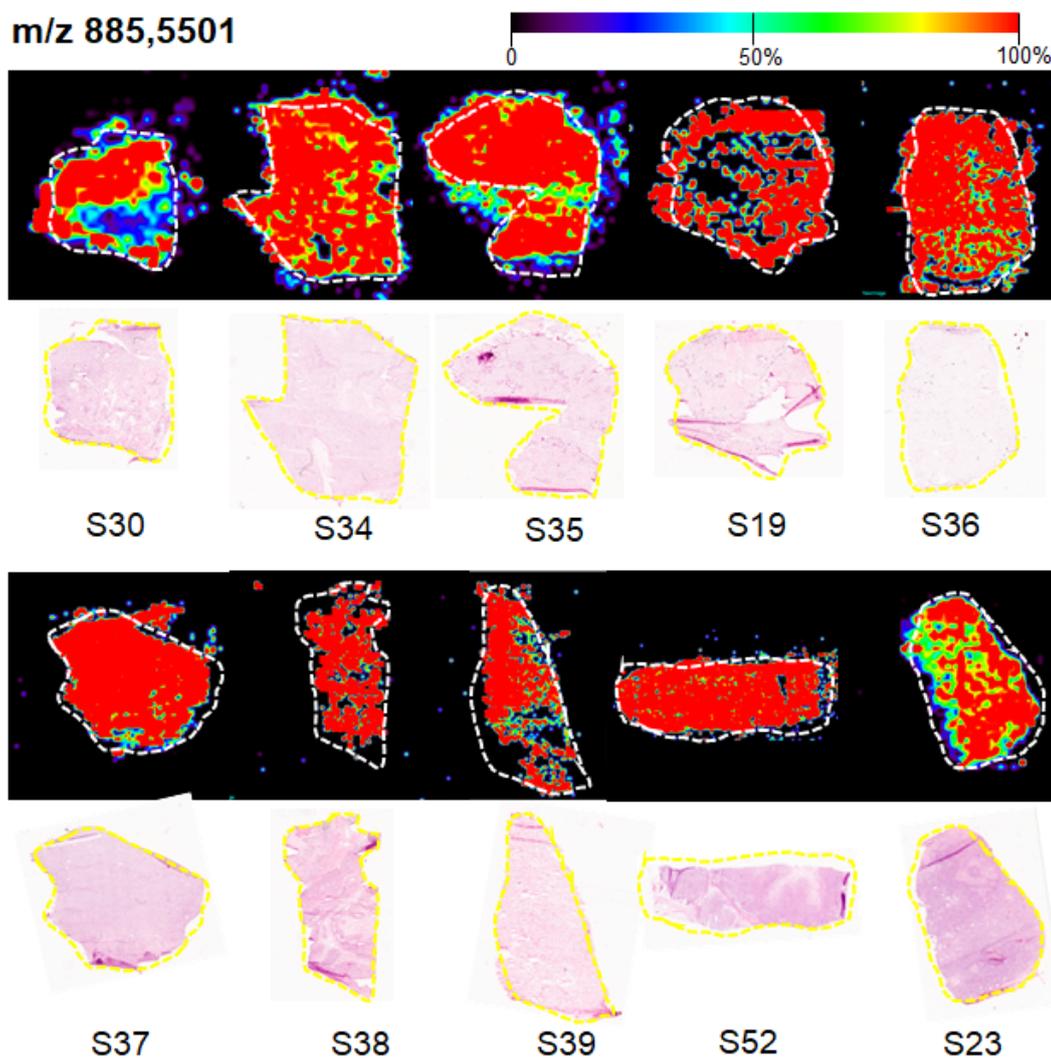


Figura 38 - Imagens químicas obtidas por DESI-MSI do íon m/z 885,5501; pareadas com as imagens histológicas correspondentes. Nota-se que o íon m/z 885,5501 tem alta intensidade no tecido neoplásico.

4.2.1 Gráficos obtidos a partir da análise visual das imagens químicas

A análise visual das imagens químicas obtidas através do *Biomap* é uma ferramenta importante para buscar semelhanças e diferenças entre as amostras para cada valor m/z . Visando diminuir a subjetividade dessa análise, foi atribuído valores para quantificá-las. As imagens foram analisadas

visualmente da seguinte forma: para cada m/z foi atribuído um valor de 1; 0,5 ou 0,25 de acordo com a intensidade da presença de cada íon demonstrada pela cor presente na barra *rainbow* em que o preto e roxo correspondem a ausência ou baixa intensidade de determinado íon e o vermelho corresponde ao outro extremo em que há maior intensidade relativa desse lipídio ou metabólito; para uma maior intensidade foi atribuído o valor “1”, para uma intensidade média o valor “0,5”, para uma baixa intensidade o valor “0,25” e para ausência do íon o valor “0”. Identificamos 193 valores diferentes de m/z que geraram imagens relevantes nas amostras desse estudo. Após atribuir um valor para cada imagem química, de cada amostra, em cada m/z , somamos os valores de cada tipo tumoral a fim de obter um valor absoluto. O valor absoluto foi dividido pela quantidade de amostras de cada tipo tumoral correspondente a aquela soma, obtendo-se o valor relativo da presença de cada íon em cada tipo tumoral ou tecido normal da mama para fim de comparação entre os tipos histológicos. Estes valores foram esboçados em gráficos que demonstraram diferenças entre os íons m/z 175,0240 (Figura 39), 215,0323 (Figura 40), m/z 301,2177 (Figura 41), m/z 319,2277 (Figura 42), m/z 327,2332 (Figura 43), m/z 329,2488 (Figura 44), m/z 303,2330 (Figura 45), m/z 331,2643 (Figura 46), m/z 335,2211 (Figura 47), m/z 337,2375 (Figura 48), m/z 391,2620 (Figura 49), m/z 535,4735 (Figura 50), m/z 611,5044 (Figura 51), m/z 633,5105 (Figura 52), m/z 637,5196 (Figura 53), m/z 637,5418 (Figura 54) e m/z 885,5501 (Figura 55) nos tecidos: SARC, TPM, TPBo, TPB, FA juvenil (FA JUV), FA mixóide (FA mix), FA hiperclular (FA hipercl), FA complexo (FA comp) e tecido normal (N).

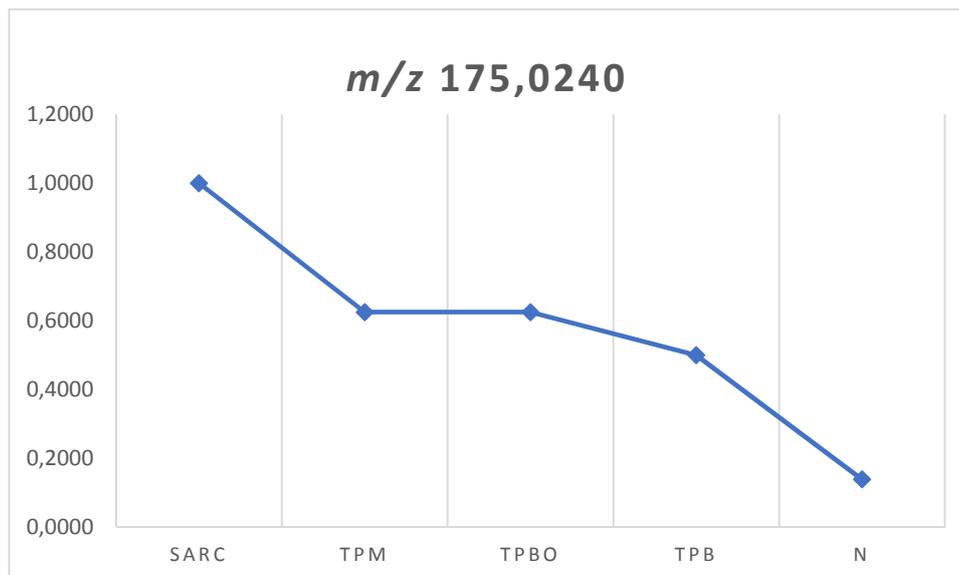


Figura 39 - Comparação da intensidade relativa do íon m/z 175,0240; por análise visual das imagens químicas, entre as amostras de SARC, TPM, TPBo, TPB e N.

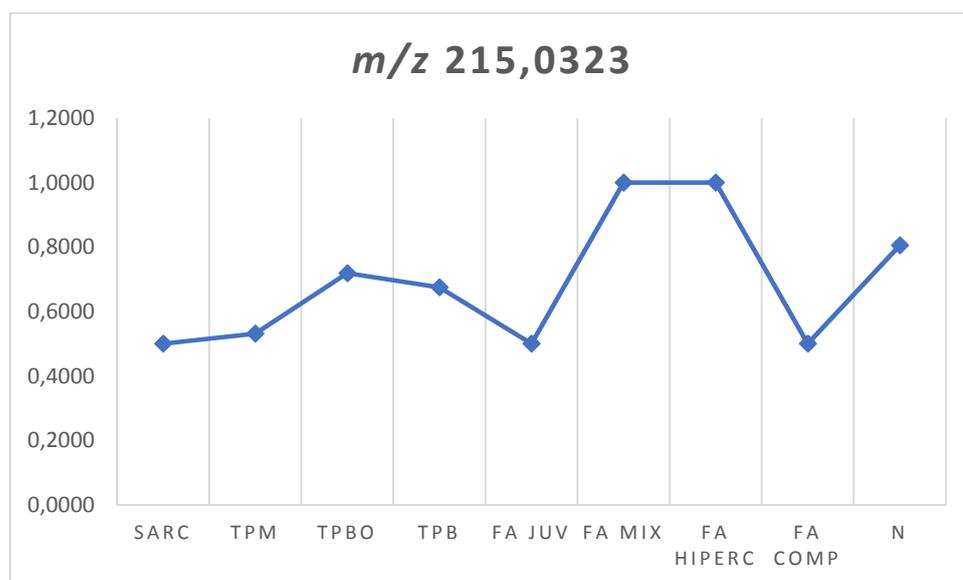


Figura 40 - Distribuição do íon m/z 215,0323 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo.

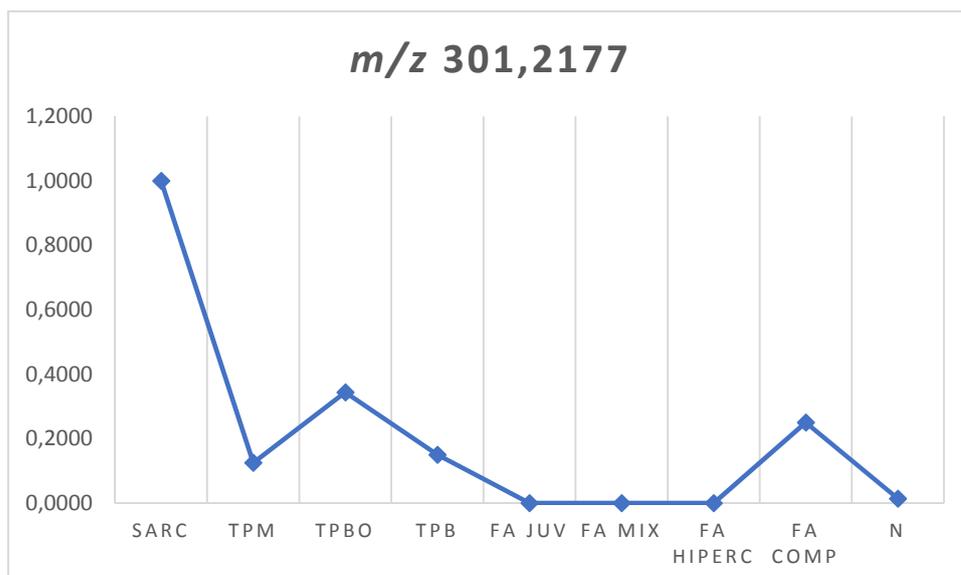


Figura 41 - Distribuição do íon m/z 301,2177 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo.

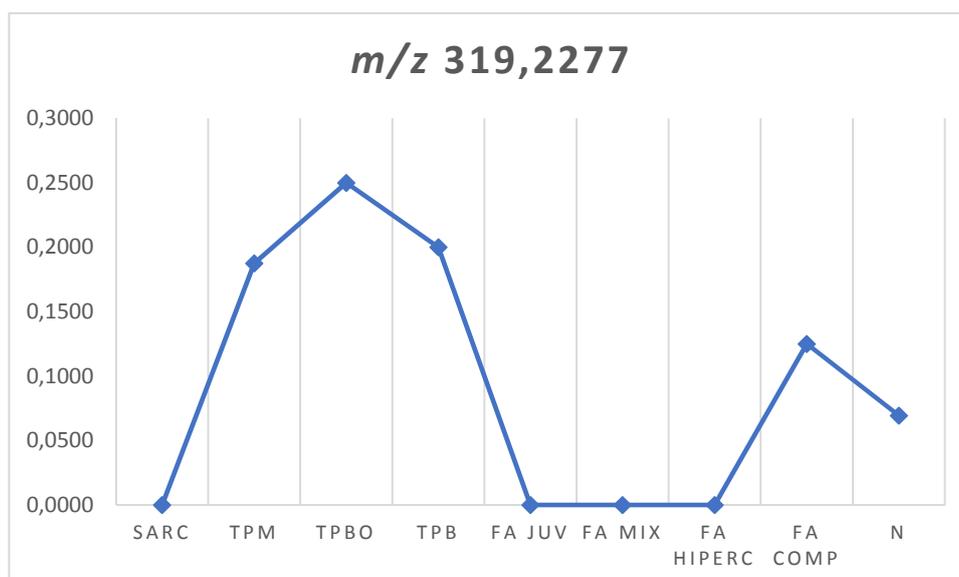


Figura 42 - Distribuição do íon m/z 319,2277 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo.

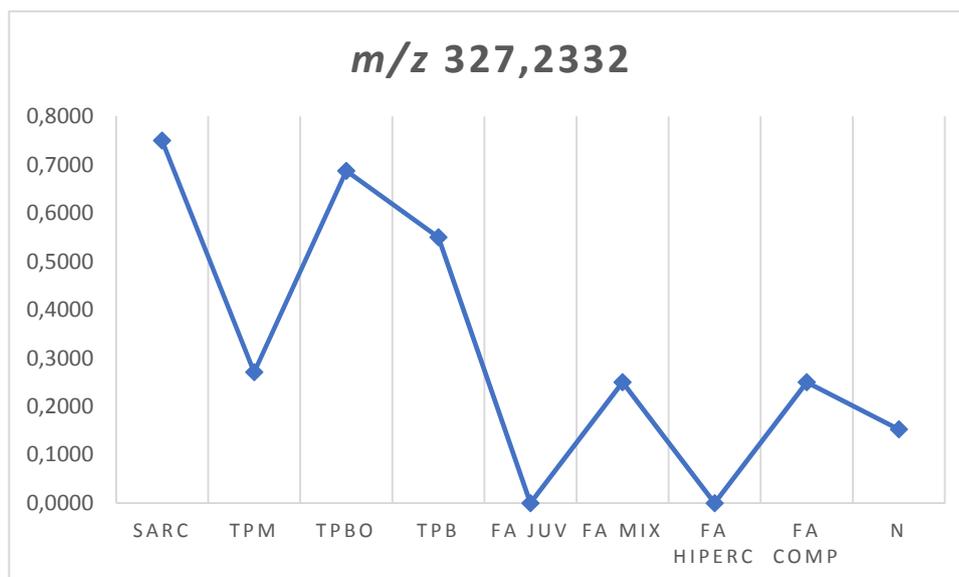


Figura 43 - Distribuição do íon m/z 327,2332 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo.

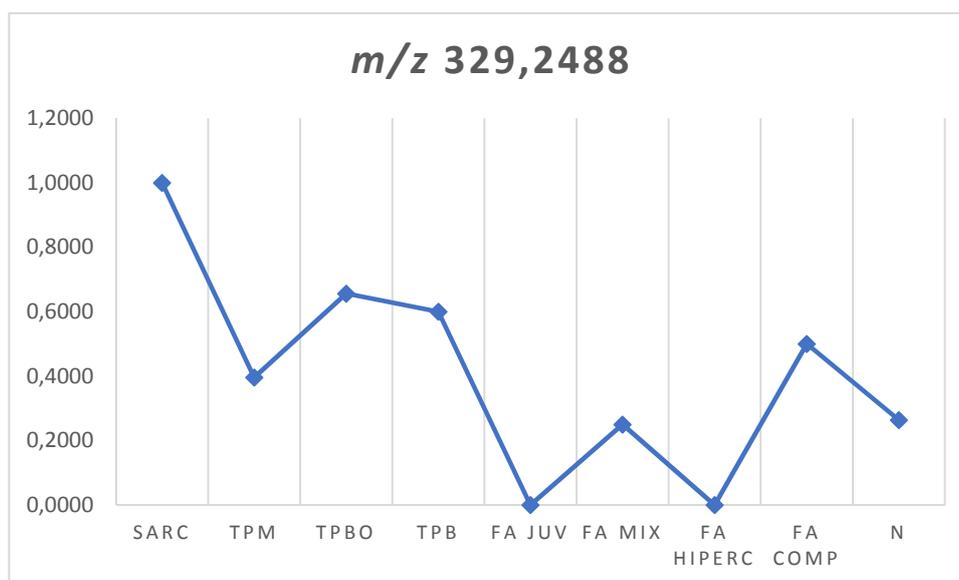


Figura 44 - Distribuição do íon m/z 329,2488 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo.

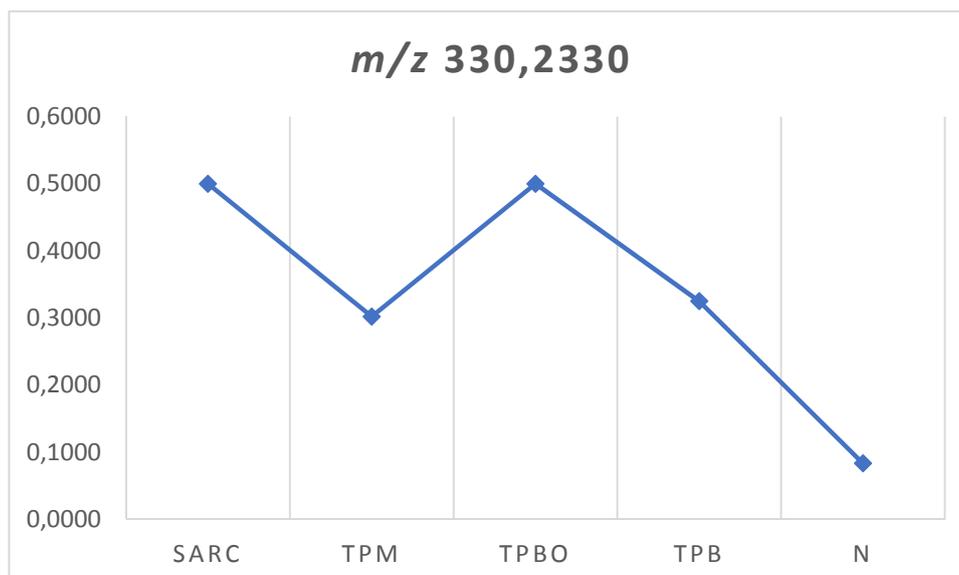


Figura 45 - Comparação da intensidade relativa do íon m/z 303,2330; por análise visual das imagens químicas, entre as amostras de SARC, TPM, TPBo, TPB e N.

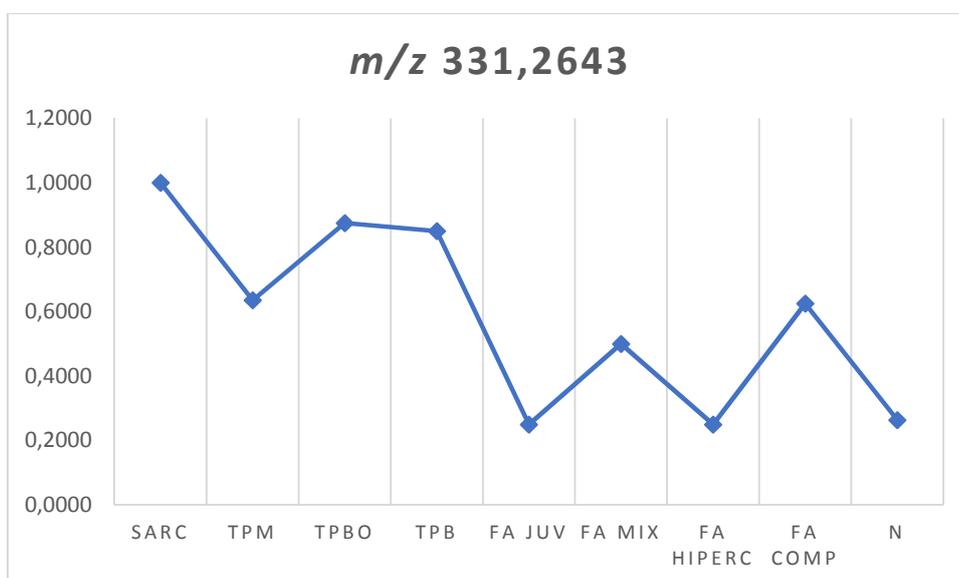


Figura 46 - Distribuição do íon m/z 331,2643 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo.

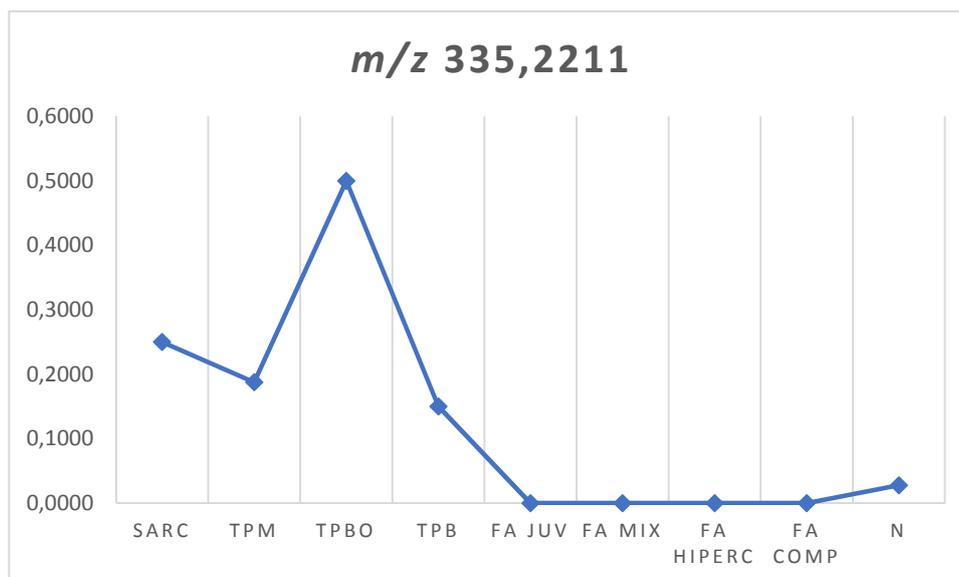


Figura 47 - Distribuição do íon m/z 335,2211 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo.

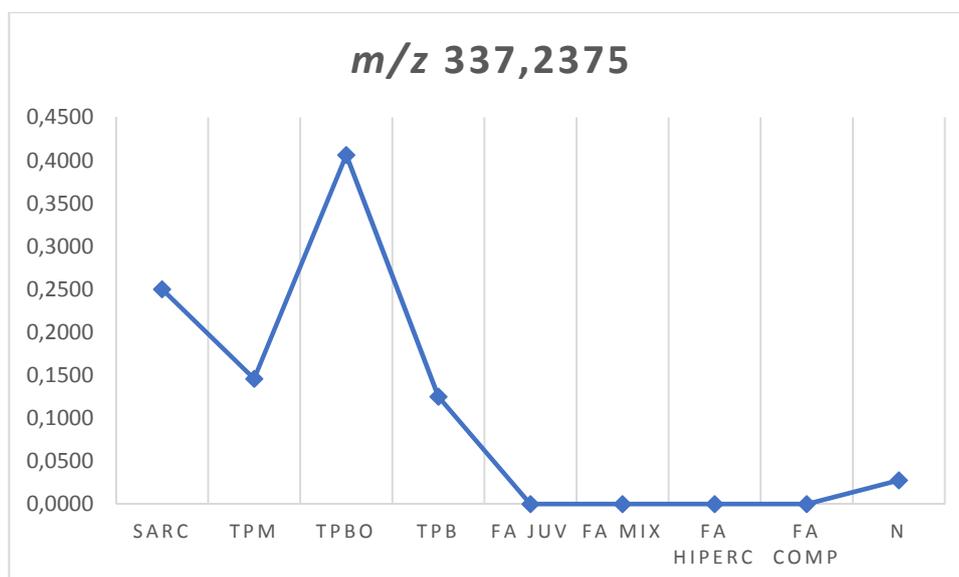


Figura 48 - Distribuição do íon m/z 337,2375 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo.

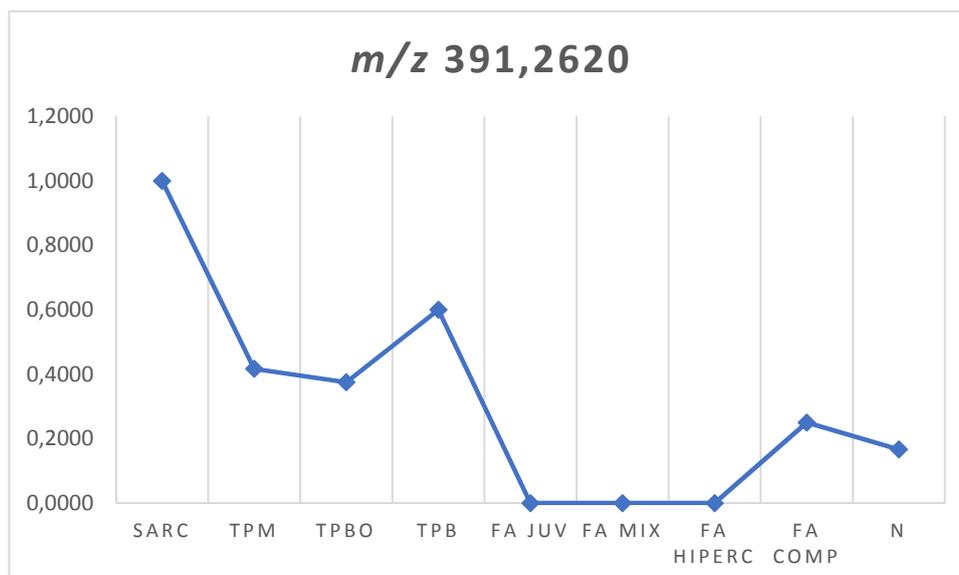


Figura 49 - Distribuição do íon m/z 391,2620 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo.

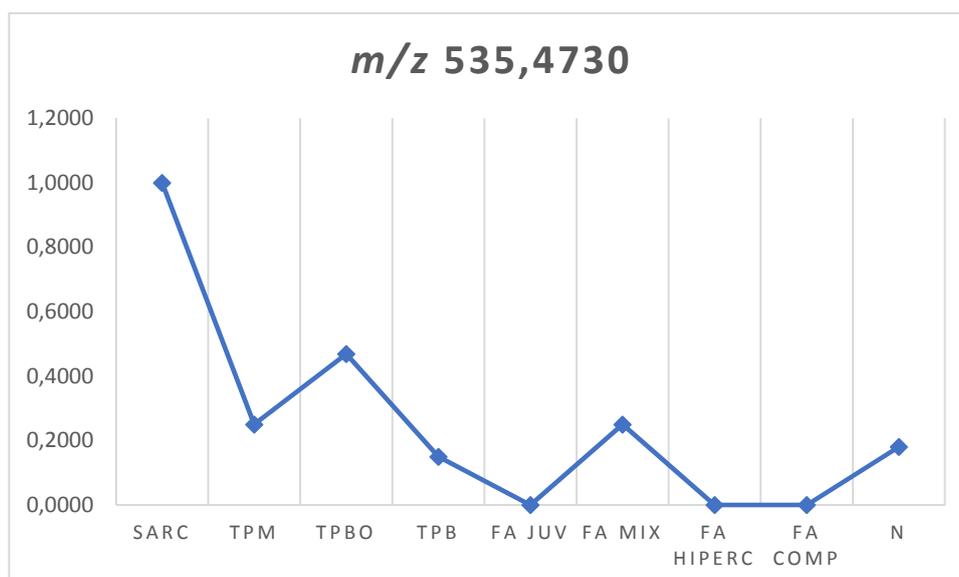


Figura 50 - Distribuição do íon m/z 535,4735 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo.

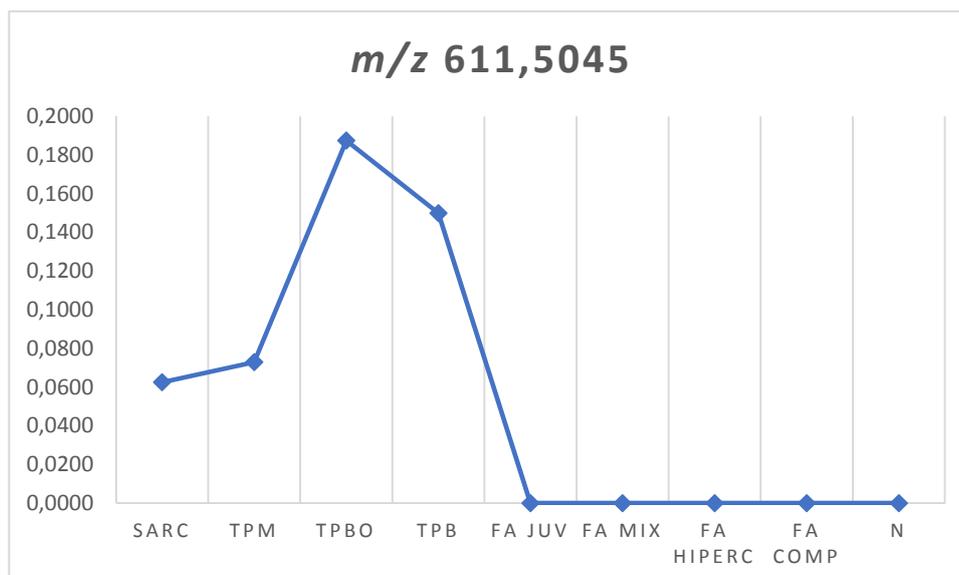


Figura 51 - Distribuição do íon m/z 611,5044 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo.

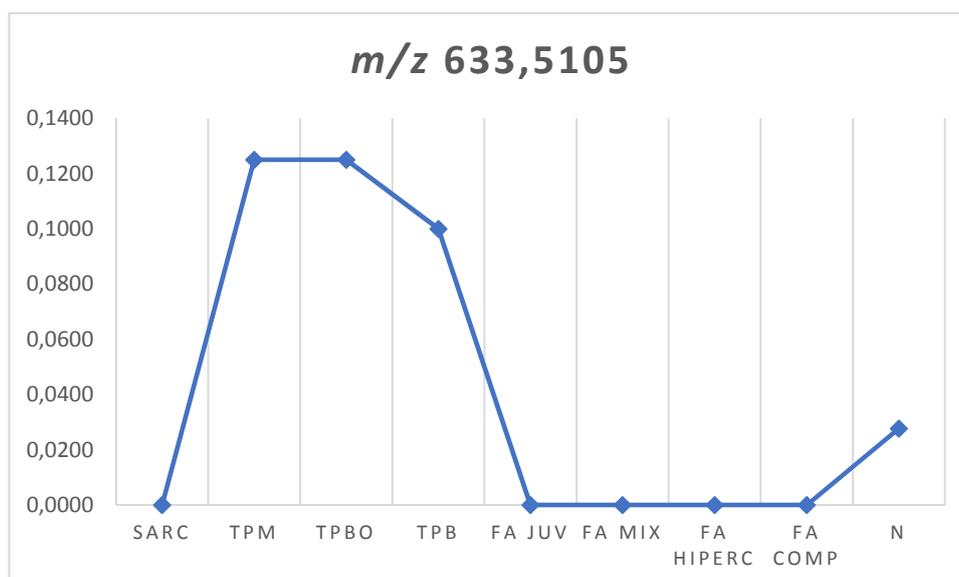


Figura 52 - Distribuição do íon m/z 633,5105 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo.

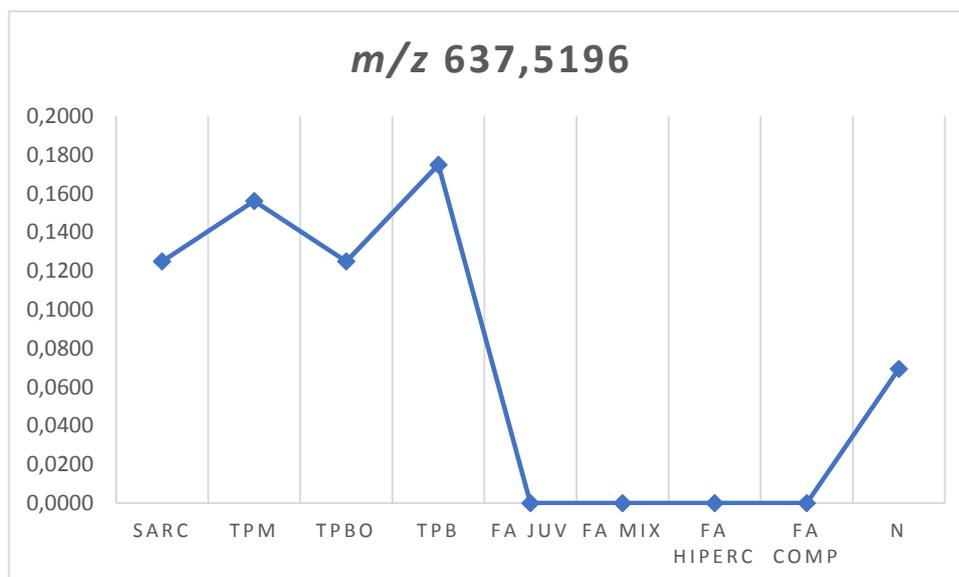


Figura 53 - Distribuição do íon m/z 637,5196 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo.

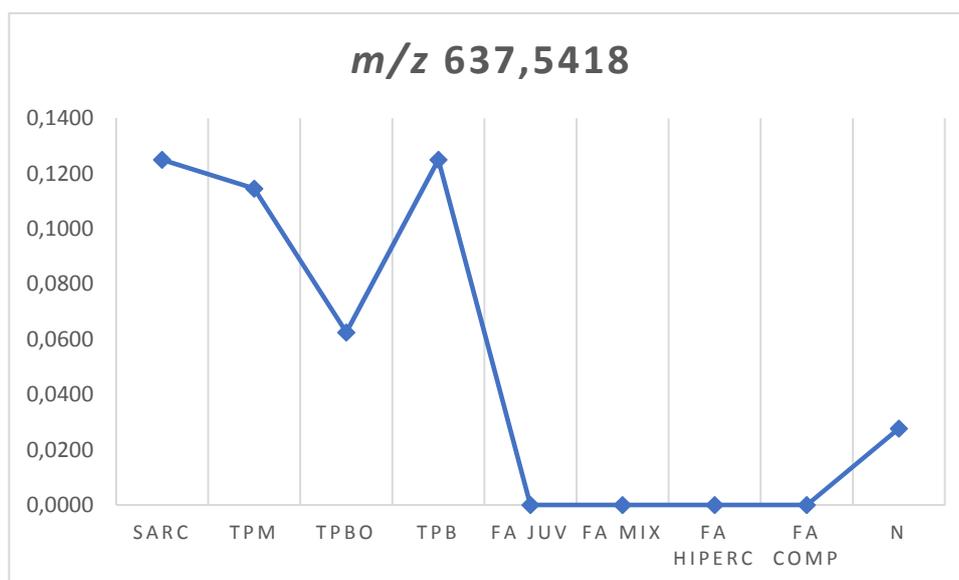


Figura 54 - Distribuição do íon m/z 637,5418 por análise visual das imagens químicas nas diversas amostras do estudo.

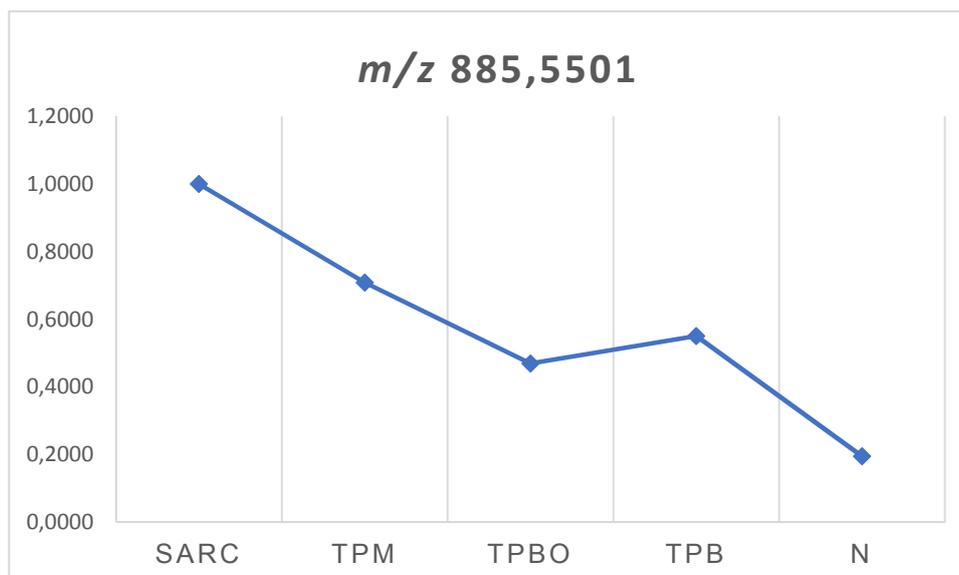


Figura 55 - Comparação da intensidade relativa do íon m/z 885,5501; por análise visual das imagens químicas, entre as amostras de SARC, TPM, TPBo, TPB e N.

4.2.2 Íons encontrados através da ionização negativa por DESI-MSI

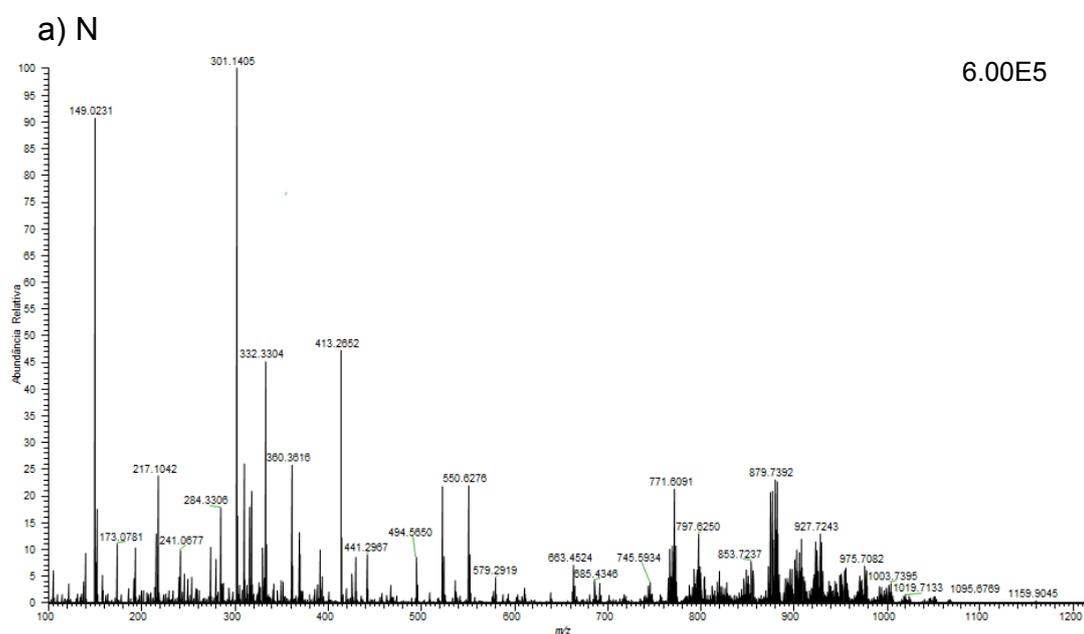
A Tabela 2 mostra os valores de m/z dos íons encontrados nesse estudo através da ionização negativa por DESI-MSI.

Tabela 2 - Massa experimental dos íons encontrados através da ionização pelo modo negativo através da análise por DESI-MSI.

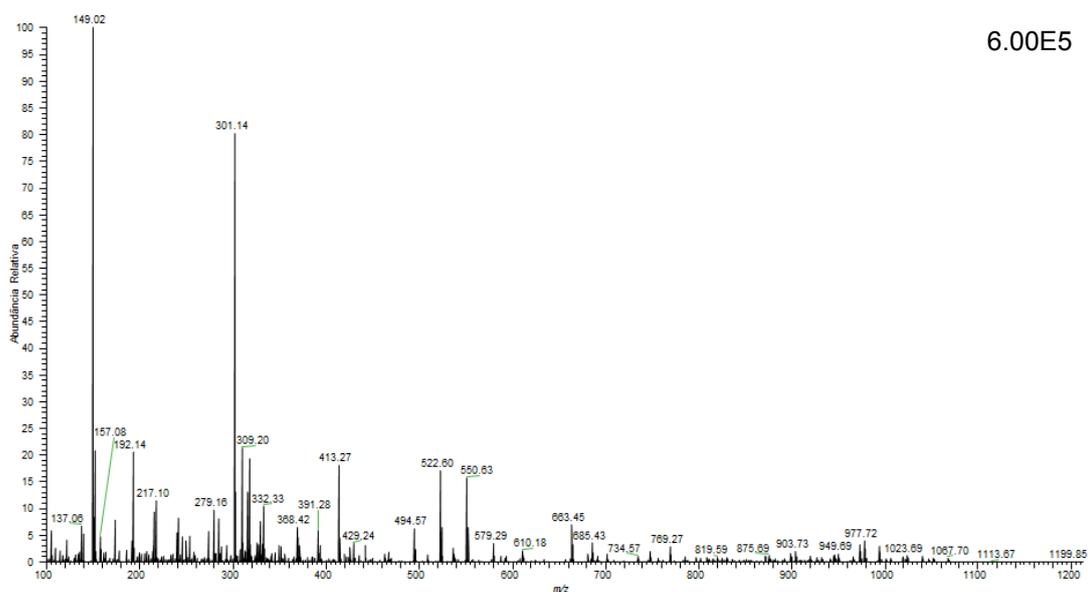
Massa Experimental (<i>m/z</i>)				
124,0066	304,2365	413,2464	572,4816	684,6069
126,9039	305,2487	415,2476	583,4730	710,6302
135,0302	307,2644	465,3048	585,4888	716,5241
141,0909	308,2682	521,4589	587,5044	722,5129
143,1067	310,2105	523,4733	589,5206	736,6467
168,0294	309,2800	524,4768	591,5357	737,5366
170,8375	313,2384	533,4576	607,4730	738,6610
174,0013	317,2255	534,4598	607,4739	739,6265
175,0240	319,2277	535,4730	609,4880	742,5386
185,1176	320,2465	536,4770	611,5045	744,5538
187,0968	327,2332	537,4887	613,5201	748,5270
187,1333	328,2359	538,4922	626,5367	750,5439
215,0323	329,2488	549,4892	627,4758	751,5276
227,2013	330,2517	551,4653	629,4918	766,5391
243,0620	331,2643	551,5049	633,5105	768,5314
253,2173	332,2680	557,4568	635,5040	771,5181
277,1445	333,2802	559,4729	637,5196	773,5334
277,2175	335,2211	561,4886	637,5418	786,5287
279,2331	337,2375	562,4928	653,4145	788,5442
281,2487	379,2482	563,5046	654,4660	792,5311
283,2644	391,2468	564,5080	654,5645	794,5450
293,2123	391,2620	565,5203	655,4679	810,5280
301,2177	393,2628	566,5241	680,5747	885,5501
303,2330	394,2683	572,4812	682,5913	

4.3 IONIZAÇÃO NO MODO POSITIVO

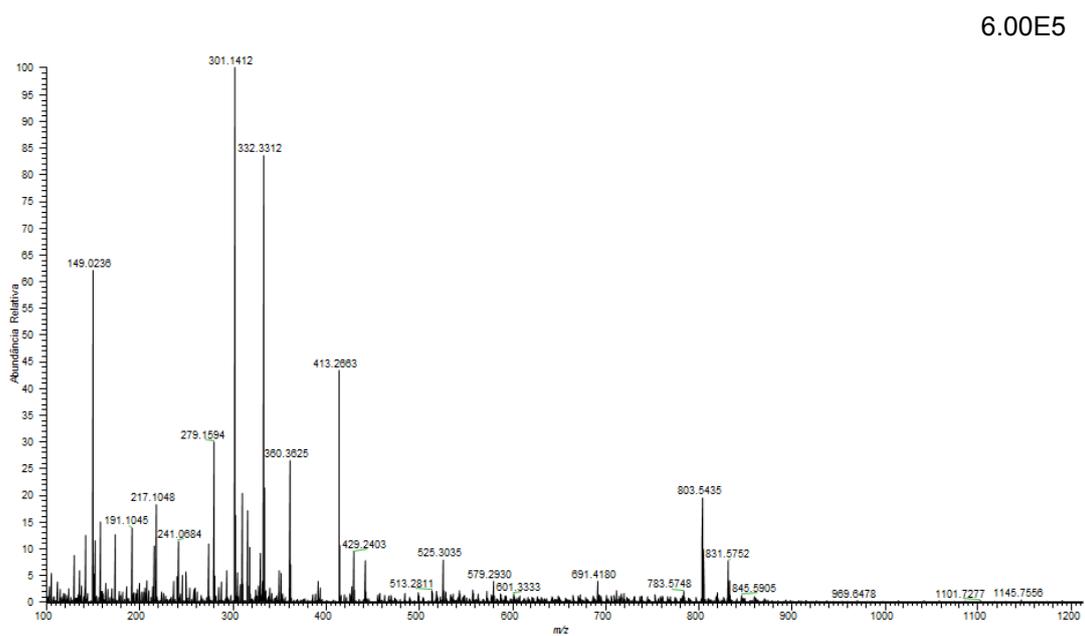
Através dos espectros de massa obtidos pela ionização positiva por DESI-MS, observa-se diferença entre os tecidos analisados comparando cada região do espectro. A Figura 56 apresenta os espectros de cada tecido tumoral na faixa analisada m/z 100-1200. A Figura 57 apresenta a faixa de m/z 500-650, correspondente a lisofosfatidilcolinas (LPC), ceramidas (Cer), colesterol (Col), Cer / Sph-1-fosfato (CerP / S1P) para cada tecido tumoral. E a Figura 58 apresenta a faixa de m/z 675-975, correspondente a esfingomiélna (SM), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC) e lactoceramida (LacCer).



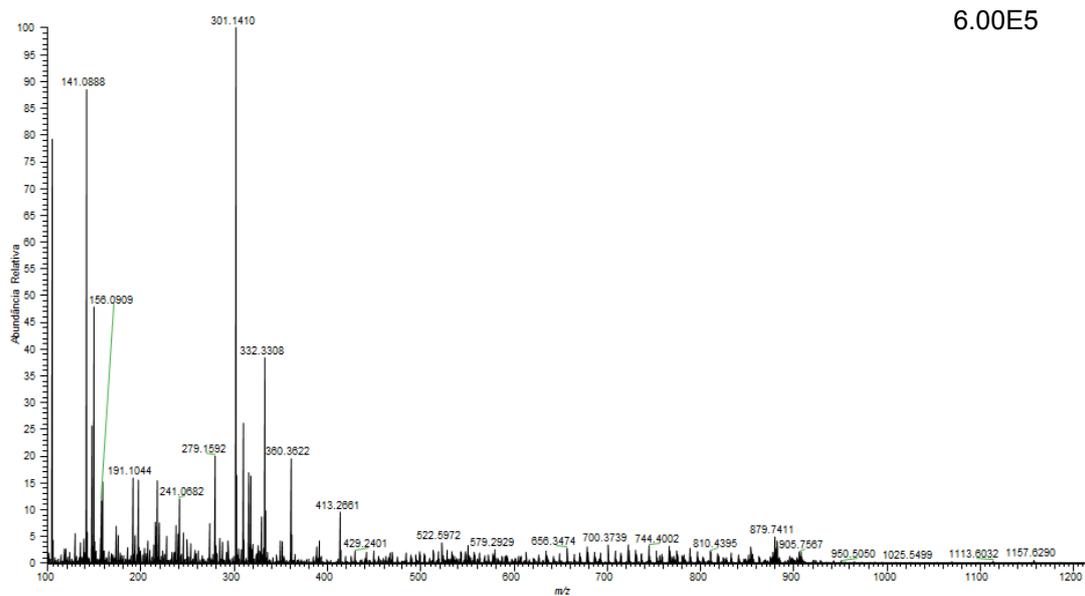
b) FA



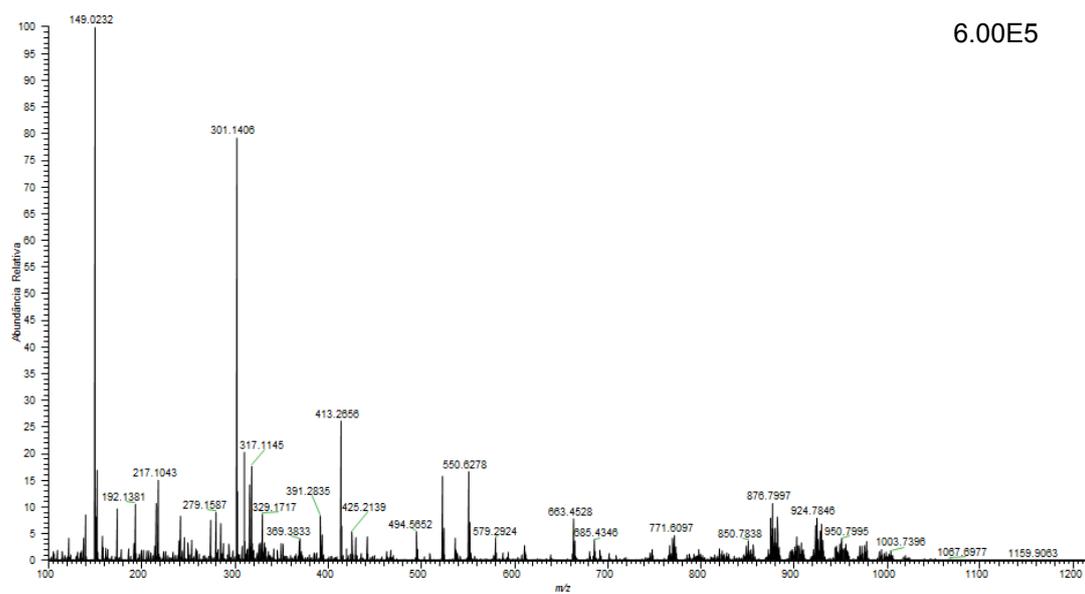
c) TPB



d) TPBo



e) TPM



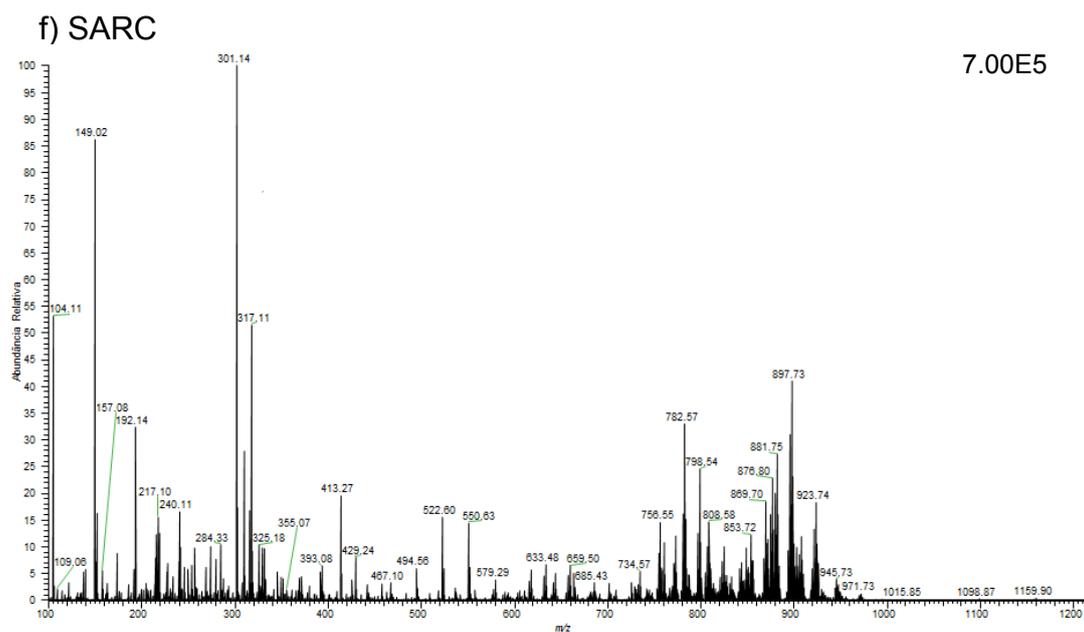
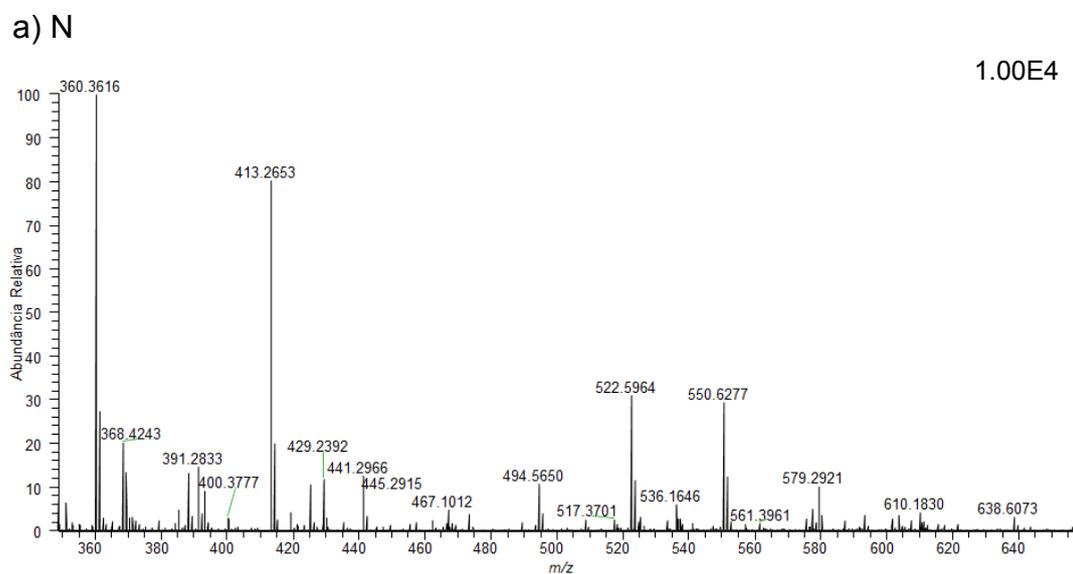
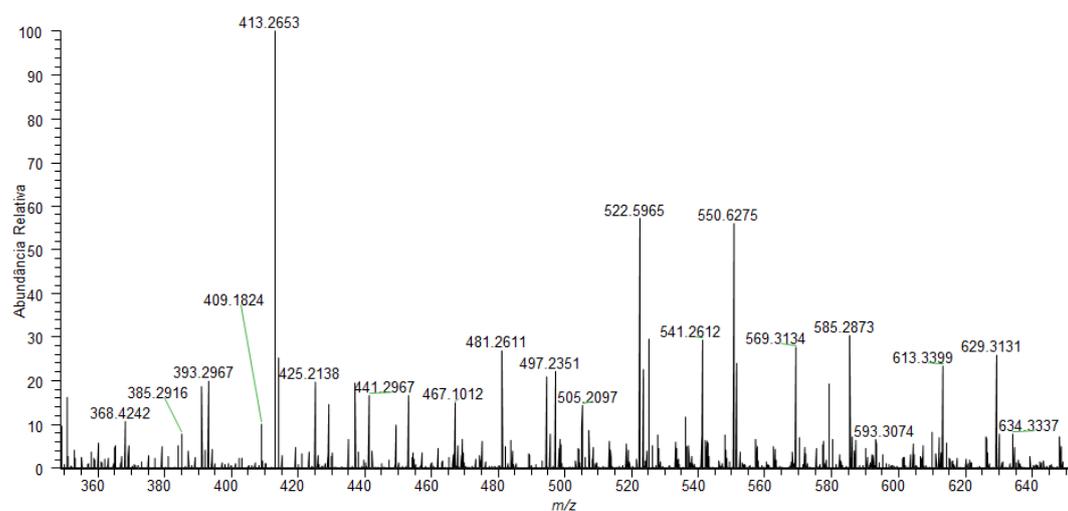


Figura 56 - Perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização positiva por DESI-MS na faixa de m/z 100-1200. a) N; b) FA; c) TPB; d) TPBo; e) TPM; e f) SARC.



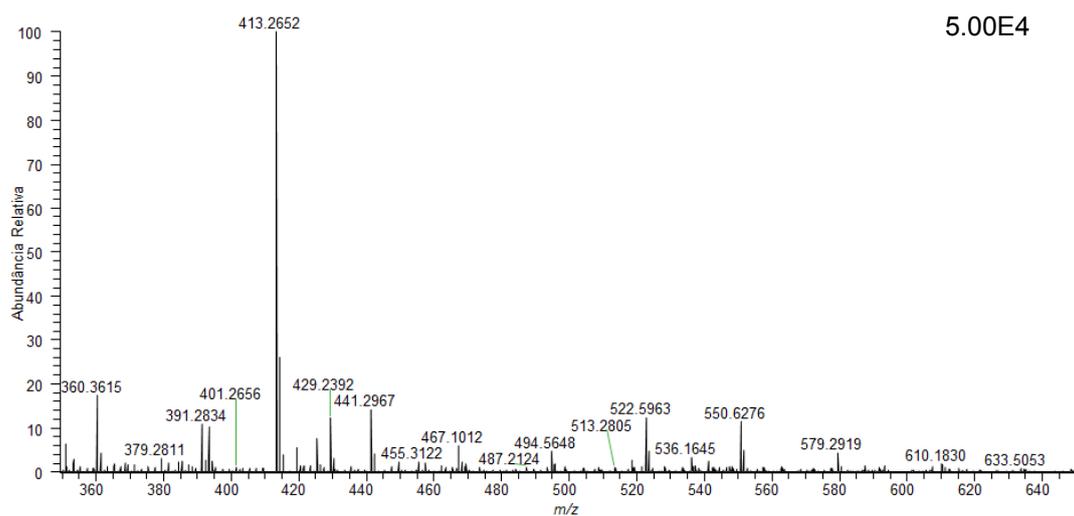
b) FA

1.00E4



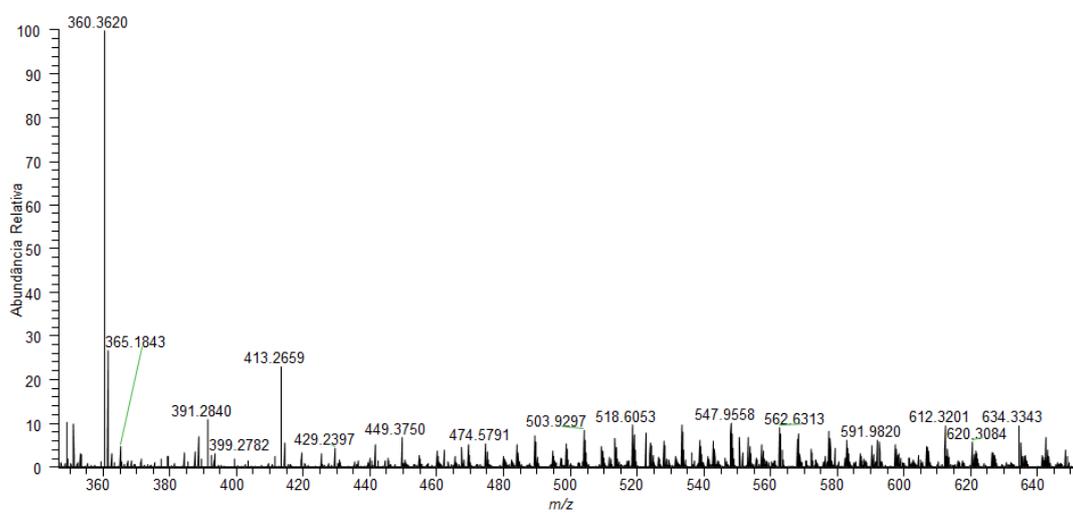
c) TPB

5.00E4



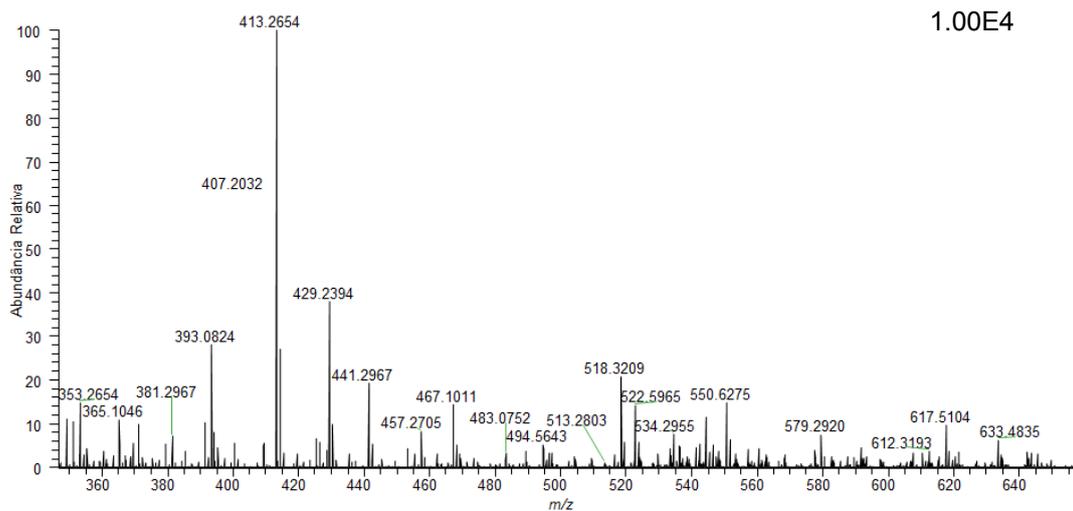
d) TPBo

1.00E4



e) TPM

1.00E4



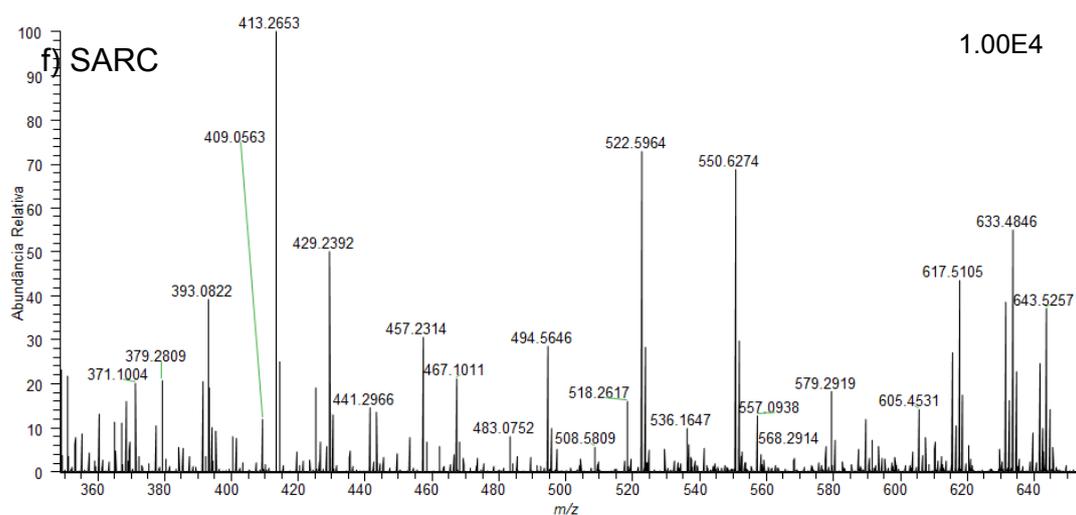
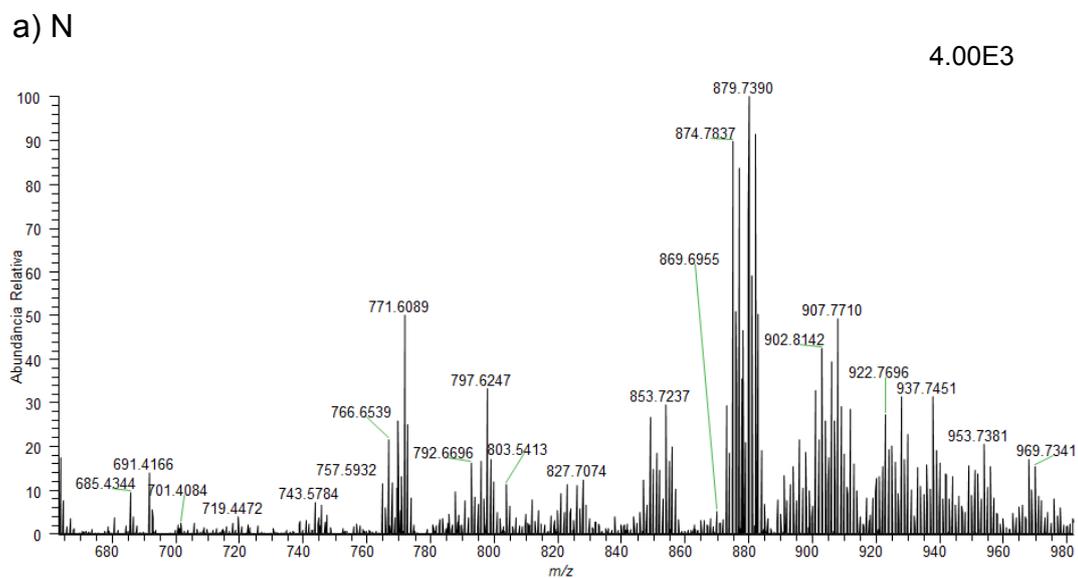
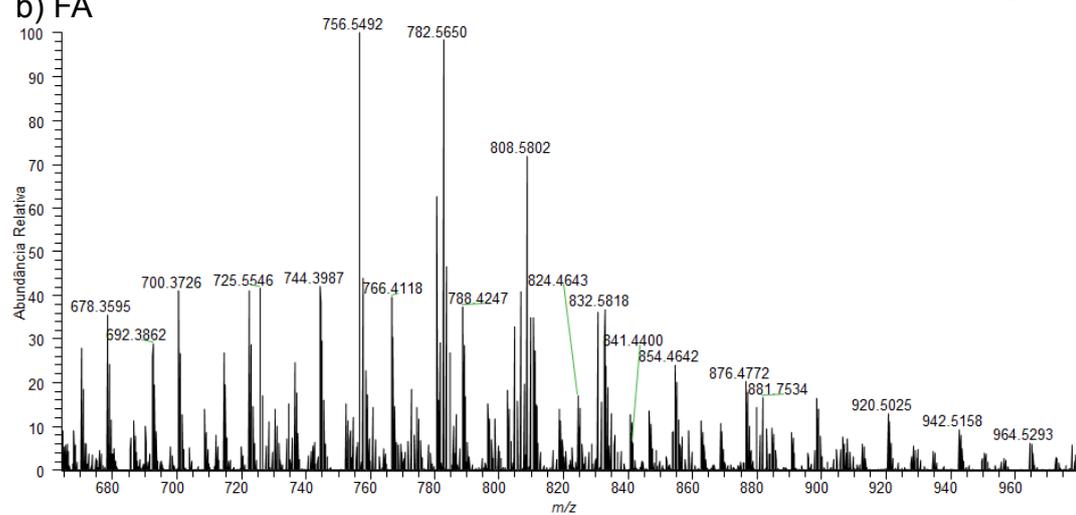


Figura 57 - Perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização positiva por DESI-MS na faixa de m/z 350-650, correspondente aos seguintes compostos: LPC, Cer, Col, CerP / S1P. a) N; b) FA; c) TPB; d) TPBo; e) TPM; e f) SARC.



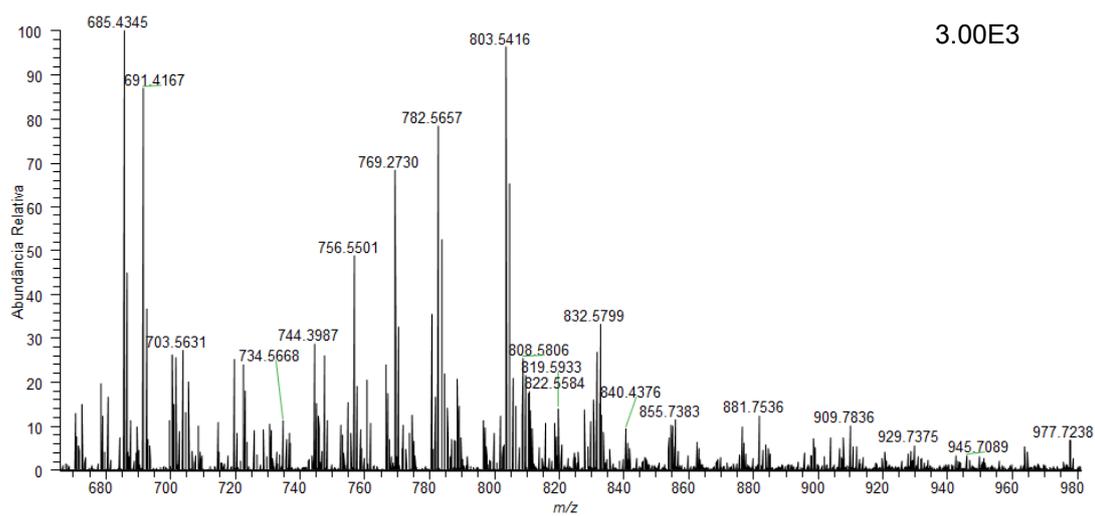
b) FA

3.00E3



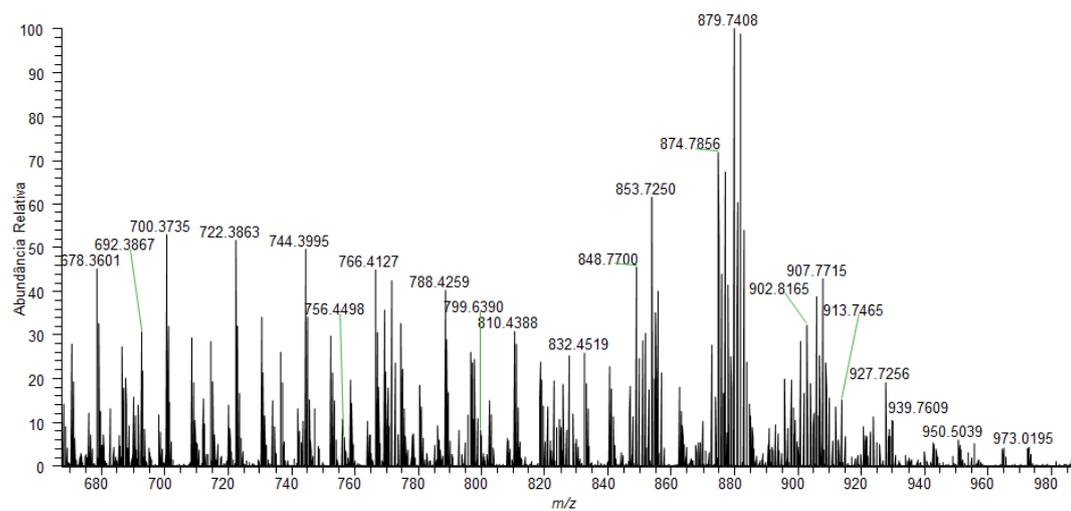
c) TPB

3.00E3



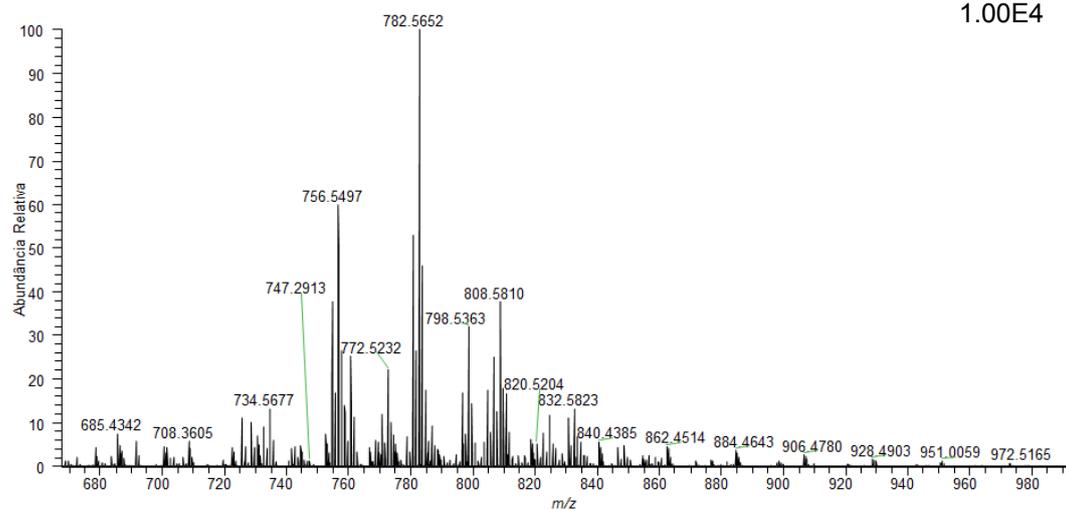
d) TPBo

4.00E3



e) TPM

1.00E4



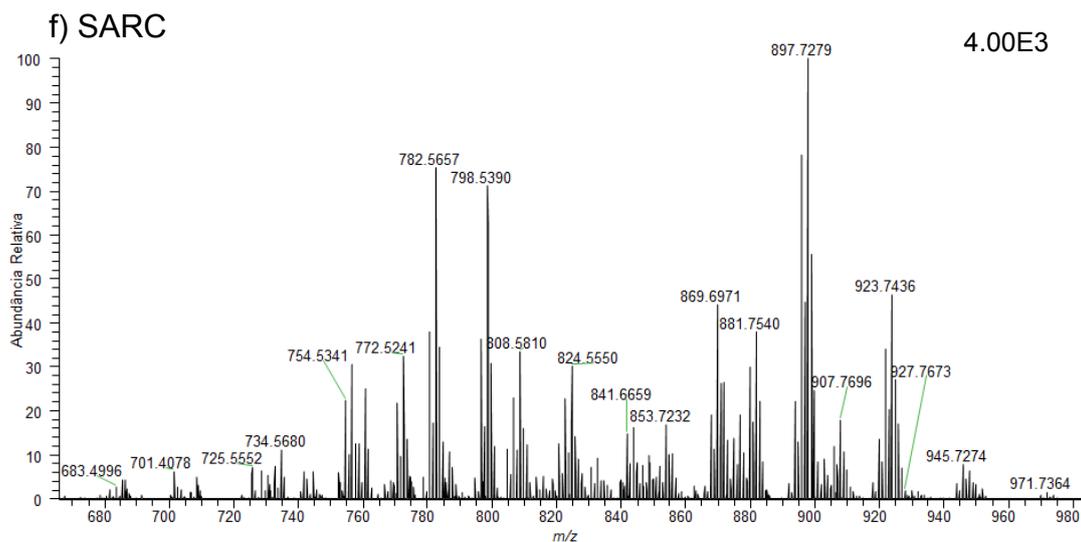


Figura 58 - Perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização positiva por DESI-MS na faixa de m/z 675-975, correspondente aos seguintes compostos: SM, PE, PS, PC e LacCer. a) N; b) FA; c) TPB; d) TPBo; e) TPM; e f) SARC.

Comparando os espectros de massas obtidos por ionização positiva através do DESI-MS de uma amostra de FA com uma amostra de TPB, observam-se semelhanças e diferenças entre esses espectros, tanto na faixa de m/z 350-650 (Figura 59), quanto na faixa de m/z 675-975 (Figura 60). O mesmo se observa ao comparar o TPBo com o TPM e o TPM comparado ao SARC. A Figura 61 mostra a sobreposição dos espectros do tecido histologicamente normal da mama e do TPM na faixa de m/z 100-1200.

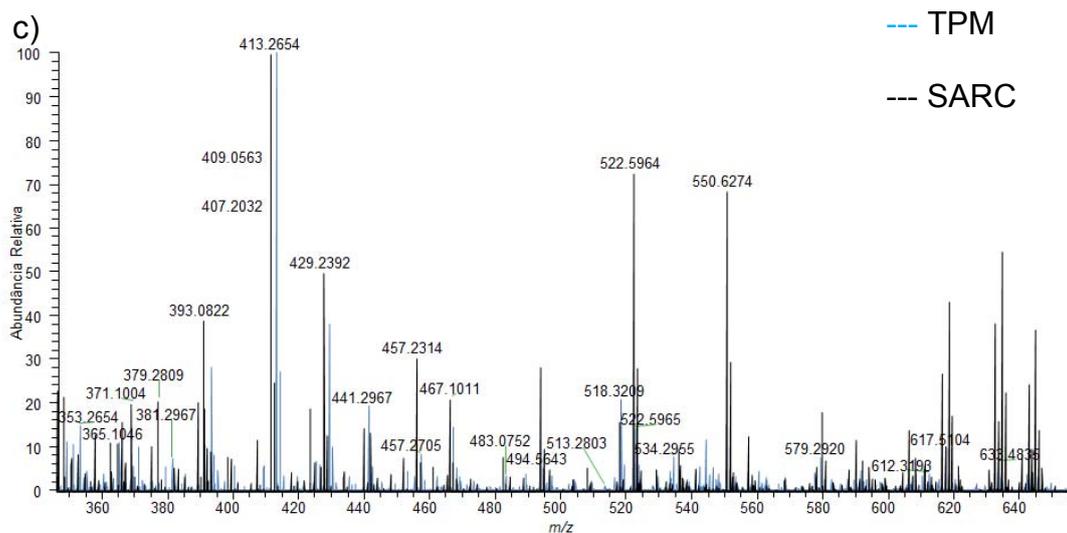
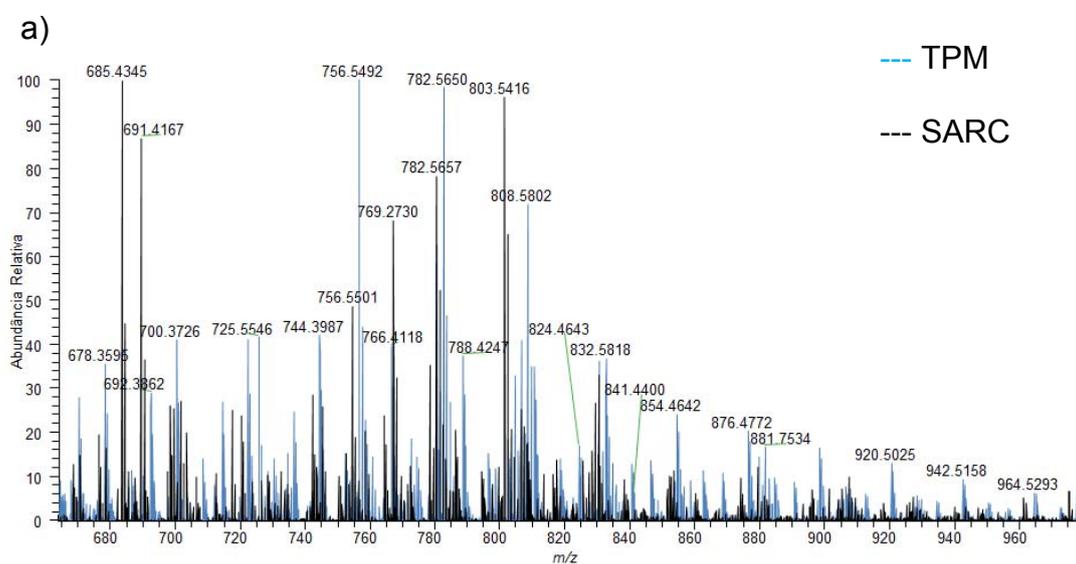


Figura 59 - Sobreposição dos perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização positiva por DESI-MS na faixa de m/z 350-650, correspondente aos seguintes compostos: LPC, Cer, Col, CerP / S1P. a)FA com espectro de massas em azul e TPB com espectro de massas em preto; b)TPBo com espectro de massas em azul e TPM com espectro de massas em preto; e c)TPM com espectro de massas em azul e SARC com espectro de massas em preto.



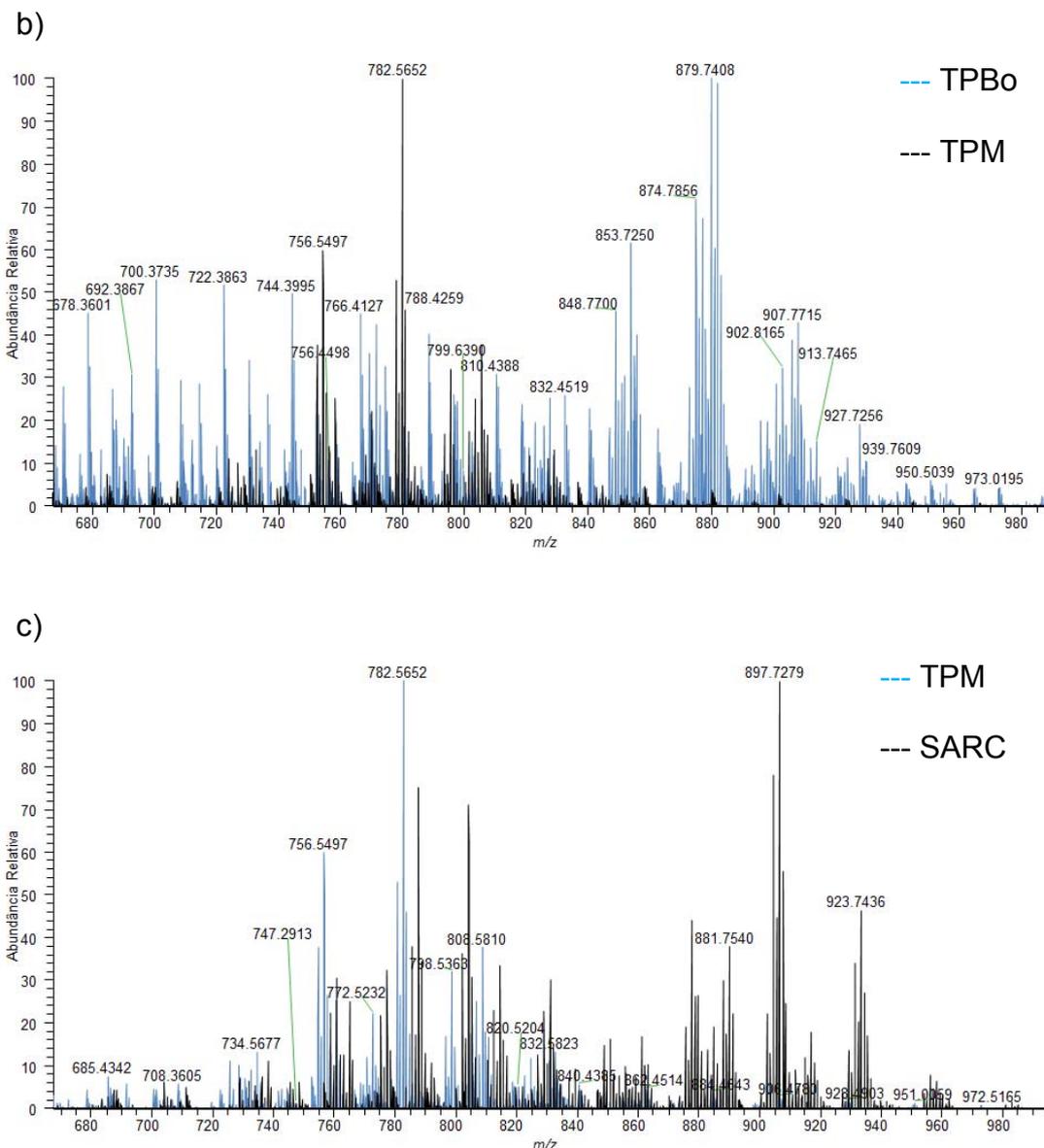


Figura 60 - Sobreposição dos perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização positiva por DESI-MS na faixa de m/z 675-975, correspondente aos seguintes compostos: SM, PE, PS, PC e LacCer. a) FA com espectro de massas em azul e TPB com espectro de massas em preto; b) TPBo com espectro de massas em azul e TPM com espectro de massas em preto; e c) TPM com espectro de massas em azul e SARC com espectro de massas em preto.

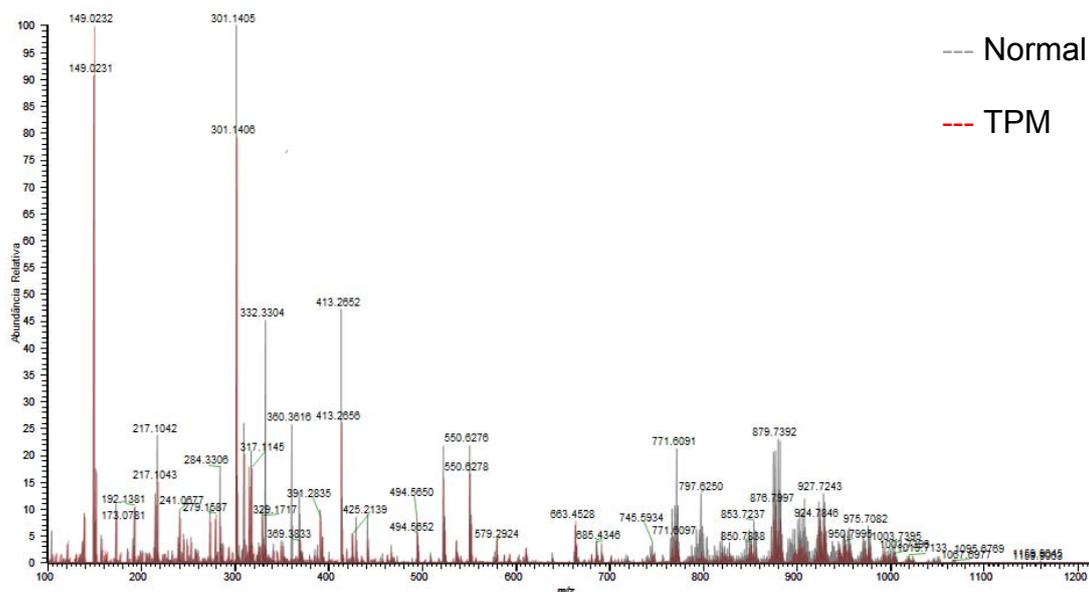


Figura 61 - Sobreposição dos perfis lipídicos e metabólicos obtidos através da ionização negativa por DESI-MS na faixa de m/z 100-1200. Tecido histologicamente normal com espectro de massas em cinza e TPM com espectro de massas em vermelho.

Assim como na ionização negativa, na ionização positiva também foram encontradas imagens químicas, que mostraram diferenças entre a intensidade de alguns íons. A Figura 62 mostra íons que diferenciam uma amostra de TPBo quando comparada ao tecido histologicamente normal da amostra S15. Observa-se que os íons m/z 227,2004 e 203,0527 estão presentes em ambos os tecidos, porém no caso do íon m/z 227,2004; se mostra em maior intensidade no tecido tumoral. Nota-se que o íon m/z 230,2473 é característico do tecido normal, está ausente no tecido tumoral e em alta intensidade no tecido normal. Os íons m/z 806,5533 e 756,5501 estão presentes principalmente no tecido tumoral e em baixíssima intensidade no tecido normal comparado ao TPBo.

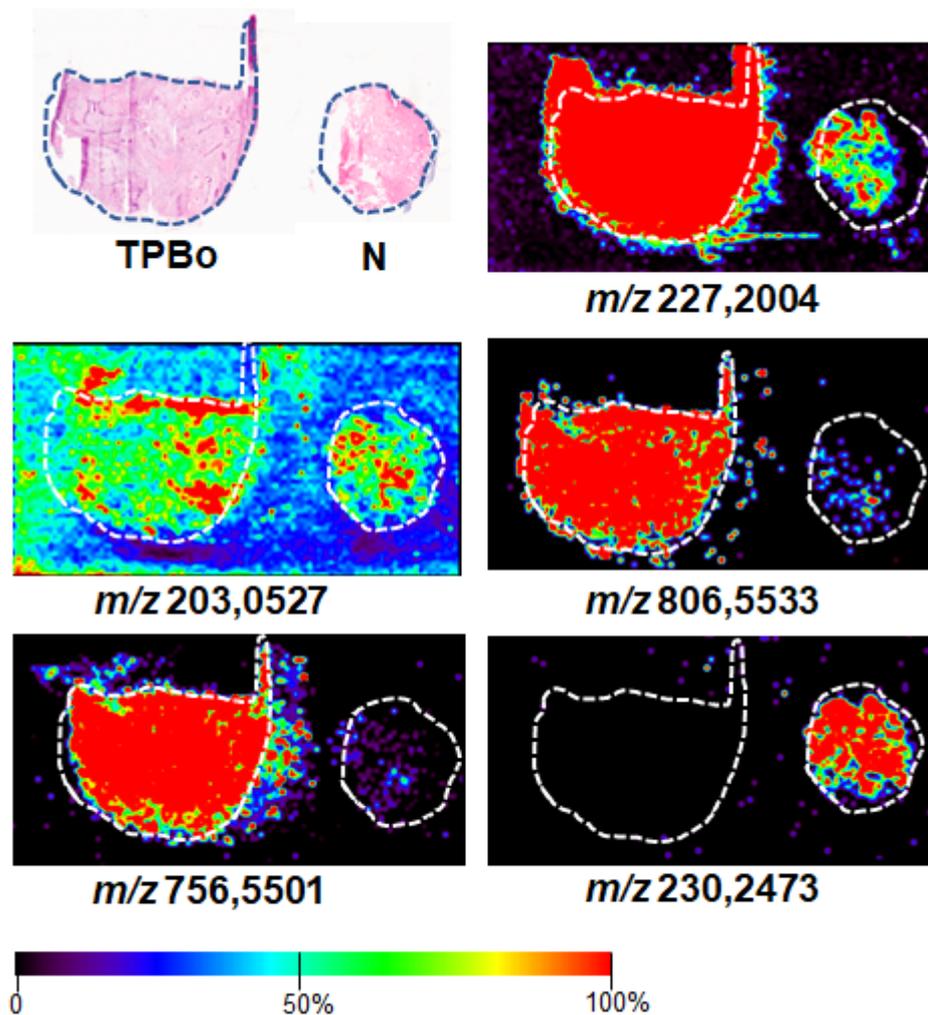


Figura 62 - Imagens químicas obtidas pela ionização positiva por DESI-MSI. Comparação entre a intensidade relativa de diversos íons em uma amostra de TPBo pareado com tecido histologicamente normal (amostra S15).

A Figura 63 apresenta a comparação entre a intensidade relativa de diversos íons na amostra S22. O TPM foi pareado com o tecido histologicamente normal. Observa-se que os íons m/z 672,4204 e 673,5881; são íons característicos do TPM, pois estão quase ausentes no tecido normal. Já os íons m/z 615,4942 e 618,4632 são íons que se apresentam em alta intensidade no tecido normal e ausentes no TPM. Alguns íons se apresentam

em intensidade semelhante em ambos os tecidos, como os íons m/z 691,4172 e 621,3959.

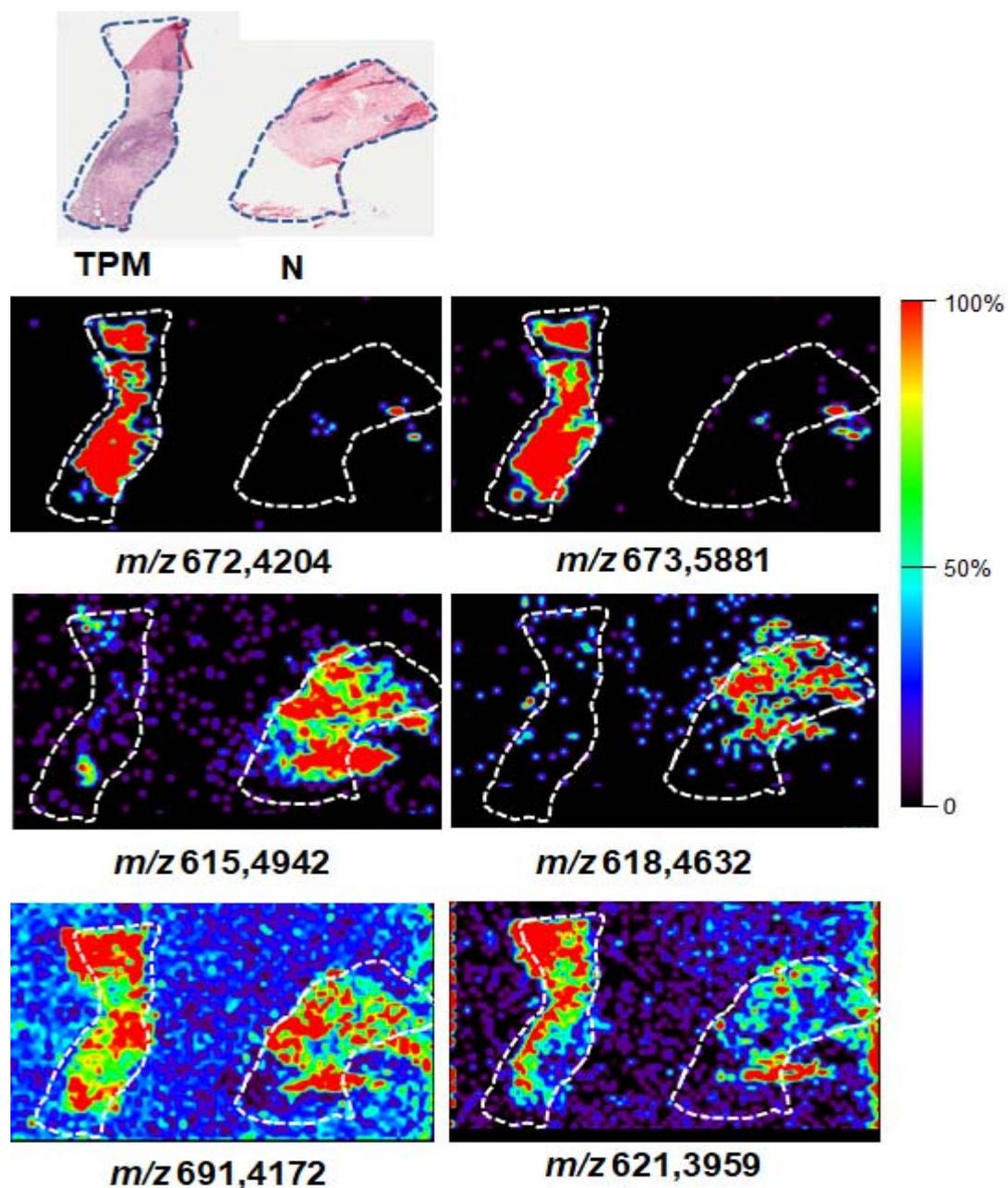


Figura 63 - Imagens químicas obtidas pela ionização positiva por DESI-MSI. Comparação entre a intensidade relativa de diversos íons em uma amostra de TPM pareado com tecido histologicamente normal (amostra S22).

A imagem química apresentada na Figura 64, mostra a comparação do íon m/z 430,2068 no TPM pareado com tecido histologicamente normal da amostra S22. Nota-se que este íon está mais intenso no tecido tumoral que no tecido normal.

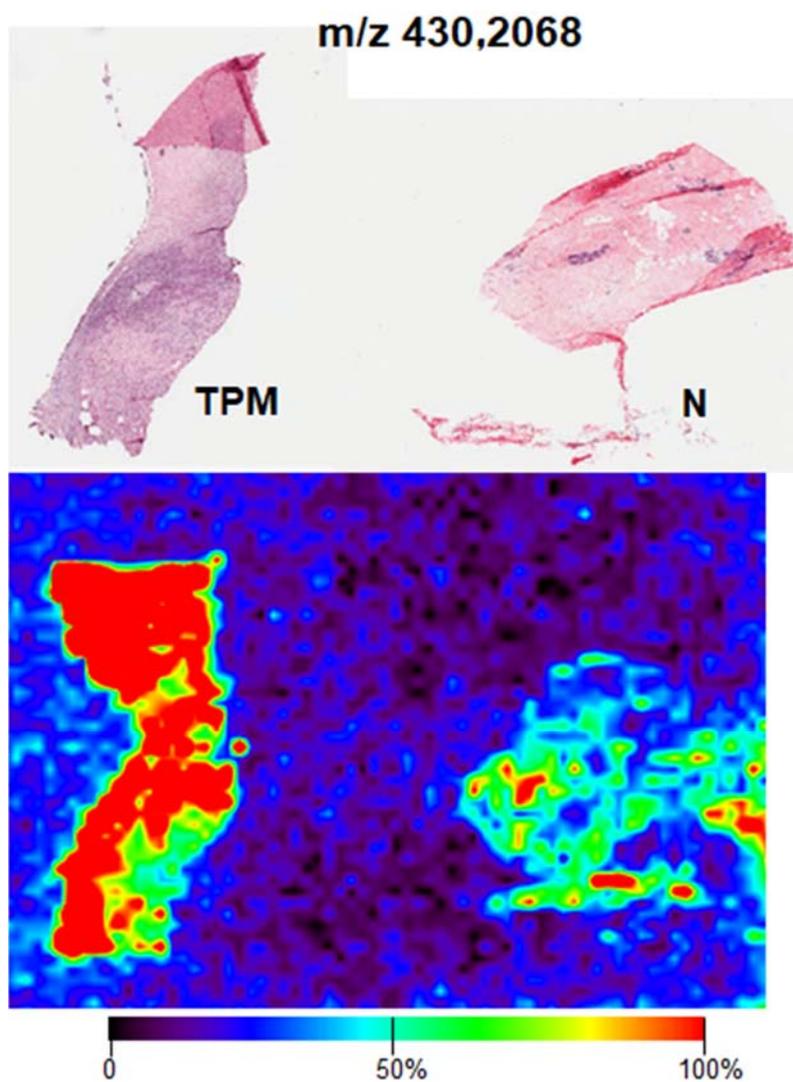


Figura 64 - Comparação entre a imagem química do íon m/z 430,2068 e a imagem histológica de uma amostra de TPM pareado com tecido histologicamente normal (amostra S22).

4.3.1 Íons encontrados através da ionização positiva por DESI-MSI

A Tabela 3 mostra os valores de m/z dos íons encontrados nesse estudo através da ionização positiva por DESI-MSI.

Tabela 3 - Massa experimental dos íons encontrados através da ionização pelo modo positivo através da análise por DESI-MSI.

Massa Experimental (m/z)				
145,1224	443,2037	579,4383	728,4571	812,6220
162,0501	443,2398	595,3621	728,5196	812,6464
163,9779	443,3021	597,3065	729,5228	813,5987
175,1115	443,3336	605,3404	730,3751	814,5559
203,0527	444,4192	615,4942	733,4654	815,5627
227,2004	445,2918	617,4595	736,6075	816,5872
230,2473	447,2716	617,5108	737,5446	817,5796
269,1471	450,3577	618,4632	737,5691	818,4256
279,2314	453,2088	621,3352	738,6229	819,5165
289,1773	455,2762	621,3959	739,6265	819,5996
291,0699	457,3289	639,4944	745,5934	820,5163
291,2298	463,2668	643,527	750,6226	821,5176
293,1359	464,3056	644,5271	752,3871	821,6601
301,1404	465,2975	647,5570	752,6383	825,5644
305,1572	467,2254	655,3819	753,4929	827,5532
313,2135	469,2923	656,3483	753,6420	828,5346
315,1561	471,2876	665,4220	756,5501	831,5698
327,2274	473,3449	667,4535	759,5159	832,4516
370,2018	474,3268	671,5728	759,5499	832,5733
371,2190	479,2609	672,4204	760,5844	833,5520
373,1979	485,2677	673,5881	761,5666	834,5575
386,2654	485,3244	682,5233	764,6384	837,6222
389,2504	489,2972	685,4345	767,5789	838,6387

Cont/ Tabela 3

Massa Experimental (m/z)				
391,2084	490,2901	687,4793	778,6141	839,6415
395,2149	499,3020	687,5521	778,6539	840,4396
399,2780	503,1929	689,5670	780,5282	841,6657
400,3419	503,3336	691,4172	780,5500	843,5949
401,2660	507,3659	692,4201	781,5951	844,5963
410,2739	517,3126	697,5873	781,6729	845,6110
411,2498	517,3496	698,3982	782,5653	846,6140
413,2258	518,3220	703,4522	783,5747	849,6936
423,1989	519,2921	703,5468	785,5669	850,6998
426,2172	525,2863	705,4328	786,5680	854,4644
426,3579	526,3038	707,3898	789,5874	857,5701
428,2297	533,2802	708,3605	790,6542	859,6253
429,2007	533,3065	709,4665	793,5454	860,5710
429,2968	533,3448	710,5911	793,5945	862,5550
429,3721	533,3697	714,5815	793,6732	865,6684
430,2068	534,2820	715,5068	801,5848	881,7548
430,3124	534,3196	719,4478	802,4527	892,6868
431,3486	541,2613	719,5588	803,5414	906,4774
432,2250	542,3213	720,4108	806,5533	907,4810
433,2833	548,3430	721,5726	806,5666	909,6486
435,2354	551,3337	722,3875	807,5578	910,7197
437,2359	553,3881	725,5210	807,6884	965,7032
437,3243	561,3387	726,5270	808,5826	983,7142
441,3201	562,3254	727,3652	809,5727	1075,6040
442,1919	567,3279	727,5103	810,5945	1157,8926

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, as intensidades médias dos íons em cada região de interesse (ROI) foram extraídas através do *software Biomap* no formato *.txt*. Estes dados foram normalizados a cada amostra pelo total do sinal obtido para as diferentes massas (100 a 1200). Após a normalização, para cada massa selecionada por inspeção visual, foi aplicado o teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney* (BAUER 1972) para fazer comparações entre diferentes tumores e tumor *versus* normal. Este teste não-paramétrico baseia-se apenas na ordenação dos valores observados, sem fazer qualquer suposição quanto a sua distribuição, sendo, portanto, bastante robusto. Os *p values* observados foram então corrigidos pelo método de Benjamini & Hochberg (BENJAMINI et al. 1995), sendo selecionadas como significativas as massas que apresentaram *p value* ajustado menor que 0,2.

4.4.1 Ionização Negativa

O diagrama de *Venn* abaixo (Figura 65) ilustra os íons que foram encontrados em cada amostra. Observa-se que há 60 íons comuns entre as amostras, porém que podem variar em intensidade, visto que esse diagrama foi construído considerando apenas a presença ou ausência do íon, desconsiderando-se a diferença de intensidade dos íons entre as amostras. Há 2 íons que foram encontrados apenas no tecido histologicamente normal, 1 nos FAs, 4 nos TPBs, 2 nos sarcomas do estroma da mama e 31 nos TPBs e TPMs. Por exemplo, o íon *m/z* 771,5181 foi encontrado apenas no TPB e

os íons m/z 304,2365; 328,2359; 394,2683; 521,4589; 549,4892; 551,4653; 551,5049; 557,4568; 583,4730; 589,5206; 591,5357; 613,5201; 629,4918; 739,6265 e 768,5314 foram encontrados apenas no TPBo ou TPM.

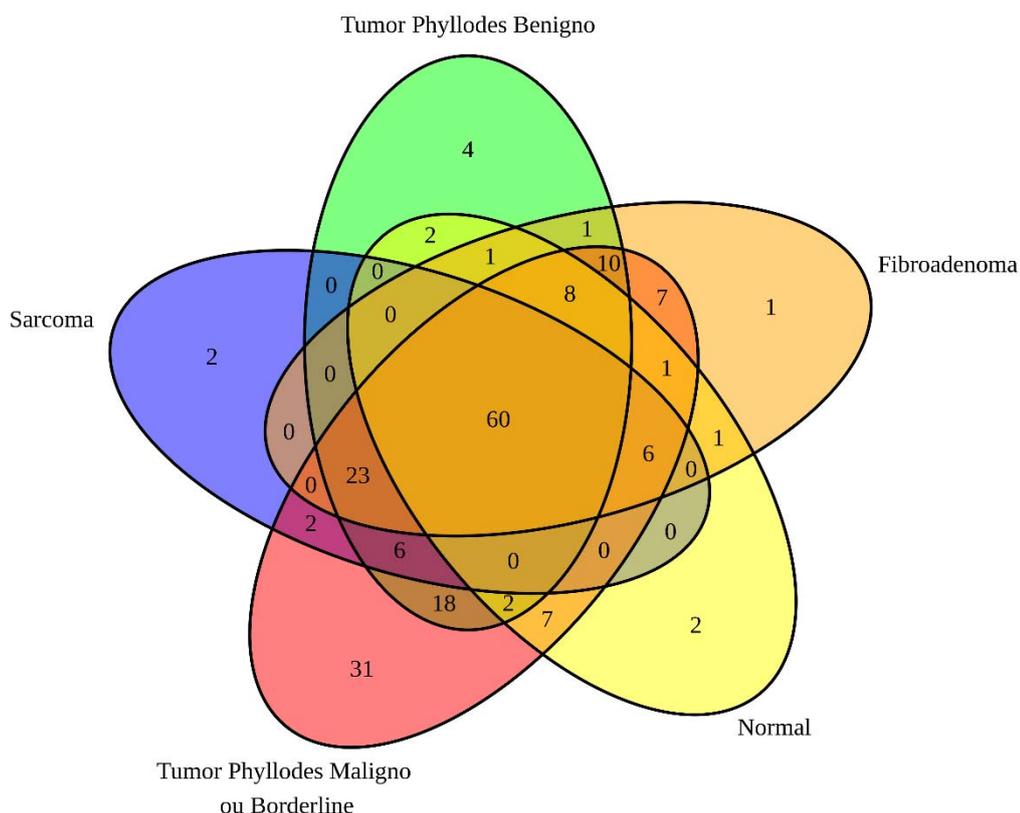


Figura 65 - Diagrama de *Venn* mostrando a quantidade de íons presentes em cada tipo de amostra, independente da intensidade dos íons.

Comparando os TPs entre si separadamente, 8 íons estavam presentes apenas no TPB, 5 íons presentes apenas no TPBo e 27 íons presentes apenas no TPM (Figura 66). Por exemplo, o íon m/z 773,5334 estava presente apenas nos TPBs. O íon m/z 583,4730 apenas no TPBo e os íons m/z 293,2123; 629,4918; 654,4660; 710,6302; 716,5241 e 768,5314

estavam presentes apenas no TPM. Esses íons podem ser usados para diferenciar esses tumores entre si.

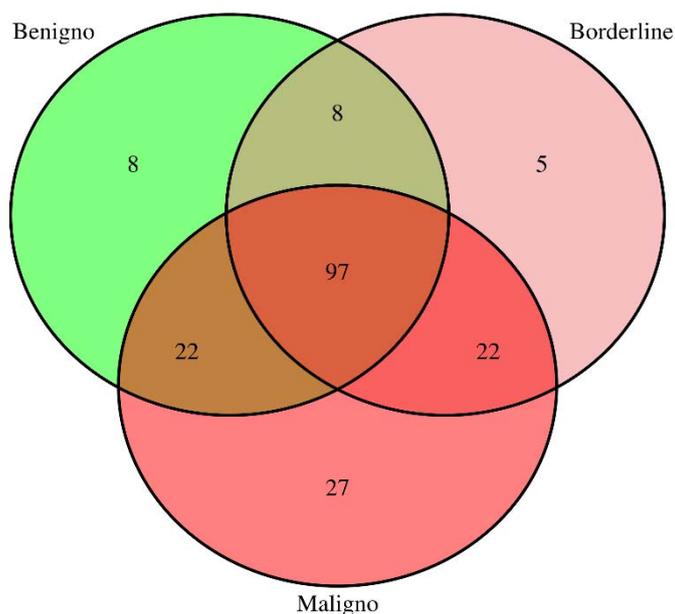


Figura 66 - Diagrama de *Venn* mostrando a quantidade de íons presentes em cada tipo de TP, independente da intensidade dos íons.

Através da análise estatística com o teste não-paramétrico *Wilcoxon-Mann-Whitney* foi observada diferença entre a intensidade dos íons entre diversos grupos de amostras como mostram as Tabelas 4 a 7. As imagens químicas, apresentadas nas Figuras 67 a 73, também apresentam diferença entre a intensidade relativa desses íons comparando espectros e imagens químicas na mesma escala.

Tabela 4 - Íons que se apresentaram em maior intensidade no FA que no TPBo.

<i>m/z</i>	<i>p value</i>	<i>p value ajustado</i>
187,0968	0,029	0,107
215,0323	0,073	0,149
227,2013	0,040	0,120
283,2644	0,006	0,090
627,4758	0,009	0,090
654,5645	0,013	0,102
682,5908	0,029	0,107
682,5913	0,054	0,135
684,6069	0,018	0,107
722,5129	0,056	0,135
722,5134	0,056	0,135
738,6610	0,073	0,149
742,5386	0,024	0,107
748,5270	0,054	0,135
750,5439	0,043	0,124
751,5276	0,021	0,107
786,5287	0,006	0,090
788,5457	0,072	0,149
794,5450	0,017	0,107
885,5501	0,021	0,107

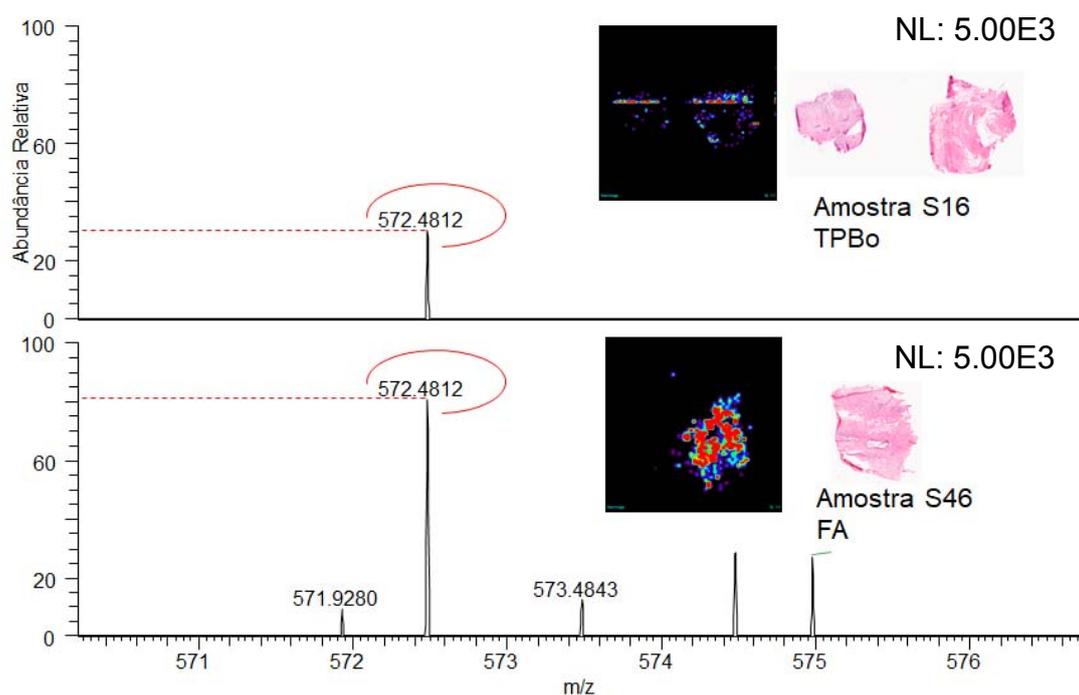


Figura 67 - Comparação da intensidade relativa do íon m/z 572,4812 entre TPBo e FA. Espectros de massas e imagens químicas obtidos através da ionização pelo modo negativo de um TPBo e um FA. Espectros na mesma escala. Imagens químicas na mesma escala. Imagens histológicas coradas com *H&E* pareadas com as imagens químicas.

Tabela 5 - Íons que se apresentaram em maior intensidade no TPBo que no FA.

<i>m/z</i>	<i>p value</i>	<i>p value ajustado</i>
301,2177	0,094	0,179
327,2332	0,040	0,120
329,2488	0,054	0,135
333,2802	0,072	0,149
335,2211	0,073	0,149
337,2375	0,094	0,179
393,2626	0,029	0,107
521,4589	0,009	0,090
523,4733	0,009	0,090
535,4735	0,004	0,090
537,4892	0,004	0,090
551,4653	0,054	0,135
551,5049	0,029	0,107
557,4568	0,054	0,135
559,4729	0,021	0,107
561,4891	0,021	0,107
563,5046	0,029	0,107
564,5080	0,032	0,107
565,5203	0,021	0,107
583,4730	0,018	0,107
585,4888	0,024	0,107
589,5206	0,017	0,107
591,5357	0,020	0,107
607,4730	0,024	0,107
609,4880	0,009	0,090
611,5045	0,004	0,090
613,5201	0,029	0,107
633,5105	0,039	0,120
635,5040	0,039	0,120
637,5196	0,036	0,116
637,5418	0,069	0,149

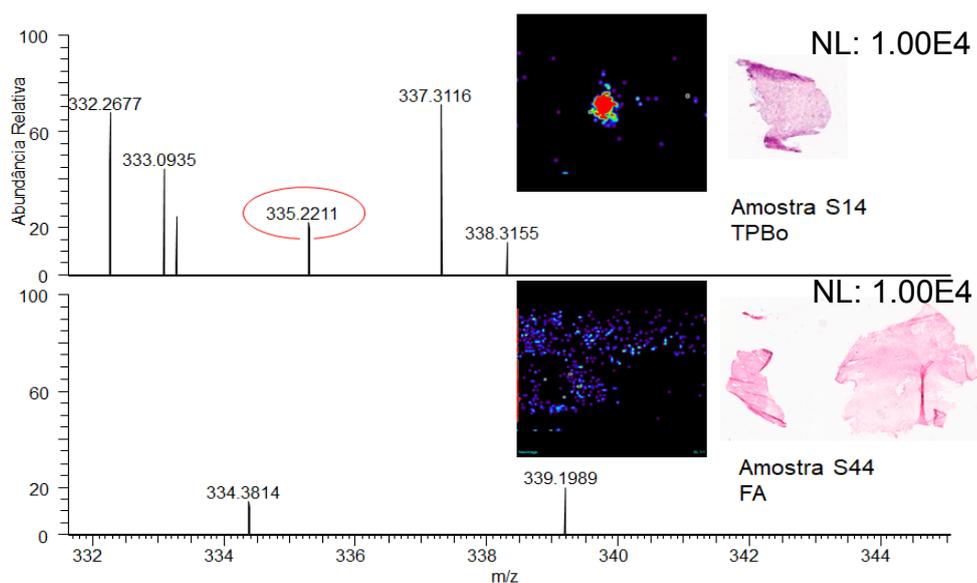


Figura 68 - Comparação da intensidade relativa do íon m/z 335,2211 entre TPBo e FA. Espectros de massas e imagens químicas obtidos através da ionização pelo modo negativo de um TPBo e um FA. Espectros na mesma escala. Imagens químicas na mesma escala. Imagens histológicas coradas com *H&E* pareadas com as imagens químicas.

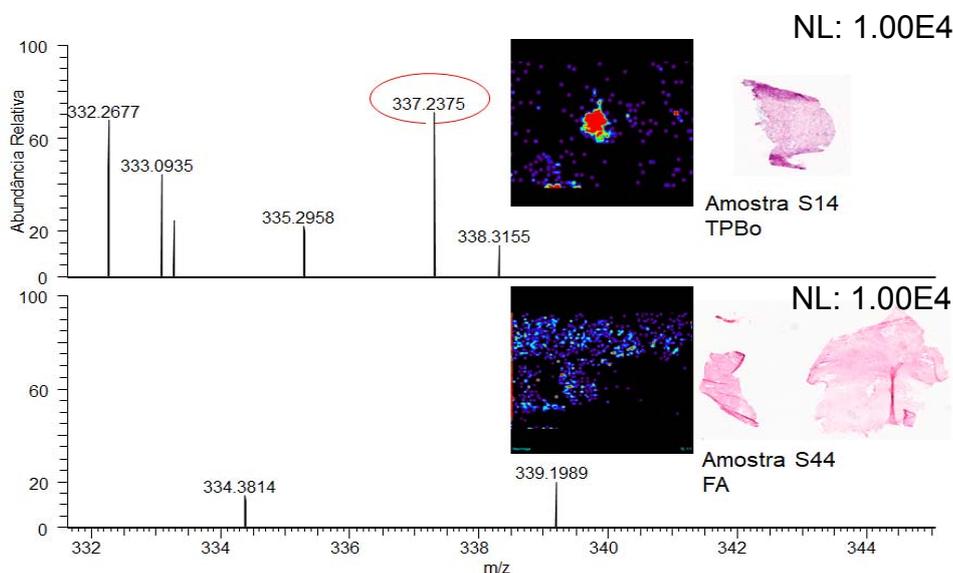


Figura 69 - Comparação da intensidade relativa do íon m/z 337,2375 entre TPBo e FA. Espectros de massas e imagens químicas obtidos através da ionização pelo modo negativo de um TPBo e um FA. Espectros na mesma escala. Imagens químicas na mesma escala. Imagens histológicas coradas com *H&E* pareadas com as imagens químicas.

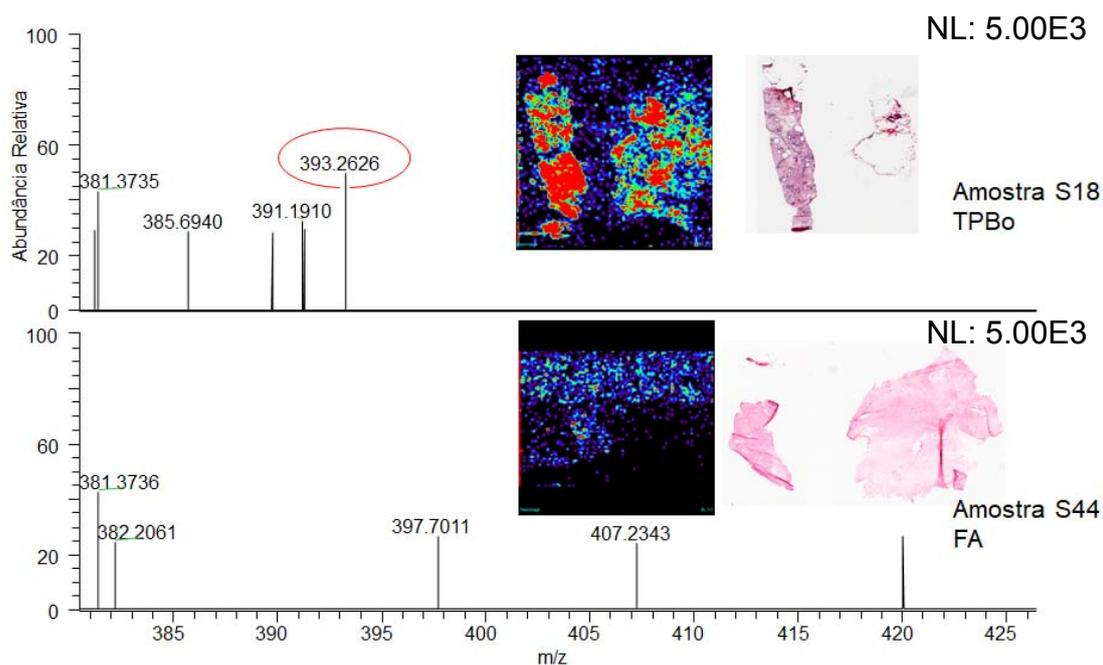


Figura 70 - Comparação da intensidade relativa do íon m/z 393,2626 entre TPBo e FA. Espectros de massas e imagens químicas obtidos através da ionização pelo modo negativo de um TPBo e um FA. Espectros na mesma escala. Imagens químicas na mesma escala. Imagens histológicas coradas com *H&E* pareadas com as imagens químicas.

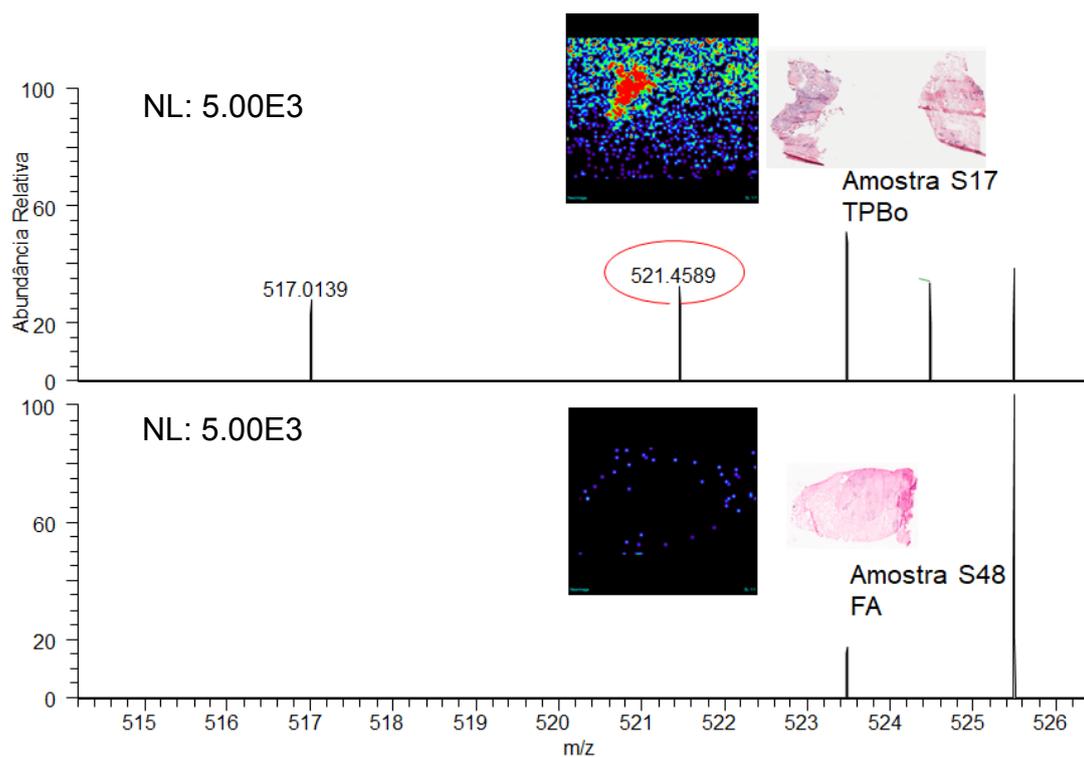


Figura 71 - Comparação da intensidade relativa do íon m/z 521,4589 entre TPBo e FA. Espectros de massas e imagens químicas obtidos através da ionização pelo modo negativo de um TPBo e um FA. Espectros na mesma escala. Imagens químicas na mesma escala. Imagens histológicas coradas com *H&E* pareadas com as imagens químicas.

Tabela 6 - Íons que se apresentaram em maior intensidade no TPM que no TPBo.

<i>m/z</i>	<i>p value</i>	<i>p value ajustado</i>
175,0240	0,064	0,176
283,2644	0,023	0,131
572,4812	0,029	0,131
627,4758	0,057	0,169
629,4918	0,012	0,131
682,5913	0,002	0,131
684,6069	0,016	0,131
710,6302	0,031	0,135
722,5129	0,020	0,131
737,5366	0,071	0,180
738,6610	0,070	0,180
742,5386	0,011	0,131
744,5538	0,012	0,131
748,5270	0,028	0,131
748,5439	0,025	0,131
750,5439	0,010	0,131
766,5391	0,037	0,149
786,5287	0,009	0,131
788,5457	0,026	0,131
794,5450	0,014	0,131
885,5501	0,013	0,131

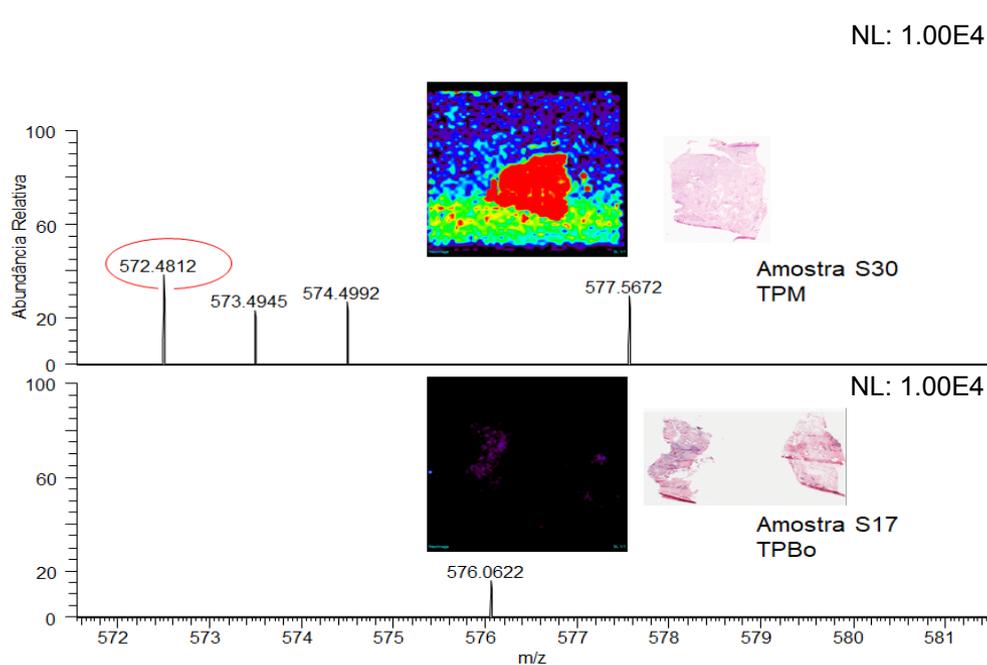


Figura 72 - Comparação da intensidade relativa do íon m/z 572,4812 entre TPM e TPBo. Espectros de massas e imagens químicas obtidos através da ionização pelo modo negativo de um TPM e um TPBo. Espectros na mesma escala. Imagens químicas na mesma escala. Imagens histológicas coradas com *H&E* pareadas com as imagens químicas.

Tabela 7 - Íons que se apresentaram em maior intensidade no TPBo que no TPM.

m/z	<i>p value</i>	<i>p value ajustado</i>
187,0968	0,057	0,169
187,1333	0,064	0,176
301,2177	0,051	0,169
521,4589	0,018	0,131
523,4733	0,033	0,140
535,4735	0,037	0,149
537,4892	0,046	0,169
557,4568	0,053	0,169
559,4729	0,064	0,176
583,4730	0,070	0,180
589,5206	0,057	0,169
607,4730	0,029	0,131

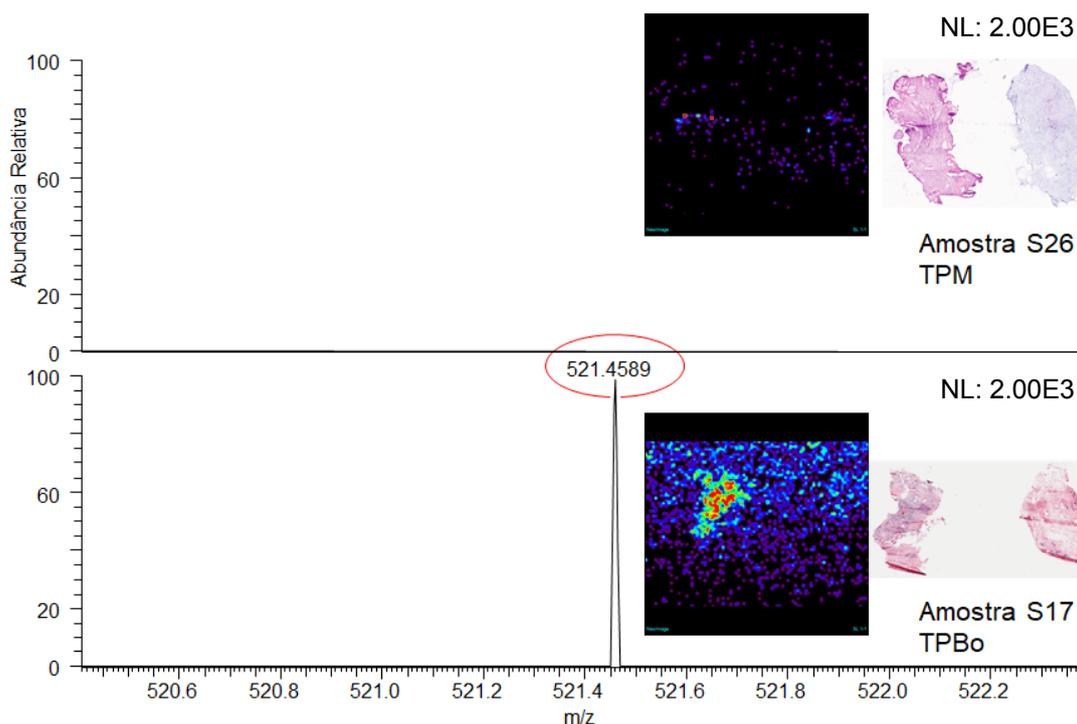


Figura 73 - Comparação da intensidade relativa do íon m/z 521,4589 entre TPM e TPBo. Espectros de massas e imagens químicas obtidos através da ionização pelo modo negativo de um TPM e um TPBo. Espectros na mesma escala. Imagens químicas na mesma escala. Imagens histológicas coradas com *H&E* pareadas com as imagens químicas.

4.4.2 Ionização Positiva

A análise estatística dos íons obtidos a partir da ionização positiva por DESI-MS também foi realizada através do teste não-paramétrico de *Wilcoxon-Mann-Whitney*, através dessa análise observamos diferenças na intensidade dos íons entre diversos grupos de amostras como mostram as Tabelas 8 a 12. Através das Figuras 74 e 75 podemos visualizar a diferença da intensidade relativa desses íons comparando espectros e imagens químicas na mesma escala.

Tabela 8 - Íons que se apresentaram em maior intensidade no TPB e FA comparado ao TPM e TPBo.

<i>m/z</i>	<i>p value</i>	<i>p value ajustado</i>
413,2258	0,026	0,19
533,2802	0,04	0,187
656,3483	0,032	0,167
709,4665	0,021	0,194
722,3875	0,025	0,149
819,5165	0,005	0,149
821,6601	0,011	0,188
832,5733	0,026	0,194
965,7032	0,026	0,194

Tabela 9- Íons que se apresentaram em maior intensidade no TPM e TPBo comparado ao TPB e FA.

<i>m/z</i>	<i>p value</i>	<i>p value ajustado</i>
162,0501	0,013	0,107
175,1115	0,01	0,103
227,2004	0,021	0,194
230,2473	0,011	0,16
289,1773	0,026	0,194
313,2135	0,026	0,194
370,2018	0,005	0,067
371,2190	0,018	0,189
391,2084	0,018	0,189
395,2149	0,015	0,15
423,1989	0,01	0,101
426,2172	0,005	0,104
429,2968	0,026	0,194
430,2068	0,018	0,189
433,2833	0,018	0,189
435,2354	0,003	0,178
437,3243	0,018	0,189
445,2918	0,036	0,171
450,3577	0,005	0,149
453,2088	0,004	0,149

Cont/ Tabela 9

<i>m/z</i>	<i>p value</i>	<i>p value ajustado</i>
455,2762	0,01	0,188
471,2876	0,013	0,15
485,2677	0,01	0,15
485,3244	0,006	0,178
490,2901	0,025	0,185
503,1929	0,004	0,098
503,3336	0,012	0,16
518,3220	0,018	0,189
519,2921	0,006	0,178
541,2613	0,006	0,149
561,3387	0,006	0,178
562,3254	0,036	0,171
567,3279	0,012	0,15
615,4942	0,008	0,149
639,4944	0,006	0,149
647,5570	0,019	0,193
687,5521	0,019	0,193
691,4172	0,003	0,178
692,4201	0,026	0,194
705,4328	0,026	0,194
707,3898	0,018	0,189
719,4478	0,018	0,189
725,5210	0,036	0,171
726,5270	0,045	0,199
729,5228	0,047	0,199
756,5501	0,013	0,15
761,5666	0,018	0,189
767,5789	0,034	0,194
780,5282	0,012	0,16
781,5951	0,007	0,149
782,5653	0,003	0,149
783,5747	0,017	0,189
783,5747	0,018	0,194
793,5454	0,012	0,16
803,5414	0,01	0,188

Cont/ Tabela 9

<i>m/z</i>	<i>p value</i>	<i>p value ajustado</i>
804,6689	0,017	0,189
806,5666	0,028	0,167
807,5578	0,028	0,191
808,5826	0,014	0,171
810,5945	0,013	0,15
817,5796	0,009	0,149
818,4256	0,011	0,16
819,5996	0,011	0,16
820,5163	0,021	0,194
821,5176	0,022	0,194
825,5644	0,035	0,171
827,5532	0,005	0,149
828,5346	0,045	0,199
841,6657	0,02	0,194
907,4810	0,026	0,194

Tabela 10 - Íons que se apresentaram em maior intensidade no TPM comparado ao TPB.

<i>m/z</i>	<i>p value</i>	<i>p value ajustado</i>
162,0501	0,028	0,130
227,2004	0,007	0,088
230,2473	0,031	0,154
426,3579	0,018	0,121
450,3577	0,012	0,097
453,2088	0,003	0,057
457,3289	0,025	0,139
469,2923	0,023	0,129
471,2876	0,034	0,163
485,2677	0,028	0,148
503,1929	0,010	0,097
503,3336	0,009	0,091
541,2613	0,009	0,091
615,4942	0,004	0,064
617,4595	0,046	0,197

Cont/ Tabela 10

<i>m/z</i>	<i>p value</i>	<i>p value ajustado</i>
617,5108	0,023	0,129
639,4944	0,003	0,057
643,5207	0,012	0,097
644,5271	0,024	0,136
725,5210	0,008	0,089
726,5270	0,015	0,113
727,5103	0,038	0,174
756,5501	0,020	0,128
767,5789	0,011	0,097
780,5282	0,002	0,057
780,5500	0,002	0,057
781,5951	0,001	0,057
782,5653	0,001	0,057
783,5747	0,004	0,064
789,5874	0,028	0,148
793,5454	0,031	0,154
793,5945	0,016	0,116
806,5533	0,007	0,088
807,5578	0,008	0,089
808,5826	0,004	0,060
809,5727	0,018	0,121
810,5945	0,013	0,107
812,6464	0,043	0,191
816,5872	0,016	0,116
817,5796	0,001	0,057
820,5163	0,012	0,097
821,5176	0,007	0,089
825,5644	0,039	0,178
827,5532	0,000	0,057
828,5346	0,030	0,153
832,5733	0,023	0,129
833,5520	0,046	0,197
841,6657	0,038	0,174

Tabela 11 - Íons que se apresentaram em maior intensidade no TPB comparado ao TPM.

<i>m/z</i>	<i>p value</i>	<i>p value ajustado</i>
431,3486	0,024	0,120
621,3959	0,023	0,129
692,4201	0,038	0,174
708,3605	0,033	0,161
709,4665	0,016	0,116
819,5165	0,003	0,057

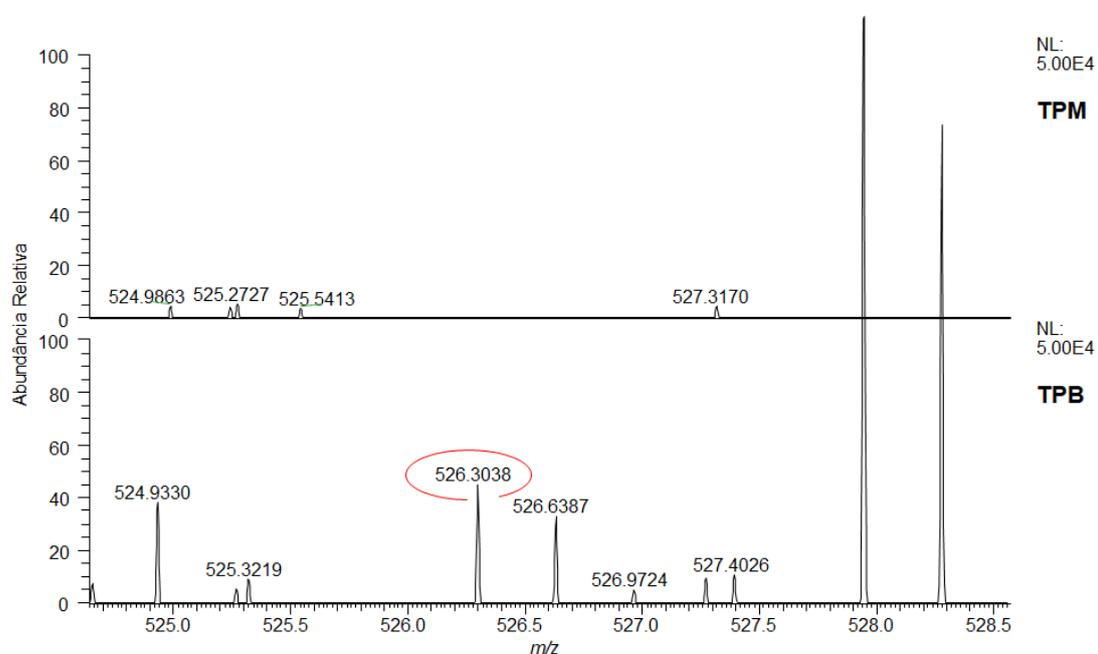


Figura 74 - Espectro de massas obtido através da ionização pelo modo positivo por DESI-MS de um TPM e um TPB. Comparação da intensidade relativa do íon *m/z* 526,3038 entre TPM e TPB. Espectros na mesma escala.

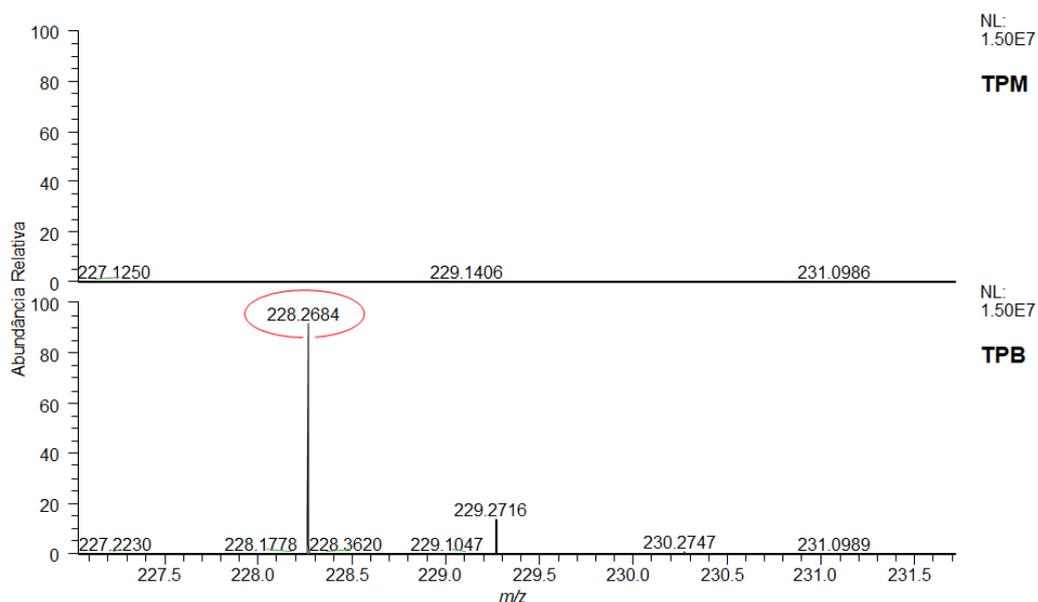


Figura 75 - Espectro de massas obtido através da ionização pelo modo positivo por DESI-MS de um TPM e um TPB. Comparação da intensidade relativa do íon m/z 228,2684 entre TPM e TPB. Espectros na mesma escala.

Tabela 12 - Íon que se apresentou em maior intensidade no TPM comparado ao FA.

m/z	p value	p value ajustado
230,2473	0,002	0,104

4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ÍONS

A partir de cada arquivo *.img* correspondente a uma amostra no *Biomap*, obtivemos valores de m/z 100,00 a 1200,00 em intervalos a cada 0,33; por exemplo 100,33; 100,66; 100,99 (...); totalizando 32.767 valores para cada amostra. Desses, uma pequena parte gerou imagem no *Biomap* (193 imagens no modo de ionização negativa e 637 imagens no modo de ionização positiva). Para 52 amostras seriam 1.703.884 dados no modo negativo e igual

número de dados no modo positivo. O excesso de dados obtidos através da espectrometria de massas é um obstáculo para a análise estatística que precisa ser suplantado (XIONG et al. 2012; EBERLIN et al. 2014). Para transpor essa dificuldade na análise de milhares a milhões de dados, alguns autores como XIONG et al. (2012) sugerem agrupar os espectros por grupos, o *binning method*, outros, sugerem o uso da análise multivariada (DILL et al. 2010; ALEXANDROV 2012; PIRRO et al. 2012). Para solucionar o problema do excesso de dados e visando eliminar ruídos químicos e eletrônicos, foram selecionados os valores m/z dos íons que mostraram imagens químicas no *Biomap* correspondentes a imagem do tecido visualizado na coloração em *H&E*. Dessa forma, os 32.767 valores por amostra foram reduzidos para 193 (ionização negativa) e 637 (ionização positiva), o que reduziu consideravelmente a quantidade de dados totais (de 1.703.884 para 10.036 e 33.124, ionização negativa e positiva, respectivamente) e permitiu a comparação das intensidades relativas dos íons entre as amostras dos tecidos. Cada região de interesse (ROI) selecionada nos forneceu uma lista com a intensidade relativa média dos íons, permitindo excluir valores de m/z que provavelmente eram ruídos químicos ou eletrônicos.

Um teste não paramétrico foi escolhido para analisar os dados das intensidades relativas dos íons nas ROIs, o teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney*, por ser um teste que distribui os dados de forma nominal e não pressupõe a distribuição dos dados. Outros estudos em espectrometria de massas também utilizaram testes não-paramétricos para analisar os seus dados, como CALLIGARIS et al. (2013) e JARMUSCH et al. (2016) que utilizaram o teste

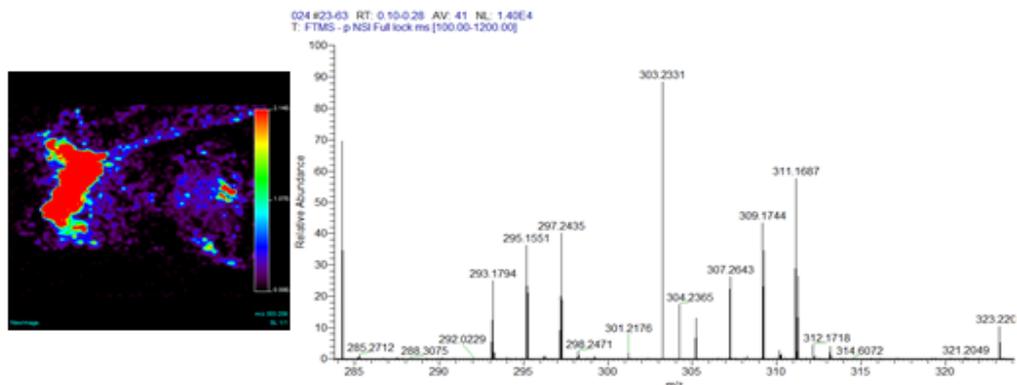
de *Kruskal-Wallis* e também GOTO et al. (2014) e GUO et al. (2014) que utilizaram o teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney*.

A comparação entre os diferentes tecidos tumorais e tecido normal não obteve nenhum valor de m/z que diferenciasse as amostras de forma estatisticamente significativa, provavelmente devido a essa comparação ser feita com poucas amostras de tecido normal da mama (15 amostras). Porém, através da técnica DESI-MSI e da comparação dos espectros de massas, obtidos da mesma lâmina a partir de amostras de tumor e de tecido normal, foi possível observar diferenças entre os íons presentes no tumor e no tecido histologicamente normal. Estudos posteriores com maior número de amostras de tecido normal da mama poderão mostrar diferenças estatisticamente significativas entre o tumor e o tecido normal da mama.

A identificação dos metabólitos foi realizada a partir do m/z apresentado nas imagens químicas selecionadas. Foi utilizado um dos arquivos (extensão *.raw*) do conjunto dos arquivos *.raw* de determinada amostra. A escolha foi feita com base no eixo x/y verificado no *Biomap*, correspondente ao tecido a ser avaliado a fim de buscar a massa experimental exata do íon. Através do próprio *software XCalibur*, foram propostas possíveis fórmulas moleculares avaliando o erro entre as massas teórica e experimental e a distribuição isotópica do íon. Essa identificação só foi possível pelo fato de ter utilizado neste estudo o analisador de massas de alta resolução (Orbitrap), o qual fornece dados que, quando abertos no *software Qual Browser-XCalibur*, nos fornecem a massa e a provável fórmula molecular com erros mínimos. Um equipamento de alta resolução como o que foi utilizado, apresenta a massa

exata do íon com alta precisão, com 4 casas decimais, o que permite diferenciar compostos com erro de massa muito pequeno (EBERLIN et al. 2011). A partir dessa massa experimental e da fórmula molecular proposta, foi feita a busca de possíveis metabólitos que apresentam massa próxima a encontrada; essa busca foi feita em bancos de metabólitos como *Metlin*, *LipidMaps* e *Metabolomics Workbench*. A massa teórica foi obtida no próprio software *Qual Browser-XCalibur*, também com quatro casas decimais. O erro obtido pela diferença entre a massa teórica e a massa experimental em parte por milhão (ppm) foi apresentado pelo software *Qual Browser-XCalibur*. Neste estudo o erro tolerado entre as massas foi menor que 5 ppm. Assim foram identificados os metabólitos compatíveis com os dados experimentais (Figura 76). A identificação foi finalizada com a confirmação na literatura.

No caso de valores de m/z detectados nesse estudo que não foram encontrados na literatura, nem em bancos de lipídios ou metabólitos, se faz necessário utilizar outros métodos analíticos como a espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) para identificá-los (BLEIJERVELD et al. 2006). No MS/MS o íon é fragmentado e, através da identificação dos fragmentos desse íon e, utilizando um banco de dados com informações sobre tais fragmentos, como por exemplo, o *Metlin*, é possível identificá-lo. O MS/MS também auxilia, em alguns casos, na identificação de isômeros estruturais, os isômeros tem mesma fórmula molecular, mesmo m/z , porém diferem em sua estrutura molecular.



Search the Metabolomics Workbench Metabolite Database by classification (lipid or non-lipid) with a mass (m/z) value

Search the database by first restricting your search to a particular class of metabolites, then entering an m/z value in the "Mass" input box and selecting an appropriate ion type and mass tolerance range.

Search Lipid classes in MW Metabolite Database

LIPID MAPS Category:	
LIPID MAPS Main class:	
LIPID MAPS Sub class:	
Mass (m/z):	303.2331
Ion type:	[M-H] ⁻
Mass Tolerance:	± 0.0005 m/z
<input type="button" value="Submit"/> <input type="button" value="Redefinir"/>	

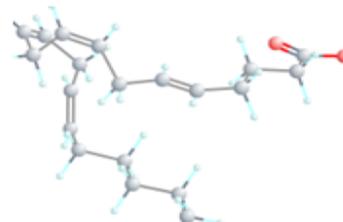
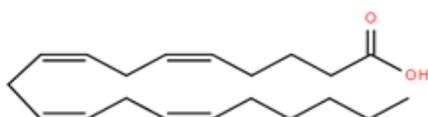
Structures in MW Metabolite Database matching selection criteria:

m/z : 303.2331, Ion-type: [M-H]⁻, Tolerance: ± 0.0005

Note: Lipid structures containing double bonds and/or functional groups with defined regiochemistry, geometry and stereochemistry are meant to serve as examples for structure-drawing purposes. In many cases there may be alternative isobaric structures.

Structure	PubChem_CID	Studies	Common Name	Input m/z	Exact m/z	Delta	Formula	Ion
1243	9543002	-	10,13-Eicosadiynoic acid	303.2331	303.2330	0.0001	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻
411	52021782	-	19,3(2E,10E,13E)(3Me,5Me)(R)7My,19Me	303.2331	303.2330	0.0001	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻
1244	52021858	-	19,3(2E,9E,11E)(3Me,5Me)(S)7My,19Me	303.2331	303.2330	0.0001	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻
1243	52021857	-	17,4(2E,4E,9E,11E)(7Me)(R)10Me,13Me(S)	303.2331	303.2330	0.0001	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻
424	52021794	-	17,4(2E,4E,9E,11E)(3Me)(R)10Me,19Me(R)	303.2331	303.2330	0.0001	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻
287	5312319	Studies	18-methyl-6Z,8Z,11Z,14Z-nonadecatrienoic acid	303.2331	303.2330	0.0001	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻
1210	52021839	-	20,4(SZ,13Z,16Z,18Z)	303.2331	303.2330	0.0001	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻
1156	13062721	-	2E,8Z,11Z,14Z-Eicosatetraenoic acid	303.2331	303.2330	0.0001	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻
806	5312535	-	4,7,12,15-Eicosatetraenoic acid	303.2331	303.2330	0.0001	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻
800	5202040	-	4,8,12,15-Eicosatetraenoic acid	303.2331	303.2330	0.0001	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻
806	5312536	Studies	4Z,7Z,10Z,13Z-eicosatetraenoic acid	303.2331	303.2330	0.0001	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻
807	5312540	-	4Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid	303.2331	303.2330	0.0001	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻
808	5312541	-	5,11,14,17-Eicosatetraenoic acid	303.2331	303.2330	0.0001	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻
809	5312542	Studies	5,8,11,14-eicosatetraenoic acid	303.2331	303.2330	0.0001	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻
1156	12063468	-	5(E)-Arachidonic acid	303.2331	303.2330	0.0001	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻

Metabolomics Structure Database



PubChem CID:	444839
Common Name:	Arachidonic acid
Systematic Name:	6Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid
Synonyms:	6Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid; AA; Arachidonate; cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid; (all-Z)-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid; all-cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid [PubChem Synonyms] <input type="button" value=""/>
Exact Mass:	304.2402 (neutral) Calculate m/z <input type="button" value=""/> <input type="button" value=""/> 303.2330 (C ₂₀ H ₃₀ O ₂)
Formula:	C ₂₀ H ₃₀ O ₂
InChIKey:	YZ/BAPSQVZRRGB-DOFZRALJSA-N
LIPID MAPS Category:	Fatty Acyls
LIPID MAPS mainclass:	Fatty Acids and Conjugates
LIPID MAPS subclass:	Unsaturated fatty acids
MoNA MS spectra:	View spectra
Studies:	Available studies

Fonte: https://www.metabolomicsworkbench.org/data/mb_mass_form.php#M2

Figura 76 - Busca pelo valor de m/z no *Metabolomics Workbench*. Através da busca em outros bancos de metabólitos também é possível identificar os íons.

A Tabela 13 apresenta alguns dos metabólitos detectados no modo de ionização negativo, juntamente com sua respectiva fórmula molecular, massa exata teórica e experimental e o erro entre estas massas em ppm. Neste estudo, através da ionização negativa por DESI-MS, foram encontrados muitos ácidos graxos (menores valores de m/z) e, nos maiores valores de m/z , encontramos fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositol (PI).

Na Tabela 14 observam-se alguns dos metabólitos identificados (como ácidos graxos, aminoácidos e lipídios). A provável identificação para cada valor de m/z foi feita através da busca nos bancos de metabólitos, de acordo com o menor erro em ppm.

Tabela 13 - Íons detectados nesse estudo com sua massa experimental e teórica, fórmula molecular e erro em ppm (ionização pelo modo negativo por DESI-MS).

Massa		Fórmula		
Experimental	Espécie iônica	molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
124,0066	[M-H] ⁻	C ₂ H ₇ NO ₃ S	124,0062	-1,683
135,0302	[M-H] ⁻	C ₄ H ₈ O ₅	135,0287	2,419
175,0240	[M-H] ⁻	C ₆ H ₈ O ₆	175,0237	-4,292
187,0968	[M+H] ⁻	C ₈ H ₁₄ O ₂	187,0964	-0,186
187,1333	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₂₀ O ₃	187,1328	-3,408
283,2644	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	283,2631	0,517
301,2177	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	301,2162	1,449
521,4589	[M-H] ⁻	C ₃₃ H ₃₈ O ₅	521,4564	-0,084
523,4733	[M-H] ⁻	C ₃₃ H ₆₄ O ₄	523,4720	0,394
535,4730	[M-H] ⁻	C ₃₄ H ₆₄ O ₄	535,4720	-0,212
537,4887	[M-H] ⁻	C ₃₄ H ₆₆ O ₄	537,4877	-0,119
559,4729	[M-H] ⁻	C ₃₆ H ₆₄ O ₄	559,4720	-0,471
583,4730	[M+HCOO] ⁻	C ₃₇ H ₆₂ O ₂	583,4720	-0,212
589,5206	[M+HCOO] ⁻	C ₃₇ H ₆₈ O ₂	589,5190	0,909
627,4758	[M+Cl] ⁻	C ₃₇ H ₆₈ O ₅	627,4749	-0,408
629,4918	[M+Cl] ⁻	C ₃₇ H ₇₀ O ₅	629,4906	0,228
722,5129	[M-H] ⁻	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	722,5119	-0,032
737,5366	[M-H] ⁻	C ₃₉ H ₇₉ O ₁₀ P	737,5327	3,799
742,5386	[M-H] ⁻	C ₄₁ H ₇₈ NO ₈ P	742,5381	-0,738
744,5538	[M-H] ⁻	C ₄₁ H ₈₀ NO ₈ P	744,5537	-1,367
748,5270	[M-H] ⁻	C ₄₃ H ₇₆ NO ₇ P	748,5275	-2,115
750,5439	[M-H] ⁻	C ₄₃ H ₇₈ NO ₇ P	750,5432	-0,511
766,5391	[M-H] ⁻	C ₄₃ H ₇₈ NO ₈ P	766,5381	-0,063
786,5287	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₇₈ NO ₁₀ P	786,5279	-0,352
788,5442	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₈₀ NO ₁₀ P	788,5436	-0,605
794,5450	[M-H] ⁻	C ₄₁ H ₈₁ NO ₁₁ S	794,5446	-0,901
885,5501	[M-H] ⁻	C ₄₇ H ₈₃ O ₁₃ P	885,5487	0,314

Tabela 14 - Metabólitos identificados através dos bancos de dados *Metlin*, *LipidMaps* e *Metabolomics Workbench* (ionização pelo modo negativo por DESI-MS).

Massa Experimental	Metabólito proposto
124,0066	Taurina
135,0302	Treonato
175,0240	Ácido ascórbico
187,0968	FA(8:1)
187,1333	Ácido 3-hidroxicáprico
283,2644	FA(18:0) WE(18:0)
301,2177	FA(20:4(ciclo)) FA(20:5) FA(33:0(Ep2)) FA(33:0(Ke2)) FA(33:0(Ke,Ep)) FA(33:0(OH,Ep,ciclo)) FA(33:0(OH,Ke,ciclo)) FA(33:1(OH2,ciclo)) FA(33:1(OH,Ep)) FA(33:1(OH,Ke)) FA(33:2(OH2)) FA(33:0(OH2,ciclo)) FA(33:0(OH,Ep)) FA(33:0(OH,Ke)) FA(33:1(OH2)) FA(34:0(Ep2)) FA(34:0(Ke2)) FA(34:0(Ke,Ep)) FA(34:0(OH,Ep,ciclo)) FA(34:0(OH,Ke,ciclo)) FA(34:1(OH2,ciclo)) FA(34:1(OH,Ep)) FA(34:1(OH,Ke)) FA(34:2(OH2)) FA(34:0(OH2,ciclo)) FA(34:0(OH,Ep)) FA(34:0(OH,Ke)) FA(34:1(OH2))
521,4589	
523,4733	
535,4730	
537,4887	
559,4729	FA(36:3)
583,4730	FA(37:6)
589,5206	WE(37:6)
627,4758	WE(37:3) DG(20:2(11Z,14Z)/14:0/0:0) DG(17:1(9Z)/17:1(9Z)/0:0) DG(18:1(11Z)/16:0/0:0) DG(18:0/16:1(9Z)/0:0) DG(20:0/14:1(9Z)/0:0) DG(20:1(11Z)/14:0/0:0)
629,4918	
722,5129	PE(O-36:5) PE(P-36:4)
737,5366	PG(O-33:0(OH))

Cont/ Tabela 14

Massa Experimental	Metabólito proposto
742,5386	PE(36:2) PE(O-36:3(OH)) PE(P-36:2(OH))
744,5538	PE(36:1) PE(O-36:2(OH)) PE(P-36:1(OH))
748,5270	PE(O-38:6) PE(P-38:5)
750,5439	PE(O-38:5) PE(P-38:4)
766,5391	PE(38:4) PE(O-38:5(OH)) PE(P-38:4(OH))
786,5287	PS(36:2) PS(O-36:3(OH)) PS(P-36:2(OH))
788,5442	PS(36:1) PS(O-36:2(OH)) PS(P-36:1(OH))
794,5450	SHexCer(d35:0) PI(38:4)
885,5501	PI(O-38:5(OH)) PI(P-38:4(OH)) DGDG(32:3)

A Tabela 15 apresenta alguns dos metabólitos detectados neste estudo pela ionização positiva por DESI-MS, juntamente com sua respectiva fórmula molecular, massa exata teórica, massa exata experimental e o erro em ppm. A identificação seguiu o mesmo método apresentado para a ionização negativa. A Tabela 16 apresenta a identificação desses íons, feita através dos bancos de dados *Metlin*, *LipidMaps* e *Metabolomics Workbench*.

Tabela 15 - Íons detectados nesse estudo com sua massa experimental e teórica, fórmula molecular e erro em ppm (ionização pelo modo positivo por DESI-MS).

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
162,0501	[M+2Na-H] ⁺	C ₅ H ₁₁ NO ₂	162,0501	-0,275
175,1115	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	175,1117	-1,380
227,2004	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	227,2005	-0,557
230,2473	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₃₁ NO	230,2478	-2,263
289,1773	[M+Na] ⁺	C ₁₆ H ₂₆ O ₃	289,1774	-0,504
313,2135	[M+2H] ²⁺	C ₃₅ H ₆₁ O ₇ P	626,4305	-4,795
370,2018	[M+Na] ⁺	C ₁₇ H ₃₃ NO ₄ S	370,2022	-1,217
			M ⁺ 742,4367	
371,2190	[M+2Na] ²⁺	C ₃₅ H ₆₉ O ₁₁ P	M ²⁺ 371,2181	2,678
391,2084	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₈ H ₂₃ N ₅ O ₄	391,2088	-1,099
395,2149	[M+2Na-H] ⁺	C ₂₁ H ₃₄ O ₄	395,21632	-4,998
413,2258	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₁₆ H ₃₀ N ₈ O ₆	413,2249	0,623
423,1989	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₁₈ H ₂₈ N ₆ O ₇	423,19865	0,569
426,2172	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₁₉ H ₃₃ N ₅ O ₅ S	426,2164	0,583
426,3579	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₄₇ NO ₄	426,3572	0,269
429,2968	[M+Na] ⁺	C ₂₅ H ₄₂ O ₄	429,2969	-1,703
430,2068	[M+Na] ⁺	C ₁₉ H ₂₉ N ₅ O ₅	430,2055	1,650
431,3486	[M+NH ₄] ⁺	C ₂₃ H ₄₃ NO ₅	431,3474	1,509
433,2833	[M+Na] ⁺	C ₁₉ H ₄₃ N ₂ O ₅ P	433,2820	1,253
435,2354	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₆	435,2344	0,817
437,3243	[M+H-2H ₂ O] ⁺	C ₂₂ H ₄₄ N ₆ O ₅	437,3229	1,908
445,2918	[M+2Na-H] ⁺	C ₂₃ H ₄₄ O ₅	445,2900	3,952
450,3577	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₇ NO ₄	450,3577	-0,190
453,2088	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₉ H ₂₅ N ₅ O ₇	453,2092	-0,935

Cont/ Tabela 15

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
			M+	
455,2762	[M+2Na] ²⁺	C ₄₅ H ₈₅ O ₁₃ P	455,2756	1,294
			M2+	
			910,5512	
457,3289	[M+Na] ⁺	C ₂₇ H ₄₆ O ₄	457,3288	0,151
471,2876	[M+K] ⁺	C ₂₇ H ₄₄ O ₄	471,2865	1,022
485,2677	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₄₁ O ₇ P	485,2657	2,954
485,3244	[M+H-2H ₂ O] ⁺	C ₂₆ H ₄₄ N ₆ O ₅	485,3229	1,925
490,2901	[M+Na] ⁺	C ₂₂ H ₄₆ NO ₇ P	490,2898	-0,633
503,1929	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₁₉ H ₃₂ N ₆ O ₉ S	503,1913	2,069
503,3336	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₂₆ H ₄₄ N ₆ O ₅	503,3334	-0,855
518,3220	[M+Na] ⁺	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	518,3217	0,559
519,2921	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₃₈ N ₆ O ₆	519,2925	-0,885
533,2802	[M+Na] ⁺	C ₂₂ H ₃₈ N ₈ O ₆	533,2801	-0,848
541,2613	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₃₆ N ₆ O ₉	541,26165	-0,652
561,3387	[M+NH ₄] ⁺	C ₂₄ H ₄₉ NO ₁₀ S	561,3409	-4,922
562,3254	[M+K] ⁺	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	562,3263	-2,664
567,3279	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₂₇ H ₅₃ O ₁₁ P	567,32871	-2,345
615,4942	[M+Na] ⁺	C ₃₇ H ₆₈ O ₅	615,4953	-2,821
621,3959	[M+2Na-H] ⁺	C ₃₀ H ₆₁ N ₂ O ₆ P	621,3978	-3,202
639,4944	[M+2Na-H] ⁺	C ₃₇ H ₇₀ O ₅	639,4934	1,500
643,5270	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄₁ H ₇₂ O ₆	643,5296	-4,012
644,5271	[M+NH ₄] ⁺	C ₄₀ H ₆₆ O ₅	644,5248	3,552
647,5570	[M+Na] ⁺	C ₃₉ H ₇₆ O ₅	647,5584	-2,249
656,3483	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₄₅ N ₁₁ O ₉	656,3474	1,313

Cont/ Tabela 15

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
687,5521	[M+NH ₄] ⁺	C ₃₈ H ₇₁ NO ₈	687,5517	0,446
691,4172	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₃₅ H ₆₅ O ₁₂ P	691,4180	-1,223
692,4201	[M+Na] ⁺	C ₃₂ H ₆₃ NO ₁₃	692,4191	1,384
705,4328	[M+H] ⁺	C ₃₆ H ₆₅ O ₁₁ P	705,4337	-1,227
707,3898	[M+K] ⁺	C ₃₃ H ₆₅ O ₁₁ P	707,3896	0,399
708,3605	[M+K] ⁺	C ₃₅ H ₆₀ NO ₉ P	708,3637	-4,443
709,4665	[M+H] ⁺	C ₃₆ H ₆₉ O ₁₁ P	709,4650	2,191
719,4478	[M+Na] ⁺	C ₃₅ H ₆₉ O ₁₁ P	719,4469	1,139
722,3875	[M+K] ⁺	C ₃₃ H ₆₅ NO ₁₁ S	722,3909	-4,818
725,5210	[M+Na] ⁺	C ₃₈ H ₇₅ N ₂ O ₇ P	725,5204	0,882
726,5270	[M+K] ⁺	C ₃₉ H ₇₇ NO ₈	726,5280	-1,482
729,5228	[M+K] ⁺	C ₃₉ H ₇₉ O ₇	729,5189	4,524
756,5501	[M+Na] ⁺	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	756,5513	-1,607
767,5789	[M+H] ⁺	C ₄₁ H ₈₃ O ₁₀ P	767,5796	-0,927
780,5282	[M+H] ⁺	C ₄₀ H ₇₇ NO ₁₁ S	780,5290	-1,037
780,5500	[M+Na] ⁺	C ₄₂ H ₈₀ NO ₈ P	780,5513	-1,750
781,5951	[M+H] ⁺	C ₄₂ H ₈₅ O ₁₀ P	781,5953	-0,207
782,5653	[M+Na] ⁺	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	782,5670	-2,193
783,5747	[M+K] ⁺	C ₄₂ H ₈₅ N ₂ O ₆ P	783,5776	-3,731
789,5874	[M+H] ⁺	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₀	789,5875	-0,102
793,5945	[M+H] ⁺	C ₄₃ H ₈₅ O ₁₀ P	793,5953	-0,985
803,5414	[M+Na] ⁺	C ₄₁ H ₈₁ O ₁₁ P	803,5408	0,569
806,5533	[M+H] ⁺	C ₄₂ H ₈₀ NO ₁₁ P	806,5541	-0,973
806,5666	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₂ H ₈₄ NO ₈ P	806,5694	2,656
807,5578	[M+NH ₄] ⁺	C ₄₁ H ₇₅ NO ₁₃	807,5576	,0202

Cont/ Tabela 15

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
808,5826	[M+Na] ⁺	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	808,5826	-0,082
809,5727	[M+H] ⁺	C ₄₆ H ₈₁ O ₉ P	809,5690	4,451
810,5945	[M+Na] ⁺	C ₄₄ H ₈₆ NO ₈ P	810,5983	-4,708
812,6464	[M+Na] ⁺	C ₄₅ H ₉₂ NO ₇ P	812,6503	-4,875
816,5872	[M+K] ⁺	C ₄₃ H ₈₈ NO ₈ P	816,5879	-0,861
817,5796	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₃ H ₈₅ N ₂ O ₇ P	817,5806	-1,132
818,4256	[M+NH ₄] ⁺	C ₃₆ H ₆₆ O ₁₅ P ₂	818,4215	5,059
819,5165	[M+H] ⁺	C ₄₆ H ₇₅ O ₁₀ P	819,5170	-0,673
819,5996	[M+H] ⁺	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₀	819,5980	1,934
820,5163	[M+H] ⁺	C ₄₅ H ₇₄ NO ₁₀ P	820,5123	4,899
821,5176	[M+Na] ⁺	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₀	821,5174	0,268
821,6601	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₉ H ₉₂ O ₆	821,6605	-0,482
825,5644	[M+H] ⁺	C ₄₆ H ₈₁ O ₁₀ P	825,5640	0,483
827,5532	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₅ H ₈₃ O ₈ P	827,5537	-0,522
828,5346	[M+Na] ⁺	C ₄₂ H ₈₀ NO ₁₁ P	828,5361	-1,810
832,5733	[M+H] ⁺	C ₄₄ H ₈₂ NO ₁₁ P	832,5698	4,282
833,5520	[M+Na] ⁺	C ₄₂ H ₈₃ O ₁₂ P	833,5514	0,713
841,6657	[M+Na] ⁺	C ₄₇ H ₉₅ O ₈ P	841,6656	0,110
907,4810	[M+K] ⁺	C ₄₆ H ₇₆ O ₁₅	907,4815	-0,595
965,7032	[M+H] ⁺	C ₅₂ H ₁₀₁ O ₁₃ P	965,7052	-2,046

Tabela 16 - Metabólitos identificados através dos bancos de dados *Metlin*, *LipidMaps* e *Metabolomics Workbench* (ionização pelo modo positivo por DESI-MS).

Massa Experimental	Metabólito
162,0501	Valina
175,1115	WE(12:3)
227,2004	WE(14:1)
230,2473	Sph(m14:0)
289,1773	Tetranor 12-HETE
313,2135	LPA(32:5)
370,2018	NAT(15:1)
371,2190	PG(29:0(OH))
391,2084	Peptídeo
395,2149	MG(18:4)
413,2258	Peptídeo
423,1989	Peptídeo
426,3579	CAR(18:1)
429,2007	Peptídeo
429,2968	MG(22:4)
430,2068	Peptídeo
431,3486	CAR(16:1(OH))
433,2833	LisoSM(d14:0)
435,2354	Peptídeo
437,3243	Peptídeo
445,2918	DG(20:0)
450,3577	CAR(20:3)
453,2088	Peptídeo
455,2762	PI(36:1) PI(O-36:2(OH)) PI(P-36:1(OH)) MGDG(43:10)
457,3289	MG(24:4)
471,2876	MG(24:5)
485,2677	LPA(22:5)
485,3244	Peptídeo

Cont/ Tabela 16

Massa Experimental	Metabólito
	LPC(14:0)
490,2901	LPE(17:0)
	PC(O-14:0)
503,1929	Peptídeo
503,3336	Peptídeo
	LPC(16:0)
518,3220	LPE(19:0)
	PC(O-16:0)
519,2921	Peptídeo
533,2802	Peptídeo
541,2613	L-Lisil-L-seril-L-serilglicil-L-tirosine
561,3387	SHexSph(d18:0)
	CerP(t26:0)
	LPC(18:0)
562,3254	LPE(21:0)
	PC(O-18:0)
	NAT(28:4)
567,3279	LPI(P-18:0)
615,4942	DG(34:2)
621,3959	PE-Cer(d28:1)
639,4944	DG(34:1)
643,5270	TG(38:3)
644,5271	DG(37:6)
647,5570	DG(36:0)
	TG(O-36:0)
656,3483	Glicilglicilglicil-L-prolil-N-metilglicilglicilglicilglicil- L-lisinamida
687,5521	HexCer(d32:2)

Cont/ Tabela 16

Massa Experimental	Metabólito
691,4172	LPI(26:2)
692,4201	LacSph(t20:0)
705,4328	PG(30:3(OH))
707,3898	PG(27:0(OH))
708,3605	PE(30:5(OH))
709,4665	PG(30:1(OH))
719,4478	PG(29:0(OH))
722,3875	SHexCer(d27:0)
725,5210	PE-Cer(t36:2)
726,5270	HexCer(d33:0)
729,5228	PA(O-36:0)
756,5501	PC(32:0)
	PC(O-32:1(OH))
	PC(P-32:0(OH))
	PE(35:0)
	PE(O-35:1(OH))
	PE(P-35:0(OH))
767,5789	PG(O-35:0(OH))
780,5282	SHexCer(d34:1)
780,5500	PC(34:2)
	PC(O-34:3(OH))
	PC(P-34:2(OH))
	PE(37:2)
	PE(P-37:2(OH))
781,5951	PG(O-36:0(OH))
781,6729	TG(48:4)
782,5653	PC(34:1)
	PC(O-34:2(OH))
	PC(P-34:1(OH))
	PE(37:1)
	PE(O-37:2(OH))
	PE(P-37:1(OH))
783,5747	PE-Cer(d40:1)
	SM(d37:1)
789,5874	MGDG(38:4)

Cont/ Tabela 16

Massa Experimental	Metabólito
793,5945	PG(37:0)
803,5414	PG(35:0(OH))
806,5533	PI-Cer(d36:2)
	PS(36:1(OH))
	SHexCer(d36:2)
	LacCer(d30:1)
806,5666	PC(34:0)
	PC(O-34:1(OH))
	PC(P-34:0(OH))
	PE(37:0)
	PE(O-37:1(OH))
	PE(P-37:0(OH))
807,5578	LacCer(d29:2)
	PC(36:2)
	PC(O-36:3(OH))
808,5826	PC(P-36:2(OH))
	PE(39:2)
	PA(43:5(OH))
809,5727	PG(O-40:6)
	PG(P-40:5)
	PC(36:1)
	PC(O-36:2(OH))
810,5945	PC(P-36:1(OH))
	PE(39:1)
	PC(O-37:0)
812,6464	PE(O-40:0)
816,5872	PC(O-35:0(OH))
	PE(O-38:0(OH))
817,5796	SM(t38:2)
818,4256	LPI(27:3)
819,5165	PG(40:8)
819,5996	MGDG(39:5)
820,5163	PS(39:7)
821,5176	MGDG(38:8)
821,6601	TG(46:1)

Cont/ Tabela 16

Massa Experimental	Metabólito
	PG(40:5)
825,5644	PG(O-40:6(OH)) PG(P-40:5(OH))
	PA(42:3)
827,5532	PA(O-42:4(OH)) PA(P-42:3(OH))
828,5346	PI-Cer(d36:2) PS(36:1(OH))
	PI-Cer(d38:3)
832,5733	PS(38:2(OH)) LacCer(d32:2)
	LPI(33:0)
833,5520	PI(O-33:0)
841,6657	PA(O-44:0(OH))
907,4810	DGDG(31:5)
	PI(43:0)
965,7032	PI(O-43:1(OH)) PI(P-43:0(OH))

Os íons das Tabelas 13 a 16 representam os íons que diferenciaram os tumores através da análise estatística. A identificação desses íons é uma sugestão, visto que a identificação final deve ser feita através de outros métodos analíticos como a espectrometria em Tandem (MS/MS) em que o íon é fragmentado e, através dos fragmentos gerados e suas respectivas massas/carga, é possível identificar o metabólito original.

5 DISCUSSÃO

5.1 DESI-MSI E OS EXAMES ANATOMOPATOLÓGICOS

Este estudo é inédito, não há na literatura outro estudo que tenha utilizado DESI-MSI para analisar os tumores bifásicos da mama do ponto de vista lipidômico e metabolômico. DESI-MSI foi escolhido por ser um método relativamente barato, que não demanda árduo preparo de amostra, além de ser realizado em condições ambientes de pressão e temperatura, o que facilita o manuseio e a execução. Este método também é importante por permitir uma interface entre a química analítica e o exame anatomopatológico, visto que se pode verificar a presença de íons correspondentes a metabólitos diretamente numa lâmina em um corte histológico de tecido congelado que, posteriormente, pode ser corado com *H&E*.

O DESI-MSI não apenas diferencia tumores histologicamente distintos ou de diferentes origens embriológicas, mas também diferencia, a nível lipidômico e metabolômico, tumores com a mesma origem histológica ou histologicamente similares, o que concede a essa técnica um mérito inegável (CALLIGARIS et al. 2013).

Apesar do exame anatomopatológico ainda ser o exame padrão-ouro para o diagnóstico dos TPs, a técnica DESI-MSI poderá auxiliar no diagnóstico diferencial quando o diagnóstico anatomopatológico for duvidoso. Essa técnica pode ser realizada em *core biopsies* ou mesmo em exames

citopatológicos, que são menos invasivos, beneficiando o paciente por receber um diagnóstico assertivo em um exame pouco invasivo.

O DESI-MSI não é utilizado em tecidos parafinados devido ao processamento para fixação em parafina eliminar os lipídios da amostra. A técnica DESI-MSI pode ser realizada em tecidos frescos ou congelados, porém neste estudo foram utilizados tecidos congelados provenientes dos Biobancos a despeito dos tecidos frescos, devido ao TP ser raro e também por motivo geográfico, pois o experimento foi conduzido em Campinas-SP.

O uso dessa técnica em tecidos frescos pode ser útil em exames intraoperatórios; visto que, comparando com exames de congelação, há vantagens devido à rapidez e a precisão analítica do método (EBERLIN et al. 2013; SANTAGATA et al. 2014). Um procedimento semelhante que já foi testado em exames intraoperatórios com sucesso é a técnica por ionização ambiente denominada *MasSpec Pen*, nesta um objeto com forma e tamanho de uma caneta comum está conectado a um espectrômetro de massas que foi capaz de definir, em estudos, se o tecido em que ela está em contato é maligno ou benigno (SANS et al. 2018).

DESI-MSI é usado para análise direta e caracterização de muitas classes de lipídios como ácidos graxos (AG), glicerofosfolipídios (GP), glicerolipídios (GL), esfingolipídios (SP) e esterol-lipídios (ST) (EBERLIN et al. 2011, 2012). Na ionização negativa por DESI-MS são encontrados, na faixa de m/z de 100-400 os ácidos graxos; do m/z 500-700 os dímeros de ácidos graxos, diacilgliceróis e lisofosfolipídios e do m/z 700-1000 os glicerofosfolipídios e esfingolipídios (GIROD et al. 2010; EBERLIN et al. 2011,

2016). Os íons detectados podem estar na forma desprotonada $[M-H]^-$ ou na forma de adutos de cloreto $[M+Cl]^-$, formiato $[M+HCOO]^-$ ou acetato $[M+CH_3COO]^-$.

No modo positivo, na faixa de m/z de 350-650 são encontrados colesterol, ceramidas, lisofosfatidilcolinas (LPC) e Cer / Sph-1-fosfato (CerP / S1P) e, na faixa de m/z 675-975 são encontrados esfingomiéline (SM), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC) e lactoceramida (LacCer) (EBERLIN et al. 2011).

5.2 LIPÍDIOS, METABÓLITOS E CÂNCER

Os lipídios correspondem a um grupo de variadas moléculas, cada uma desempenhando funções diferentes no organismo, muitas dessas moléculas participam do metabolismo celular (PULFER e MURPHY 2003).

A membrana celular não é uma estrutura estática, mas sim dinâmica, em que os lipídios lá inseridos têm, cada um, seu papel no desempenho das funções celulares. A membrana celular tem dupla camada e uma distribuição lipídica heterogênea, tanto vertical, quanto horizontalmente. Na face externa da dupla camada são encontrados PS, SM e glicosfingolipídios. Na face interna, ou citoplasmática, são encontrados PS, PE, PI, aminofosfolipídios e ácido fosfatídico (YAMAJI-HASEGAWA e TSUJIMOTO 2006). A presença, na face externa, de lipídios geralmente situados na face interna da membrana plasmática, como os PS, pode promover a apoptose devido à ligação dos PS aos receptores de PS nos macrófagos (YAMAJI-HASEGAWA e TSUJIMOTO

2006).

A biossíntese de lipídios ocorre normalmente nos adipócitos, hepatócitos e ductos lactíferos da mama, porém, em tecidos malignos há a biossíntese aberrante de lipídios como os ácidos graxos e o colesterol (MEDES et al. 1953; BAENKE et al. 2013). A síntese e metabolismo de lipídios tem importância na tumorigênese, pois os lipídios estão envolvidos com a migração e invasão celular e também com a angiogênese tumoral (BAENKE et al. 2013), também participam ativamente em processos de sinalização celular (FADOK et al. 2001), transformação celular e desenvolvimento tumoral (BAENKE et al. 2013). MEDES et al. (1953) demonstrou, através do estudo de células tumorais *in vitro*, que a biossíntese de lipídios nos tecidos tumorais ocorre numa taxa semelhante à biossíntese de lipídios no fígado e que, além da biossíntese de lipídios, as células tumorais consomem lipídios disponíveis no microambiente tumoral. Há, portanto, uma desregulação no metabolismo lipídico nos tecidos malignos. Acredita-se que ocorra, nas células do tecido tumoral maligno, a lipogênese *de novo* em que determinados lipídios são produzidos anormalmente, portanto se encontrariam valores de *m/z* incomuns, isso está relacionado com perda da diferenciação e aumento da proliferação celular (GUENTHER et al. 2015). Esses valores incomuns de *m/z* podem corresponder aos valores de *m/z* nesse estudo que não foram identificados na literatura, nem em bancos de busca de metabólitos.

É conhecido que a composição lipídica dos tecidos malignos é diferente da composição lipídica dos tecidos normais (PUNNONEN et al. 1989) e que nos tecidos malignos da mama há aumento na concentração dos ácidos

graxos poli-insaturados (PUFAs), especialmente o ácido araquidônico (HIETANEN et al. 1986; ABBADIA et al. 1997) e que há redução dos ácidos graxos saturados em tecidos malignos da mama comparados a tecidos normais (HIETANEN et al. 1986). Neste estudo, foi observado o aumento dos PUFAs nos tecidos tumorais estudados, estes estão em maior intensidade nos SARC e TPMs e em menor intensidade nos TPBs e FAs, e ausente no tecido normal. A grande vantagem em relação aos estudos acima relatados é que, através do DESI-MSI, pode-se correlacionar o aumento da intensidade dessas moléculas bidimensionalmente com o corte histológico e, posteriormente, a detecção dos PUFAs em um tecido analisado poderá ser um biomarcador que diferencie tecido maligno de tecido normal na rotina diagnóstica.

Neste estudo, o PUFA que foi encontrado em maior intensidade nos tecidos malignos foi o ácido araquidônico m/z 303,2330; geralmente achado esterificado em um fosfolípido. Os fosfolípidos contendo PUFAs tornam a membrana mais flexível, o que reduz de forma importante a energia necessária para o movimento da célula, deformação e endocitose (RAWICZ et al. 2000; PINOT et al. 2014). A célula tumoral necessita adquirir mecanismos que facilitem a sua existência, multiplicação e migração. A diminuição no gasto energético é um desses mecanismos. Por essa razão as amostras dos tecidos tumorais nesse estudo e em outros estudos, como de AHN et al. (2001), apresentaram maior intensidade relativa de ácidos graxos poli-insaturados como ácido araquidônico e ácido adrênico, comparado ao tecido histologicamente normal.

Os lipídios são facilmente ionizados e medidos por DESI-MS (EBERLIN et al. 2011). A análise direta dos tecidos na ionização negativa detecta lipídios como $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$ e $[M+HCO_2]^-$. Na ionização positiva lipídios como $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$ (ELLIS et al. 2013). Além dos lipídios, também foi encontrado nos tecidos estudados, através do DESI-MS, outros metabólitos e peptídeos.

5.2.1 Ácido araquidônico e ácido adrênico

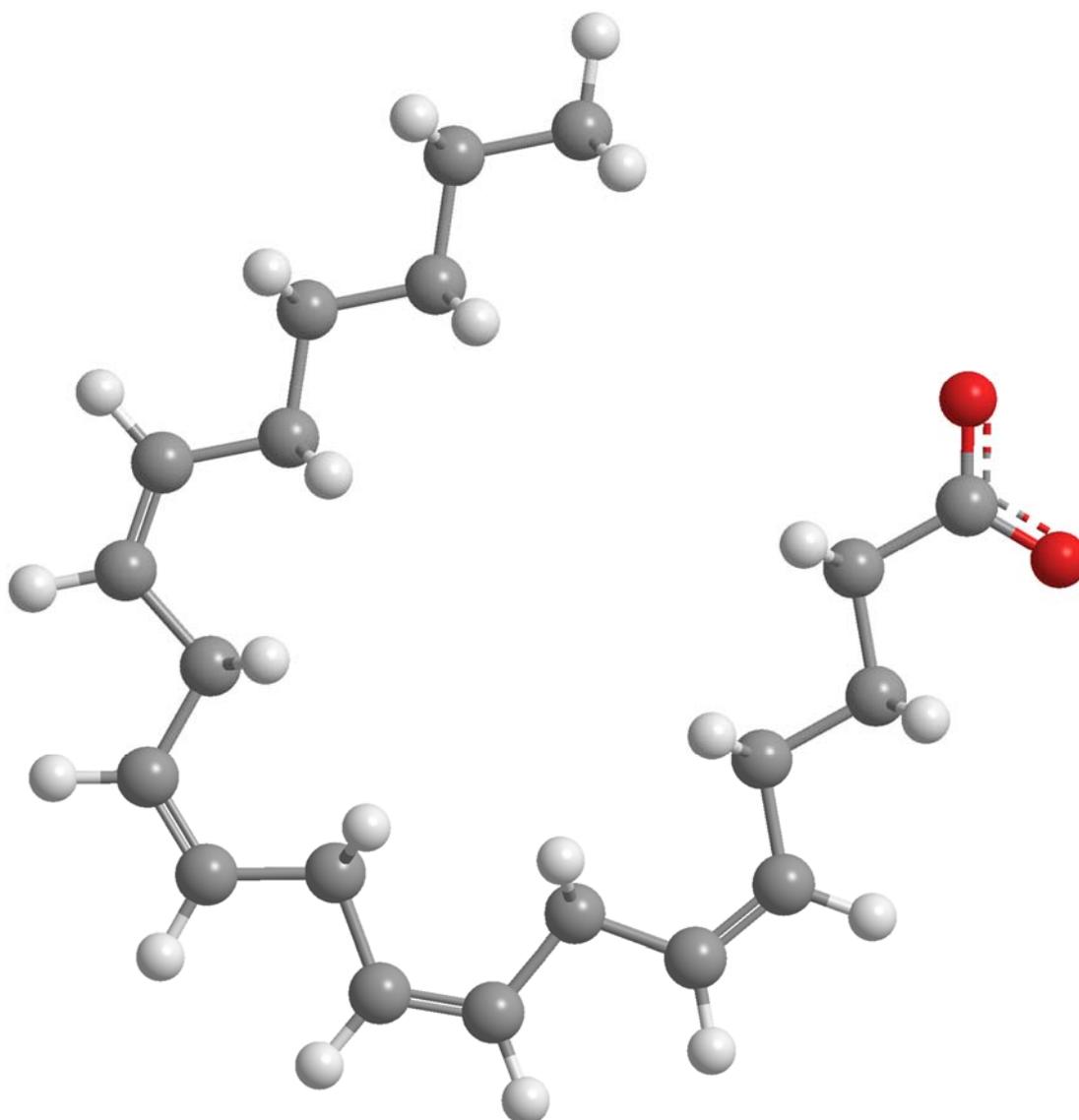
O ácido araquidônico é um PUFA. NAVARRO-TITO et al. (2008) mostrou que, ele e seus metabólitos, podem estar envolvidos na migração e invasão de células tumorais e ativação da enzima FAK (*Focal Adhesion Kinase*) no microambiente tumoral em cultura celular. Essa enzima quinase está envolvida na adesão, migração, sobrevivência e proliferação celular (MITRA et al. 2005).

O ácido araquidônico m/z 303,2330 (Figura 77) foi detectado em experimentos de DESI-MSI onde foi observado que ele se apresentava em maior intensidade relativa no tecido tumoral comparado ao tecido normal por DESI-MSI (EBERLIN et al. 2016; TATA et al. 2016).

Nesse estudo, foi verificado que o íon correspondente ao ácido araquidônico se apresentou com maior intensidade relativa no SARC, TPM, TPBo e TPB comparados ao tecido histologicamente normal (N).

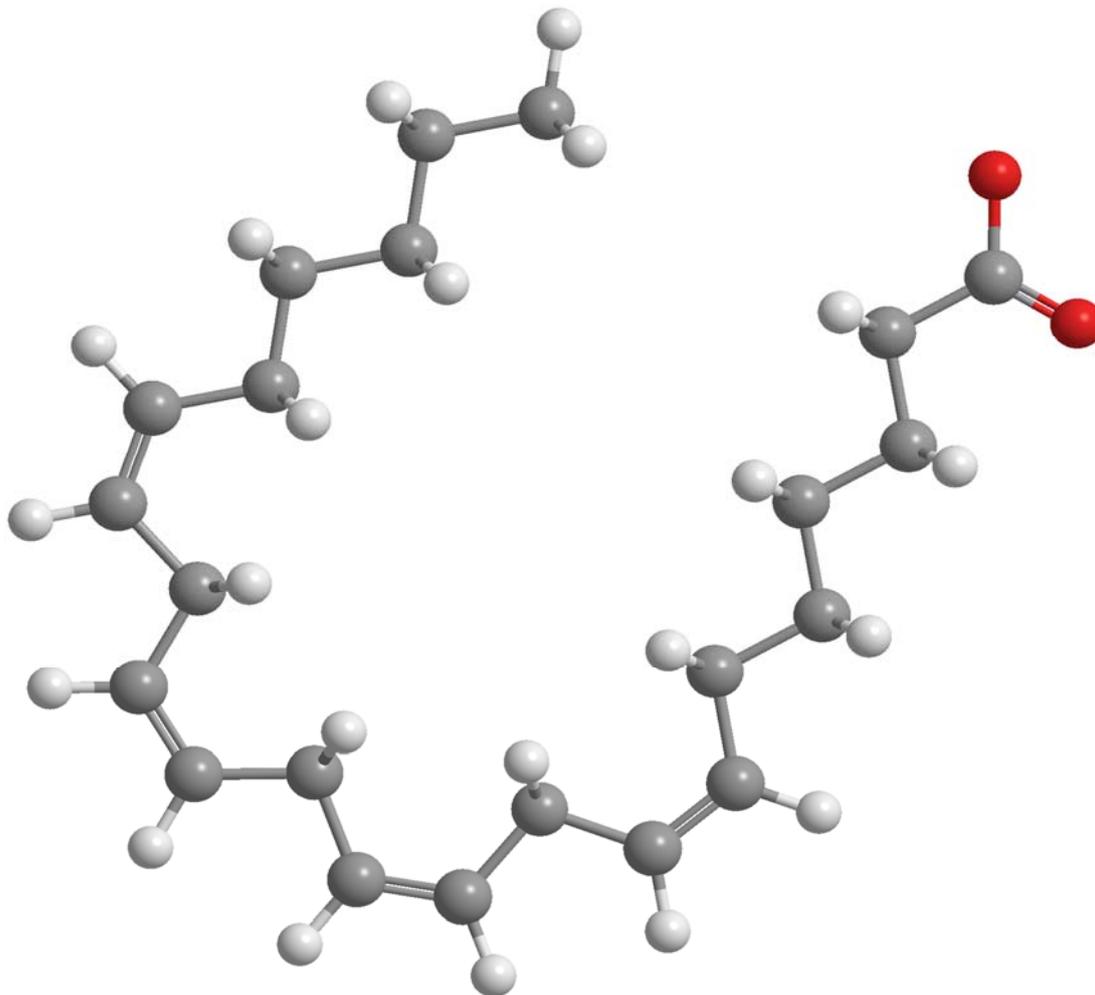
O ácido adrênico m/z 331,2643 (Figura 78) também é um PUFA e faz parte da família dos ômega-6, tal qual o ácido araquidônico, é precursor dos eicosanóides e participa de vias pró-inflamatórias. EBERLIN et al. (2016) e

TATA et al. (2016) observaram que ele se apresentou em maior intensidade nos tecidos tumorais comparados ao tecido histologicamente normal, neste trabalho também foi verificado essa diferença de intensidade nas amostras.



Fonte: ChemDraw 3D (2014)

Figura 77 - Estrutura molecular tridimensional do íon m/z 303,2330 (ácido araquidônico).



Fonte: ChemDraw 3D (2014)

Figura 78 - Estrutura molecular tridimensional do íon m/z 331,2643 (ácido adrênico).

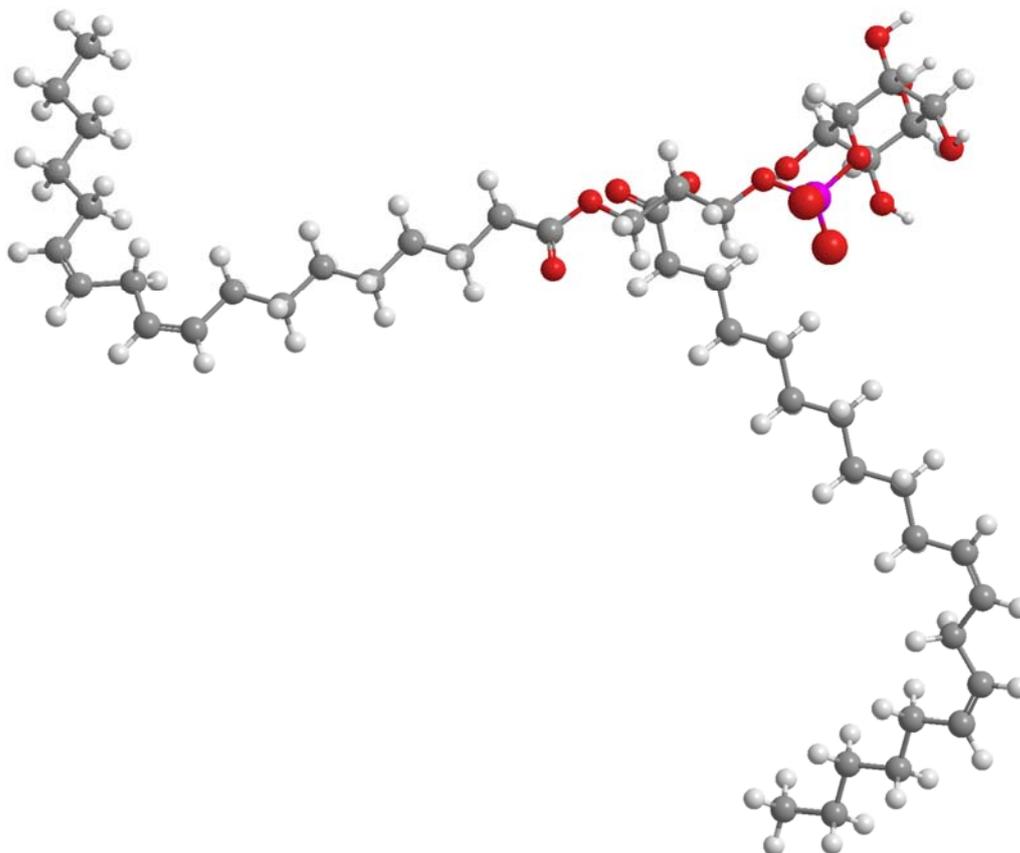
5.2.2 Fosfolipídios

Estudos usando espectrometria de massas mostraram aumento não só na intensidade de ácidos graxos, mas também de fosfolipídios em tecidos de câncer de mama comparando com tecido histologicamente normal (GUENTHER et al. 2015). Os fosfoglicerídeos são os principais fosfolipídios presentes nas membranas das células animais e, destes, os mais abundantes são a fosfatidilserina, a fosfatidiletanolamina, a fosfatidilcolina e o

esfingolipídeo.

Na ionização positiva foi encontrado o aumento estatisticamente significativo na intensidade das fosfatidilserinas (PS) no TPM comparado ao TPB e no grupo (TPM+TPBo) comparado ao grupo (TPB+FA). As PS são componentes das membranas celulares das células eucarióticas e a alteração na sua distribuição pode estar relacionada a malignidade, como mostrou UTSUGI et al. (1991) que as PS estavam 3 a 7 vezes mais expressas nas linhagens celulares malignas e que tiveram um papel no reconhecimento dessas células malignas por monócitos. A PS é um fosfolipídio bioativo, está envolvido com a apoptose, na síntese de lisofososerina e com a coagulação sanguínea (YAMAJI-HASEGAWA e TSUJIMOTO 2006). Neste estudo, as PS encontradas em maior intensidade no TPM em relação ao TPB foram m/z 820,5163; 828,5346 e 832,5733. No grupo (TPM+TPBo) comparado ao grupo (TPB+FA) foi encontrado em maior intensidade as PS m/z 820,5163 e 828,5346.

Na ionização positiva encontramos íons que podem corresponder ao fosfatidilinositol (PI) com maior intensidade no TPM comparado ao TPB (m/z 806,5533; 832,5733; 833,5520 e 828,5346) e no grupo (TPM+TPBo) comparado ao grupo (TPB+FA) (m/z 455,2762 e 828,5346). Na ionização negativa encontramos o PI m/z 855,5501 (Figura 79) em maior intensidade no TPM comparado ao TPBo. GOTO et al. (2014) mostrou através de estudos de espectrometria de massas que o íon m/z 885,5501 pode ser um biomarcador para câncer de próstata.



Fonte: ChemDraw 3D (2014)

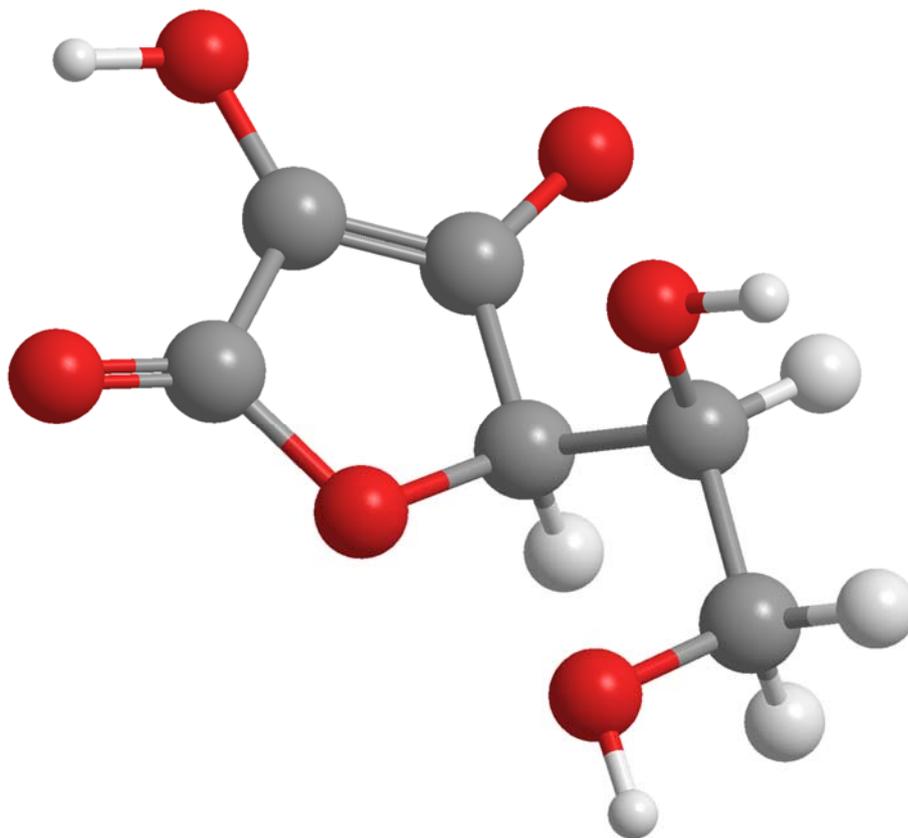
Figura 79 - Estrutura molecular tridimensional do íon m/z 885,5501 (PI)

5.2.3 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico também denominado vitamina C tem como função mais popularmente conhecida o seu efeito antioxidante, mas tem outras variadas atribuições sobretudo na bioquímica celular, como acelerar reações de hidroxilação em várias vias de biossíntese, participar como cofator de enzimas que atuam na biossíntese do colágeno, participar na síntese de carnitina a partir da lisina, participar na síntese de neurotransmissores, regular a atividade do citocromo P450 e participar do metabolismo do colesterol. (GONZÁLEZ et al. 2005). O ácido ascórbico também tem um efeito antineoplásico ao inibir o crescimento tumoral, promovendo o metabolismo

oxidativo por inibir o uso do piruvato na glicólise anaeróbica (GONZÁLEZ et al. 2005).

MASTERSON et al. (2011) conseguiu diferenciar seminoma de tecido testicular normal baseando-se na distribuição e variação na intensidade de várias espécies lipídicas e metabólitos tal qual o ácido ascórbico m/z 175,0240 que estava presente em maior intensidade nos tecidos tumorais comparados aos normais. Provavelmente devido às células tumorais apresentarem uma demanda metabólica aumentada de glicose (MIRVISH 1994). Esse aumento da captação da glicose pela célula tumoral e seu uso na glicólise aeróbia é chamado de efeito *Warburg* (BAENKE et al. 2013); ocorreria, portanto, um aumento dos transportadores de glicose (GLUTS) e, como a molécula do ácido ascórbico e sua forma oxidada (ácido diidroascórbico) tem estrutura molecular semelhante à molécula da glicose, devido a presença dos grupos hidroxila dispostos próximos um ao outro, o ácido ascórbico seria carregado por esses transportadores para dentro da célula tumoral (GONZÁLEZ et al. 2005). Na (Figura 80) observa-se a estrutura química do ácido ascórbico.



Fonte: ChemDraw 3D 2014

Figura 80 - Estrutura molecular tridimensional do íon m/z 175,0240 (ácido ascórbico).

Foi verificado, neste trabalho, a diferença na intensidade relativa desse íon entre os tecidos estudados. Comparando espectros e imagens químicas na mesma escala, observamos que o íon m/z 175,0240 teve maior intensidade relativa no SARC, TPM e TPBo, comparando com TPB, FA e tecido histologicamente normal.

5.2.4 Ceramidas

Na ionização positiva foram encontradas algumas ceramidas em maior intensidade nos tecidos benignos, comparados aos malignos, por exemplo, a

ceramida m/z 621,3959 apresentou maior intensidade no TPB que no TPM e m/z 722,3875 maior intensidade no grupo (TPB+FA) comparado ao grupo (TPBo+TPM). As ceramidas e esfingosinas estão envolvidas na apoptose e inibição do crescimento das células malignas; sua produção pode ser inibida nas células tumorais devido às enzimas relacionadas ao seu metabolismo estarem desreguladas no câncer (BAENKE et al. 2013), provavelmente por essa razão as ceramidas supracitadas apresentaram maior intensidade estatisticamente significativa no FA e TPB comparados ao TPBo e TPM.

5.2.5 Colesterol

A maior parte dos lipídios ionizam no modo negativo, visto que a maioria possui um grupamento carboxila numa extremidade, o que facilita sua ionização. Alguns lipídios ionizam no modo positivo, como o colesterol, ceramidas e lactoceramidas. O colesterol modula a fluidez da membrana celular (BAENKE et al. 2013), e sabe-se que no câncer, como no câncer de próstata, a sua biossíntese está aumentada (HAGER et al. 2006). Neste estudo, porém, não foram encontrados íons correspondentes ao colesterol, provavelmente devido ao fato de algumas moléculas, como o colesterol, não serem facilmente ionizadas pelo DESI-MSI (EBERLIN et al. 2011).

Para que se consiga detectar colesterol e outras moléculas difíceis de ionizar pode-se utilizar solventes específicos no spray do DESI a fim de que ocorra uma reação química que facilite essa ionização (HUANG et al. 2007; WU et al. 2013), também se pode adicionar a esse solvente compostos ou grupos funcionais visando a reação deles com uma determinada substância

que se deseja investigar, dessa forma é possível observar o aumento na quantidade e intensidade dos íons de determinados grupos no espectro de massas, como os fosfolipídios e o colesterol. Por exemplo, a adição do solvente DMF:H₂O (1:1) ao spray do DESI, pode aumentar o sinal de pequenas massas comparado ao metanol:H₂O (1:1), que é o solvente que utilizamos e a adição da betaína-aldeído ao spray solvente em experimentos com DESI pode proporcionar a visualização de mais picos no espectro de massas que quando essa substância não é adicionada (EBERLIN et al. 2011).

5.2.6 Peptídeos

No modo positivo também foi encontrada maior intensidade estatisticamente significativa dos íons correspondentes a peptídeos no grupo (TPM+TPBo), comparado ao grupo (TPB+FA), o que pode ser explicado pela maior demanda proteica do TPM e TPBo comparado ao TPB e FA. No TPM comparado ao TPB encontramos maior intensidade dos íons m/z 453,2088 e 503,3336. No grupo (TPM+TPBo) comparado ao (TPB+FA) foi encontrado maior intensidade dos peptídeos m/z 391,2084; 423,1989; 429,2007; 430,2068; 435,2354; 437,2359; 453,2088; 485,3244; 503,1929; 503,3336 e 519,2921.

Além da clara importância dos peptídeos para construção das proteínas, o que explicaria o aumento estatisticamente significativo da intensidade desses íons correspondentes a peptídeos no grupo (TPM+TPBo); FERNANDEZ-DE-COSSIO-DIAZ e VAZQUEZ (2017) mostraram que os aminoácidos também podem ser convertidos em metabólitos intermediários

da glicólise aeróbia, como alanina, cisteína, glicina, treonina e serina que podem ser convertidos em piruvato. Isso ocorre devido ao aumento da demanda de átomos de carbono para biossíntese de metabólitos.

5.2.7 Painel de metabólitos para diferenciar os tumores bifásicos benignos e malignos

Através da análise estatística pode-se observar que determinadas classes de lipídios apresentaram maior intensidade relativa em diferentes tumores ou grupos de tumores. Nas Tabelas 17 a 19 são demonstrados íons que são capazes de diferenciar os tumores bifásicos benignos e malignos. Esses íons são correspondentes a ácidos graxos, diacilgliceróis, ceramidas, fosfolipídios, aminoácidos e peptídeos.

Tabela 17 - Íons que diferenciaram, na análise estatística, o TPM do TPBo através da análise pelo DESI no modo negativo

CLASSES DE LIPÍDIOS OU METABÓLITOS	TPBo > TPM	TPM > TPBo
Ácido Ascórbico	-	m/z 175,0240
Ácido 3-hidroxicáprico	m/z 187,1333	
Ácidos Graxos	m/z 187,0968; 301,2177; 521,4589; 523,4733; 535,4735; 537,4892 e 559,4729	-
Ácidos Graxos ou Ésteres de Cera	m/z 583,4730; 607,4730	m/z 283,2644
Ésteres de Cera	m/z 557,4568 e 589,5206	-
Diacilglicerol	-	m/z 627,4758 e 629,4918
Fosfatidiletanolaminas	-	m/z 722,5129; 742,5386; 744,5538; 748,5270; 748,5439; 750,5439 e 766,5391
Fosfatidilserinas	-	m/z 786,5287 e 788,5457
Fosfatidilglicerol	-	m/z 737,5366
Sulfatídeo	-	m/z 794,5450
Fosfatidilinositol	-	m/z 885,5501

Tabela 18 - Íons que diferenciaram, na análise estatística, o grupo (TPB+FA) do grupo (TPM + TPBo) através da análise pelo DESI no modo positivo

CLASSES DE LIPÍDIOS OU METABÓLITOS	(TPB + FA) >	(TPM + TPBo) >
Peptídeos	m/z 413,2258 e 533,2802	m/z 391,2084; 423,1989; 429,2968; 430,2068; 435,2354; 437,3243; 453,2088; 485,3244; 503,1929; 503,3336 e 519,2921
Glicil-lisinamida	m/z 656,3483	-
Lisofosfatidilinositóis	-	m/z 567,3279; 691,4172 e 818,4256

Cont/ Tabela 18

CLASSES DE LIPÍDIOS OU (TPB + FA) >		(TPM + TPBo) >
METABÓLITOS		
Hexosilceramidas	-	<i>m/z</i> 687,5521 e 726,5270
Lactosilceramida	-	<i>m/z</i> 692,4201
Ácidos fosfatídicos	-	<i>m/z</i> 719,4478; 729,5228; 827,5532 e 841,6657
Lactoceramidas	-	<i>m/z</i> 793,5454 e 807,5578
Esfingomielina	-	<i>m/z</i> 817,5796
Tri acil/alquil gliceróis	-	<i>m/z</i> 761,5666 e 821,5176
Monogalactosildiacylglicerol	-	<i>m/z</i> 907,4810
Fosfatidilserinas	<i>m/z</i> 832,5733	<i>m/z</i> 820,5163 e 828,5346
Fosfatidilglicerol	<i>m/z</i> 821,6601	<i>m/z</i> 371,2190; 705,4328; 707,3898; 767,5789; 781,5951; 803,5414; 819,5996 e 825,5644
Sulfatídeo	<i>m/z</i> 722,3875	<i>m/z</i> 561,3387
Fosfatidilinositol	<i>m/z</i> 965,7032	<i>m/z</i> 455,2762
Valina	-	<i>m/z</i> 162,0501
Esfingosina	-	<i>m/z</i> 230,2473
Ésteres de Cera	-	<i>m/z</i> 175,1115 e 227,2004
Diacilglicerol	-	<i>m/z</i> 445,2918; 615,4942; 639,4944 e 647,5570
Tetranor 12-HETE	-	<i>m/z</i> 289,1773
Ácidos Lisofosfatídicos	-	<i>m/z</i> 313,2135 e 485,2677
N-Acil-Taurina	-	<i>m/z</i> 370,2018
Carcinitinas Aciladas	-	<i>m/z</i> 426,2172 e 450,3577
Lisoesfingomielina	-	<i>m/z</i> 433,2833
Monoacylgliceróis	-	<i>m/z</i> 395,2149 e 471,2876
Fosfatidiletanolaminas	-	<i>m/z</i> 725,5210; 756,5501; 782,5653 e 783,5747
Fosfatidilcolina	-	<i>m/z</i> 490,2901; 518,3220 e 562,3254; 780,5282; 806,5666; 808,5826 e 810,5945
L-Lisil-L-seril-L-serilglicil-L-tirosine	-	<i>m/z</i> 541,2613

Tabela 19 - Íons que diferenciaram, na análise estatística, o TPB do TPM através da análise pelo DESI no modo positivo

CLASSES DE LIPÍDIOS OU METABÓLITOS	TPB > TPM	TPM > TPB
Peptídeos	-	<i>m/z</i> 453,2088; 485,2677; 503,1929 e 503,3336
Aminoácidos (Valina, Tirosina)		<i>m/z</i> 162,0501, <i>m/z</i> 541,2613
Lactosilceramida	<i>m/z</i> 692,4201	-
Ácidos fosfatídicos	-	<i>m/z</i> 827,5532 e 841,6657
Lactoceramidas	-	<i>m/z</i> 793,5454 e 807,5578
Esfingomielina	-	<i>m/z</i> 783,5747 e 817,5796
Di e Tri acil/alquil gliceróis	-	<i>m/z</i> 615,4942; 617,4595; 617,5108; 639,4944 e 644,5271 e <i>m/z</i> 643,5207; 781,5951 e 793,5945
Monogalactosildiacylglicerol	-	<i>m/z</i> 789,5874; 812,6464 e 821,5176
Fosfatidilserinas	-	<i>m/z</i> 820,5163; 828,5346 e 832,5733
Fosfatidilglicerol	<i>m/z</i> 709,4665 e 819,5165	<i>m/z</i> 767,5789; 809,5727 e 825,5644
Sulfatídeo	-	<i>m/z</i> 780,5282 e 806,5533
Fosfatidiletanolamina-ceramidas	<i>m/z</i> 621,3959	<i>m/z</i> 725,5210
Fosfatidilinositol	-	<i>m/z</i> 833,5520
Carcinitinas Aciladas	<i>m/z</i> 431,3486	<i>m/z</i> 426,3579 e 450,3577
Monoacylgliceróis	-	<i>m/z</i> 457,3289 e 471,2876
Fosfatidiletanolaminas	<i>m/z</i> 708,3605	<i>m/z</i> 756,5501; 782,5653 e 816,5872
Fosfatidilcolina	-	<i>m/z</i> 780,5500; 808,5826 e 810,5945

5.2.8 Considerações e perspectivas futuras

É esperada alguma variação sutil de amostra para amostra comparando o mesmo tipo tumoral, porém é encontrado um padrão geral na intensidade dos íons (MASTERSON et al. 2011), por isso, para a realização de comparações e conclusões assertivas acerca da diferença entre a concentração dos metabólitos nos tumores estudados, a análise estatística das intensidades médias relativas das regiões de interesse é mais apropriada que apenas a análise visual das imagens químicas ou a comparação entre os espectros, desprovidas da análise estatística.

Através da técnica DESI-MSI foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre diversos íons nos tecidos estudados. Observou-se que essas diferenças estão, em grande parte, associadas ao metabolismo diferenciado da célula tumoral, com maior demanda energética, metabólica e proteica; dessa forma, esse estudo reafirma que a lipidômica e metabolômica é capaz de diferenciar esses tumores e, além disso, permite relacionar os achados com o metabolismo da célula tumoral.

Sabe-se que, por vezes, há dificuldade em diferenciar o TPM do TPBo e o TPB do FA devido à sobreposição de características histopatológicas. Com o DESI-MSI pode ser possível ter um auxílio no diagnóstico anatomopatológico, principalmente em casos duvidosos. Uma vez adquirido um modelo preditivo para o diagnóstico diferencial entre essas lesões, o DESI-MSI pode ser utilizado não só em peças cirúrgicas, mas também em *core biopsies* e materiais citológicos provenientes de punção aspirativa por agulha fina da mama, que são formas menos invasivas de adquirir células ou tecidos

da mama do paciente. Os TPs podem apresentar um aspecto histológico heterogêneo; portanto, diante de uma *core biopsy* com aspecto histológico de um FA, o diagnóstico é, muitas vezes, de lesão fibroepitelial, pois pode ser que a área amostrada seja uma área de aspecto benigno adjacente a um TPM, o que constitui um dilema visto que a conduta de um FA ou TPB pode ser expectante e, no caso do TPM, o tratamento é cirúrgico. Com a análise por DESI-MSI nas *core biopsies* e em exames de citologia mamária pode-se realizar um diagnóstico mais assertivo com um exame menos invasivo e de menor custo comparado à excisão da lesão em centro cirúrgico; porém, além do modelo preditivo, são necessários estudos com *core biopsies* para observar se, por exemplo, em uma área com aspecto de lesão fibroepitelial benigna - mas que a peça cirúrgica é na verdade um TPM, os metabólitos se apresentam semelhantes aos esperados num TPM, seja em intensidade, seja qualitativamente. Não observamos esse aspecto no nosso estudo, visto que as nossas amostras foram homogêneas.

Esse estudo tem potencial de reprodutibilidade e aplicabilidade embora, por se tratar do estudo de um tumor raro, com limitação de amostras; outros estudos, utilizando mais amostras, podem ser necessários para a confirmação dos resultados aqui relatados. Assim como são necessárias análises de MS/MS a fim de identificar alguns dos íons que diferenciaram os tumores entre si e entre o tecido normal da mama. Esses vários íons ainda não identificados na literatura ou em bancos de metabólitos, são um vasto campo de estudo da metabolômica que ainda tem potencial a ser explorado.

Uma vez identificados, é necessário saber se os íons encontrados em

maior intensidade nas células tumorais são produzidos pela própria célula tumoral, promovendo a sua adaptação, multiplicação e inibindo sua apoptose ou se alguns desses íons são produzidos pelo próprio organismo como defesa contra essa célula tumoral. E se os íons encontrados em maior intensidade no tecido normal tiveram sua produção inibida na célula tumoral ou se foram consumidos no metabolismo da célula tumoral; apresentando-se, portanto, com maior intensidade relativa no tecido normal.

Há perspectivas futuras otimistas em relação ao uso do DESI-MSI ou outras técnicas de ionização ambiente na rotina diagnóstica na análise dos tumores bifásicos da mama; porém há algumas limitações que precisam ser resolvidas, como a aquisição de um perfil lipídico e metabólico para cada tipo tumoral, originado de um modelo preditivo definido em estudos prévios; a presença de uma equipe treinada no serviço hospitalar; o alto custo inicial na aquisição do equipamento; e se as operadoras de saúde vão custear o procedimento e como será cobrado.

Entretanto todos esses obstáculos são contornáveis visto que, estudos posteriores poderão formar um modelo preditivo para diversos tumores, o qual já existe para alguns tipos de tumores, como os gliomas, por exemplo; a respeito da equipe, ela poderá ser treinada; o alto custo para a aquisição poderá ser restituído com a realização dos procedimentos, pois a realização do procedimento em si tem custo baixo por não utilizar reagente e ser realizado em condições ambientes de pressão e temperatura; e, acerca das operadoras de saúde, podem ser feitas negociações futuras que resolvam essa questão.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que, através das análises por DESI-MSI foi possível diferenciar os tumores bifásicos da mama. Foi demonstrado que há diferença entre o perfil lipidômico e metabolômico entre os diversos tumores estudados e também em relação ao tecido normal da mama, isso foi verificado através das imagens químicas, comparação dos espectros e, principalmente, através da análise estatística pelo teste não paramétrico de *Wilcoxon-Mann-Whitney*.

Através da análise estatística da intensidade média relativa dos íons encontrados através da ionização negativa, observamos que os íons correspondentes a ácidos graxos; ésteres de cera; diacilglicerol; ceramidas; fosfatidiletanolaminas; ácido fosfatídico; monogalactosildiácilglicerol; fosfatidilserinas; sulfatídeo e fosfatidilinositol, se apresentaram em maior intensidade no FA que no TPBo. Outros valores de m/z correspondentes a ácidos graxos; ésteres de cera e ceramida se apresentaram em maior intensidade no TPBo que no FA.

Comparando o TPM com o TPBo, os íons correspondentes ao ácido ascórbico; ácido graxo ou éster de cera; diacilgliceróis; ceramidas; fosfatidiletanolaminas; fosfatidilglicerol; fosfatidilserinas; sulfatídeo e fosfatidilinositol se apresentaram em maior intensidade no TPM na análise estatística. E os íons correspondentes a ácidos graxos; ácido 3-hidroxicáprico; ésteres de cera; ácidos graxos se apresentaram em maior intensidade no

TPBo que no TPM: Sabe-se da importância de diferenciar o TPM do TPBo, portanto tais íons podem ser utilizados para diferenciar esses tumores através do DESI-MSI.

Através da análise visual das imagens químicas verificamos que alguns íons foram encontrados exclusivamente em alguns tipos tumorais como o íon m/z 771,5181 que foi encontrado apenas no TPB e os íons m/z 304,2365; 328,2359; 394,2683; 521,4589; 549,4892; 551,4653; 551,5049; 557,4568; 583,4730; 589,5206; 591,5357; 613,5201; 629,4918; 739,6265 e 768,5314 foram encontrados apenas no TPBo ou TPM.

Comparando apenas os TPs entre si, o íon m/z 773,5334 estava presente apenas nos TPBs. O íon m/z 583,4730 apenas no TPBo e os íons m/z 293,2123; 629,4918; 654,4660; 710,6302; 716,5241 e 768,5314 estavam presentes apenas no TPM. Esses íons podem ser usados para diferenciar esses tumores entre si.

Através da análise estatística da intensidade média relativa dos íons encontrados através da ionização positiva os íons correspondentes a peptídeos; glicil-lisinamida; fosfatidilglicerol; sulfatídeo; fosfatidilglicerol; fosfatidilserina e fosfatidilinositol se apresentaram em maior intensidade no grupo (TPB + FA) comparado ao grupo (TPM + TPBo). Por sua vez, os íons que apresentaram maior intensidade relativa no grupo (TPM + TPBo) comparado ao grupo (TPB + FA) correspondem a valina; ésteres de cera; esfingosina; tetranor 12-HETE; ácidos lisofosfatídicos; N-acil-aurina; fosfatidilgliceróis; peptídeos; monoacilgliceróis; carnitinas aciladas; lisoesfingomielina; diacilgliceróis; fosfatidilinositol; fosfatidilcolina; L-Lisil-L-

seril-L-serilglicil-L-tirosine; sulfatídeo; lisofosfatidilinositóis; hexosilceramidas; lactosilceramida; ácidos fosfatídicos; fosfatidiletanolaminas; lactoceramidas; esfingomielina; fosfatidilserinas; tri acil/alquil gliceróis e monogalactosildiacylglicerol.

Para comparar o TPM com o TPB os íons correspondentes ao aminoácido valina; éster de cera; esfingosinas; carnitinas aciladas; monoacylgliceróis; lisofosfatidilglicerol; peptídeos; L-Lisil-L-seril-L-serilglicil-L-tirosine; di acil/alquil gliceróis; tri acil/alquil gliceróis; fosfatidiletanolamina-ceramidas; hexosilceramida; fosfatidiletanolaminas; fosfatidilgliceróis; esfingomielinas; sulfatídeos; lactoceramidas; fosfatidilcolinas; monogalactosildiacylgliceróis; ácidos fosfatídicos; fosfatidilserina e fosfatidilinositol são úteis por se apresentar em maior intensidade no TPM. Já os íons relativos a carnitina acilada; fosfatidiletanolamina-ceramida; lactosilceramida; fosfatidiletanolamina e fosfatidilgliceróis se apresentaram em maior intensidade no TPB comparado ao TPM. São úteis, portanto, para diferenciar esses tumores.

Apenas um íon (m/z 230,2473) correspondente a uma esfingosinas foi capaz de diferenciar o TPM do FA na análise estatística.

Há diferença entre os perfis lipidômicos e metabolômicos dos tumores bifásicos benignos e malignos com as maiores diferenças tendo sido encontradas entre os ácidos graxos, fosfolípidios, ceramidas, aminoácidos e peptídeos. As funções celulares desses lípidios observados nos tumores bifásicos se relacionam com metabolismo celular, apoptose e invasividade tumoral.

No futuro, essa técnica poderá ser útil para auxiliar o patologista junto à análise anatomopatológica dos tumores bifásicos da mama, visto que o uso do DESI-MSI adiciona vantagens como a simplicidade na execução, velocidade, sensibilidade e precisão.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbadia Z, Vericel E, Mathevet P, Bertin N, Panaye G, Frappart L. Fatty acid composition and CD36 expression in breast adipose tissue of premenopausal and postmenopausal women. **Anticancer Res** 1997; 17:1217-21.

Ahn J, Park IS, Lee KS, et al. Fatty acid patterns in gastric mucosa of stomach cancer patients. **Yonsei Med J** 2001; 42:220-6.

Alexandrov T. MALDI imaging mass spectrometry: statistical data analysis and current computational challenges. **BMC Bioinformatics** 2012; 13:S11.

Asoglu O, Ugurlu MM, Blanchard K, et al. Risk factors for recurrence and death after primary surgical treatment of malignant phyllodes tumors. **Ann Surg Oncol** 2004; 11:1011-7.

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.

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.

Bauer DF. Constructing confidence sets using rank statistics. **J Am Stat Assoc** 1972; 67:687-90.

Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. **J R Stat Soc Ser B** 1995; 57:289-300.

Bleijerveld OB, Houweling M, Thomas MJ, Cui Z. Metabolipidomics: profiling metabolism of glycerophospholipid species by stable isotopic precursors and tandem mass spectrometry. **Anal Biochem** 2006; 352:1-14.

Brzozowski JS, Jankowski H, Bond DR, et al. Lipidomic profiling of extracellular vesicles derived from prostate and prostate cancer cell lines. **Lipids Health Dis** 2018; 17:211.

Calligaris D, Norton I, Feldman DR, et al. Mass spectrometry imaging as a tool for surgical decision-making. **J Mass Spectrom** 2013; 48:1178-87.

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.

Cani AK, Hovelson DH, McDaniel AS, et al. Next-gen sequencing exposes frequent *med12* mutations and actionable therapeutic targets in phyllodes tumors. **Mol Cancer Res** 2015; 13:613-9.

Chen Y, Ma Z, Shen X, et al. Serum lipidomics profiling to identify biomarkers for non-small cell lung cancer. **Biomed Res Int** 2018; 2018:1-16.

Cooks RG, Ouyang Z, Takats Z, Wiseman JM. Ambient mass spectrometry. **Science** 2006; 311:1566-70.

Dessauvagie BF, Lee AHS, Meehan K, et al. Interobserver variation in the diagnosis of fibroepithelial lesions of the breast: a multicentre audit by digital pathology. **J Clin Pathol** 2018; 71:672-9.

Dill AL, Eberlin LS, Zheng C, et al. Multivariate statistical differentiation of renal cell carcinomas based on lipidomic analysis by ambient ionization imaging mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem** 2010; 398:2969-78.

Dill AL, Eberlin LS, Costa AB, et al. Multivariate statistical identification of human bladder carcinomas using ambient ionization imaging mass spectrometry. **Chem A Eur J** 2011; 17:2897-902.

eberlin ls, dill al, costa ab, et al. cholesterol sulfate imaging in human prostate cancer tissue by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Anal Chem** 2010; 82:3430-4.

Eberlin LS, Ferreira CR, Dill AL, Ifa DR, Cooks RG. Desorption electrospray ionization mass spectrometry for lipid characterization and biological tissue imaging. **Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids** 2011; 1811:946-60.

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, Norton I, Orringer D, et al. Ambient mass spectrometry for the intraoperative molecular diagnosis of human brain tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2013; 110:1611-6.

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.

Eberlin LS, Margulis K, Planell-Mendez I, et al. Pancreatic cancer surgical resection margins: molecular assessment by mass spectrometry imaging. **PLoS Med** 2016; 13:e1002108.

Ellis SR, Brown SH, In het Panhuis M, Blanksby SJ, Mitchell TW. Surface analysis of lipids by mass spectrometry: More than just imaging. **Prog Lipid Res** 2013; 52:329-53.

Fadok VA, De Cathelineau A A DE, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. **J Biol Chem** 2001; 276:1071-7.

Fernandez-De-Cossio-Diaz J, Vazquez A. Limits of aerobic metabolism in cancer cells. **Sci Rep** 2017; 7:13488.

Fiks A. Cystosarcoma phyllodes of the mammary gland muller's tumor. **Virchows Arch A Pathol Anat Histol** 1981; 392:1-6.

Gatalica Z, Vranic S, Ghazalpour A, et al. Multiplatform molecular profiling identifies potentially targetable biomarkers in malignant phyllodes tumors of the breast. **Oncotarget** 2016; 7:1707-16.

Ginter PS, Shin SJ, Liu Y, Chen Z, D'Alfonso TM. Phosphohistone H3 expression correlates with manual mitotic counts and AIDS in identification of "hot spots" in fibroepithelial tumors of the breast. **Hum Pathol** 2016; 49:90-8.

Giri D. Recurrent challenges in the evaluation of fibroepithelial lesions. **Arch Pathol Lab Med** 2009; 133:713-21.

Girod M, Shi Y, Cheng JX, Cooks RG. Desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry of lipids in rat spinal cord. **J Am Soc Mass Spectrom** 2010; 21:1177-89.

González MJ, Miranda-Massari JR, Mora EM, et al. Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later. **Integr Cancer Ther** 2005; 4:32-44.

Goto T, Terada N, Inoue T, et al. The expression profile of phosphatidylinositol in high spatial resolution imaging mass spectrometry as a potential biomarker for prostate cancer. **PLoS One** 2014; 9:e90242.

Guenther S, Muirhead LJ, Speller AVM, et al. Spatially resolved metabolic phenotyping of breast cancer by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Cancer Res** 2015; 75:1828-37.

Guo S, Wang Y, Zhou D, Li Z. Significantly increased monounsaturated lipids relative to polyunsaturated lipids in six types of cancer microenvironment are observed by mass spectrometry imaging. **Sci Rep** 2014; 4:5959.

Hager MH, Solomon KR, Freeman MR. The role of cholesterol in prostate cancer. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** 2006; 9:379-385.

Hietanen E, Punnonen K, Punnonen R, Auvinen O. Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids and lipid peroxidation in human breast cancer and lipoma tissue. **Carcinogenesis** 1986; 7:1965-9.

Huang G, Chen H, Zhang X, Cooks RG, Ouyang Z. Rapid screening of anabolic steroids in urine by reactive desorption electrospray ionization. **Anal Chem** 2007; 79:8327-32.

Jacobs TW, Chen YY, Guinee DG, et al. Fibroepithelial lesions with cellular stroma on breast core needle biopsy: Are there predictors of outcome on surgical excision? **Am J Clin Pathol** 2005; 124:342-54.

Jarmusch AK, Alfaro CM, Pirro V, Hattab EM, Cohen-Gadol AA, Cooks RG. Differential Lipid profiles of normal human brain matter and gliomas by positive and negative mode desorption electrospray ionization - mass spectrometry imaging. **PLoS One** 2016; 11:e0163180.

Kerian KS, Jarmusch AK, Pirro V, et al. Differentiation of prostate cancer from normal tissue in radical prostatectomy specimens by desorption electrospray ionization and touch spray ionization mass spectrometry. **Analyst** 2015; 140:1090-8.

Kessinger A, Foley JF, Lemon HM, Miller DM. Metastatic cystosarcoma phyllodes: a case report and review of the literature. **J Surg Oncol** 1972; 4:131-47.

Kim J-Y, Yu JH, Nam SJ, et al. Genetic and clinical characteristics of phyllodes tumors of the breast. **Transl Oncol** 2018; 11:18-23.

Kim SK, Jung WH, Koo JS. Expression of yes-associated protein (YAP) in breast phyllodes tumor. **Int J Clin Exp Pathol** 2014; 7:5997-6005.

Komenaka IK, El-Tamer M, Pile-Spellman E, Hibshoosh H. Core needle biopsy as a diagnostic tool to differentiate phyllodes tumor from fibroadenoma. **Arch Surg** 2003; 138:987.

Lakhani, S, Ellis. I, Schnitt, S, Tan, P, van de Vijver M. **WHO Classification of tumours of the breast**. 4th. ed. Lyon: IARC; 2012. (WHO Classification of Tumours, Volume 4; IARC WHO Classification of Tumours, n^o 4)

Lien H-C, Huang C-S, Yang Y-W, Jeng Y-M. MED12 exon 2 mutation as a highly sensitive and specific marker in distinguishing phyllodes tumours from other spindle neoplasms of the breast. **APMIS** 2016; 124:356-64.

Liu S-Y, Joseph NM, Ravindranathan A, et al. Genomic profiling of malignant phyllodes tumors reveals aberrations in FGFR1 and PI-3 kinase/RAS signaling pathways and provides insights into intratumoral heterogeneity. **Mod Pathol** 2016; 29:1012-27.

Masterson TA, Dill AL, Eberlin LS, et al. Distinctive glycerophospholipid profiles of human seminoma and adjacent normal tissues by desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. **J Am Soc Mass Spectrom** 2011; 22:1326-33.

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.

Mirvish SS. Experimental evidence for inhibition of N-nitroso compound formation as a factor in the negative correlation between vitamin C consumption and the incidence of certain cancers. **Cancer Res** 1994; 54:1948s-51s.

Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2005; 6:56-68.

Navarro-Tito N, Robledo T, Salazar EP. Arachidonic acid promotes FAK activation and migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Exp Cell Res** 2008; 314:3340-55.

Parrot D, Papazian S, Foil D, Tasdemir D. Imaging the Unimaginable: Desorption Electrospray Ionization - Imaging Mass Spectrometry (DESI-IMS) in Natural Product Research. **Planta Med** 2018; 84:584-93.

Pinot M, Vanni S, Pagnotta S, et al. Lipid cell biology. Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. **Science** 2014; 345:693-7.

Pirro V, Eberlin LS, Oliveri P, Cooks RG. Interactive hyperspectral approach for exploring and interpreting DESI-MS images of cancerous and normal tissue sections. **Analyst** 2012; 137:2374.

Piscuoglio S, Geyer FC, Burke KA, et al. Massively parallel sequencing analysis of synchronous fibroepithelial lesions supports the concept of progression from fibroadenoma to phyllodes tumor. **NPJ Breast Cancer** 2016; 2:508-18.

Porcari AM, Zhang J, Garza KY, et al. Multicenter study using desorption-electrospray-ionization-mass-spectrometry imaging for breast-cancer diagnosis. **Anal Chem** 2018; 90:11324-32.

Pulfer M, Murphy RC. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. **Mass Spectrom Rev** 2003; 22:332-64.

Punnonen K, Hietanen E, Auvinen O, Punnonen R. Phospholipids and fatty acids in breast cancer tissue. **J Cancer Res Clin Oncol** 1989; 115:575-8.

Rawicz W, Olbrich KC, McIntosh T, Needham D, Evans EA. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. **Biophys J** 2000; 79:328-39.

Rowell MD, Perry RR, Hsiu JG, Barranco SC. Phyllodes tumors. **Am J Surg** 1993; 165:376-9.

Sans M, Feider CL, Eberlin LS. Advances in mass spectrometry imaging coupled to ion mobility spectrometry for enhanced imaging of biological tissues. **Curr Opin Chem Biol** 2018; 42:138-46.

Santagata S, Eberlin LS, Norton I, et al. Intraoperative mass spectrometry mapping of an onco-metabolite to guide brain tumor surgery. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2014; 111:11121-6.

Shaaban M, Barthelmes L. Benign phyllodes tumours of the breast: (Over) treatment of margins - a literature review. **Eur J Surg Oncol** 2017; 43:1186-90.

Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR, Grassi MT. **Fundamentos de química analítica**. 8ª ed. Trad. M. T. Grassi. São Paulo: Pioneira Thomson Learning; 2006.

Takáts Z, Wiseman JM, Gologan B, Cooks RG. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. **Science** 2004; 306:471-3.

Tan BY, Acs G, Apple SK, et al. Phyllodes tumours of the breast: a consensus review. **Histopathology** 2016a; 68:5-21.

Tan P-H, Jayabaskar T, Chuah K-L, et al. Phyllodes Tumors of the Breast: The Role of Pathologic Parameters. **Am J Clin Pathol** 2005; 123:529-40.

Tan WJ, Cima I, Choudhury Y, et al. A five-gene reverse transcription-PCR assay for pre-operative classification of breast fibroepithelial lesions. **Breast Cancer Res** 2016b; 18:31.

Tata A, Woolman M, Ventura M, et al. Rapid detection of necrosis in breast cancer with desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Sci Rep** 2016; 6:35374.

Tiwari V, Mandloi V, Ghori H. Malignant phyllodes tumor of the breast with isolated brain metastasis: A case report of an intriguing aggressive subtype. **Clin Cancer Investig J** 2017; 6:167.

Tremblay-LeMay R, Hogue J-C, Provencher L, et al. How wide should margins be for phyllodes tumors of the breast? **Breast J** 2017; 23:315-22.

Utsugi T, Schroit AJ, Connor J, Bucana CD, Fidler IJ. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. **Cancer Res** 1991; 51:3062-6.

Venter AC, Roșca E, Daina LG, Muțiu G, Pirte AN, Rahotă D. Phyllodes tumor: diagnostic imaging and histopathology findings. **Rom J Morphol Embryol** 2015; 56:1397-402.

Wu C, Dill AL, Eberlin LS, Cooks RG, Ifa DR. Mass spectrometry imaging under ambient conditions. **Mass Spectrom Rev** 2013; 32:218-43.

Xiong X, Xu W, Eberlin LS, et al. Data processing for 3D mass spectrometry imaging. **J Am Soc Mass Spectrom** 2012; 23:1147-56.

Yamaji-Hasegawa A, Tsujimoto M. Asymmetric Distribution of Phospholipids in Biomembranes. **Biol Pharm Bull** 2006; 29:1547-53.

Yoon N, Bae GE, Kang SY, et al. Frequency of MED12 mutations in phyllodes tumors: Inverse correlation with histologic grade. **Genes, Chromosom Cancer** 2016; 55:495-504.

Zhang J, Feider CL, Nagi C, et al. Detection of metastatic breast and thyroid cancer in lymph nodes by desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging. **J Am Soc Mass Spectrom** 2017; 28:1166-74.

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



A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de 10/05/2016, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 05/04/2016, aprovaram a realização do projeto nº 2185/16 intitulado: “Identificação dos perfis lipídômicos in situ dos tumores bifásicos da mama por DESI/MS (Desorption Electrospray Ionization/ Mass spectrometry)”.

Pesquisador responsável: Dr. Victor Piana de Andrade
Aluno: Monique Batista da Costa Lemos (Doutorado)

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 13 de maio de 2016.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gróss

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Apêndice 1 - Lista de Tabelas de 1 a 4 referentes aos íons detectados na ionização pelo modo negativo e positivo e suas respectivas massa experimental, teórica, fórmula molecular e sugestão de identificação

Tabela 1 - Íons detectados nesse estudo com sua massa experimental e teórica, fórmula molecular e erro em ppm (ionização pelo modo negativo por DESI-MS).

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
124,0066	[M-H] ⁻	C ₂ H ₇ NO ₃ S	124,0062	-1,683
135,0302	[M-H] ⁻	C ₄ H ₈ O ₅	135,0287	2,419
141,0909	[M-H] ⁻	C ₈ H ₁₄ O ₂	141,0910	-0,186
143,1067	[M-H] ⁻	C ₈ H ₁₆ O ₂	143,1066	-6,45
175,0240	[M-H] ⁻	C ₆ H ₈ O ₆	175,0237	-4,292
187,0968	[M+H] ⁻	C ₈ H ₁₄ O ₂	187,0964	-0,186
187,1333	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₂₀ O ₃	187,1328	-3,408
215,0323	[M+Cl] ⁻	C ₆ H ₁₂ O ₆	215,0316	-2,228
227,2013	[M-H] ⁻	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	227,2005	-1,555
243,0620	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₅	243,0611	-1,026
253,2173	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	253,2162	0,065
277,1445	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	277,1434	0,099
277,2175	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	277,2162	0,853
279,2331	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279,2318	0,847
281,2487	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	281,2475	0,627
283,2644	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	283,2631	0,517
293,2123	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	293,2111	0,348
301,2177	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	301,2162	1,449
303,2330	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	303,2318	2,88

Cont/ Tabela 1

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
305,2487	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	305,2475	0,447
307,2644	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	307,2631	0,574
309,2800	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	309,2788	0,602
313,2384	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	313,2373	0,151
317,2255	[M+Cl] ⁻	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	317,2241	0,942
319,2277	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	319,2267	-0,307
320,2465	[M+CH ₃ COO] ⁻	C ₁₄ H ₃₁ NO ₃	320,2431	7,099
327,2332	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	327,2318	0,753
329,2488	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₃₄ O ₂	329,2475	0,627
331,2643	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	331,2631	0,261
333,2802	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₃₈ O ₂	333,2788	0,979
335,2211	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	335,2216	-3,115
337,2375	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	337,2373	-2,707
379,2482	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₃₆ O ₅	379,2479	-2,024
391,2468	[M-H] ⁻	C ₂₃ H ₃₆ O ₅	391,2479	-1,966
391,2620	[M+Cl] ⁻	C ₂₁ H ₄₀ O ₄	391,2609	0,049
393,2626	[M-H] ⁻	C ₂₃ H ₃₈ O ₅	393,2635	0,926
413,2464	[M+Cl] ⁻	C ₂₃ H ₃₈ O ₄	413,2453	0,144
415,2476	[M-H] ⁻	C ₂₅ H ₃₆ O ₅	415,2479	-1,852
465,3048	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₄₆ O ₄ S	465,3033	2,137
521,4589	[M-H] ⁻	C ₃₃ H ₃₈ O ₅	521,4564	-0,084
523,4733	[M-H] ⁻	C ₃₃ H ₆₄ O ₄	523,4720	0,394
533,4576	[M-H] ⁻	C ₃₄ H ₆₂ O ₄	533,4564	0,181
549,4892	[M+HCOO] ⁻	C ₃₄ H ₆₄ O ₂	549,4877	0,758
551,4653	[M-H] ⁻	C ₃₄ H ₆₄ O ₅	551,4670	-5,038

Cont/ Tabela 1

	Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)	
[M-5] 535,4730	535,4730	[M-H] ⁻	C ₃₅ H ₆₂ O ₄	535,4720	0,99	535,4720
[M-5] 537,4887	537,4887	[M-H] ⁻	C ₃₇ H ₆₆ O ₄	537,4877	0,99	537,4877
	557,4568	[M+HCOO] ⁻	C ₃₅ H ₆₀ O ₂	557,4564	-1,262	
	559,4729	[M-H] ⁻	C ₃₆ H ₆₄ O ₄	559,4720	-0,471	
	561,4886	[M+HCOO] ⁻	C ₃₅ H ₆₄ O ₂	561,4877	-0,256	
	561,4886	[M+CH ₃ COO] ⁻	C ₃₄ H ₆₂ O ₂	561,4877	-0,256	
	563,5046	[M+HCOO] ⁻	C ₃₅ H ₆₆ O ₂	563,5033	0,335	
	564,5080	[M-H] ⁻	C ₃₅ H ₆₇ NO ₄	564,5112	-7,615	
	565,5203	[M+HCOO] ⁻	C ₃₅ H ₆₈ O ₂	565,5190	0,364	
	572,4812	[M+Cl] ⁻	C ₃₄ H ₆₇ NO ₃	572,4803	1,451	
	572,4816	[M+Cl] ⁻	C ₃₄ H ₆₇ NO ₃	572,4803	0,234	
	583,4730	[M+HCOO] ⁻	C ₃₇ H ₆₂ O ₂	583,4720	-0,212	
	585,4888	[M+HCOO] ⁻	C ₃₇ H ₆₄ O ₂	585,4877	0,096	
	585,4888	[M+CH ₃ COO] ⁻	C ₃₆ H ₆₂ O ₂	585,4877	0,096	
	587,5044	[M+HCOO] ⁻	C ₃₇ H ₆₆ O ₂	587,5033	-0,109	
	589,5206	[M+HCOO] ⁻	C ₃₇ H ₆₈ O ₂	589,5190	0,909	
	591,5357	[M+CH ₃ COO] ⁻	C ₃₆ H ₆₈ O ₂	591,5346	0,01	
	607,4730	[M+HCOO] ⁻	C ₃₉ H ₆₂ O ₂	607,4720	-0,22	
	607,4739	[M-H] ⁻	C ₄₀ H ₆₄ O ₄	607,4720	-0,22	
	607,4739	[M+HCOO] ⁻	C ₃₉ H ₆₂ O ₂	607,4720	-0,22	
	609,4880	[M+HCOO] ⁻	C ₃₉ H ₆₄ O ₂	609,4877	-1,319	
	611,5045	[M+HCOO] ⁻	C ₃₉ H ₆₆ O ₂	611,5033	0,026	
	611,5045	[M+CH ₃ COO] ⁻	C ₃₈ H ₆₄ O ₂	611,5033	0,026	
	613,5201	[M+HCOO] ⁻	C ₃₉ H ₆₈ O ₂	613,5190	0,026	

Cont/ Tabela 1

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
626,5367	[M+HCOO] ⁻	C ₃₆ H ₇₁ NO ₄	626,5354	0,316
627,4758	[M+Cl] ⁻	C ₃₇ H ₆₈ O ₅	627,4749	-0,408
629,4918	[M+Cl] ⁻	C ₃₇ H ₇₀ O ₅	629,4906	0,228
633,5105	[M+CH ₃ COO] ⁻	C ₃₇ H ₆₆ O ₄	633,5088	0,958
635,5040	[M+CH ₃ COO] ⁻	C ₄₀ H ₆₄ O ₂	635,5033	-0,624
637,5196	[M+HCOO] ⁻	C ₄₁ H ₆₈ O ₂	637,5190	-0,464
637,5196	[M+CH ₃ COO] ⁻	C ₄₀ H ₆₆ O ₂	637,5190	-0,464
637,5418	[M-H] ⁻	C ₃₉ H ₇₄ O ₆	637,5401	0,617
654,4660	[M+Cl] ⁻	C ₃₄ H ₇₀ NO ₆ P	654,4623	3,994
654,5645	[M+HCOO] ⁻	C ₃₈ H ₇₅ NO ₄	654,5667	3,928
654,5645	[M+CH ₃ COO] ⁻	C ₃₇ H ₇₃ NO ₄	654,5667	3,928
680,5747	[M+Cl] ⁻	C ₄₂ H ₇₉ NO ₃	680,5742	-1,023
682,5913	[M+Cl] ⁻	C ₄₂ H ₈₁ NO ₃	682,5899	0,372
684,6069	[M+Cl] ⁻	C ₄₂ H ₈₃ NO ₃	684,6055	0,400
710,6302	[M+HCOO] ⁻	C ₄₂ H ₈₃ NO ₄	710,6293	-0,229
710,6302	[M+CH ₃ COO] ⁻	C ₄₁ H ₈₁ NO ₄	710,6293	-0,229
716,5241	[M-H] ⁻	C ₃₉ H ₇₆ NO ₈ P	716,5224	0,784
722,5129	[M-H] ⁻	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	722,5119	-0,032
736,6467	[M+HCOO] ⁻	C ₄₄ H ₈₅ NO ₄	736,6293	0,906
737,5366	[M-H] ⁻	C ₃₉ H ₇₉ O ₁₀ P	737,5327	3,799
738,6610	[M+HCOO] ⁻	C ₄₄ H ₈₇ NO ₄	738,6606	-0,911
738,6610	[M+CH ₃ COO] ⁻	C ₄₃ H ₈₅ NO ₄	738,6606	-0,911
742,5386	[M-H] ⁻	C ₄₁ H ₇₈ NO ₈ P	742,5381	-0,738
744,5538	[M-H] ⁻	C ₄₁ H ₈₀ NO ₈ P	744,5537	-1,367

Cont/ Tabela 1

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
748,5270	[M-H] ⁻	C ₄₃ H ₇₆ NO ₇ P	748,5275	-2,115
750,5439	[M-H] ⁻	C ₄₃ H ₇₈ NO ₇ P	750,5432	-0,511
751,5276	[M-H] ⁻	C ₄₃ H ₇₇ O ₈ P	751,5272	-0,917
766,5391	[M-H] ⁻	C ₄₃ H ₇₈ NO ₈ P	766,5381	-0,063
768,5314	[M+Cl] ⁻	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	768,5304	-0,086
771,5181	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₇₇ O ₁₀ P	771,5170	0,041
773,5334	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₇₉ O ₁₀ P	773,5327	-0,45
786,5287	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₇₈ NO ₁₀ P	786,5279	-0,352
788,5442	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₈₀ NO ₁₀ P	788,5436	-0,605
792,5311	[M+Cl] ⁻	C ₄₂ H ₈₀ NO ₈ P	792,5304	-0,487
794,5450	[M-H] ⁻	C ₄₁ H ₈₁ NO ₁₁ S	794,5446	-0,901
810,5280	[M-H] ⁻	C ₄₄ H ₇₈ NO ₁₀ P	810,5279	-1,304
885,5501	[M-H] ⁻	C ₄₇ H ₈₃ O ₁₃ P	885,5487	0,314

Tabela 2 - Metabólitos identificados através dos bancos de dados *Metlin*, *LipidMaps* e *Metabolomics Workbench* (ionização pelo modo negativo por DESI-MS).

Massa Experimental	Metabólito proposto
124,0066	Taurina
135,0302	Treonato
141,0909	FA(8:1)
143,1067	FA(8:0)
175,0240	Ácido ascórbico
187,0968	FA(8:1)
187,1333	Ácido 3-hidroxicáprico
215,0323	FA(6:0(OH4))
227,2013	FA(14:0) WE(14:0)
243,0620	Uridina
253,2173	FA(16:0(ciclo)) FA(16:1) FA(16:1)) WE(16:1) FA(16:2(Ep2,ciclo)) FA(16:2(Ke2,ciclo)) FA(16:2(Ke,Ep,ciclo)) FA(16:3(Ep2)) FA(16:3(Ke2))
277,1445	FA(16:3(Ke,Ep)) FA(16:3(OH,Ep,ciclo)) FA(16:3(OH,Ke.ciclo)) FA(16:4(OH2,ciclo)) FA(16:4(OH,Ep)) FA(16:4(OH,Ke)) FA(18:2(ciclo))
277,2175	FA(18:3) WE(18:3) FA(18:1(ciclo))
279,2331	FA(18:2) WE(18:2) FA(18:0(ciclo))
281,2487	FA(18:1) FA(18:1) WE(18:2)
283,2644	FA(18:0) WE(18:0)

Cont/ Tabela 2

Massa Experimental	Metabólito proposto
	FA(18:1(Ep,ciclo))
	FA(18:1(Ke,ciclo))
293,2123	FA(18:2(Ep))
	FA(18:2(Ke))
	FA(18:2(OH,ciclo))
	FA(18:3(OH))
301,2177	FA(20:4(ciclo))
	FA(20:5)
303,2330	FA(20:4)
	FA(20:2(ciclo))
305,2487	FA(20:3)
	WE(20:3)
	FA(20:1(ciclo))
307,2644	FA(20:2)
	WE(20:2)
	FA(20:0(ciclo))
309,2800	FA(20:1)
	WE(20:1)
	FA(18:0(OH ₂ ,ciclo))
313,2384	FA(18:0(OH,Ep))
	FA(18:0(OH,Ke))
	FA(18:1(OH ₂))
	FA(18:0(ciclo))
317,2255	FA(18:1)
	FA(18:1))
	WE(18:1)
	FA(20:2(Ep,ciclo))
	FA(20:2(Ke,ciclo))
319,2277	FA(20:3(Ep))
	FA(20:3(Ke))
	FA(20:3(OH,ciclo))
	FA(20:4(OH))
320,2465	Sph(t14:0)
327,2332	FA(22:5(ciclo))
	FA(22:6)
	FA(22:4(ciclo))
329,2488	FA(22:5)
	WE(22:5)
	FA(22:3(ciclo))
331,2643	FA(22:4)
	WE(22:4)
	FA(22:2(ciclo))
333,2802	FA(22:3)
	WE(22:3)

Cont/ Tabela 2

Massa Experimental	Metabólito proposto
335,2211	FA(20:1(Ep2,ciclo))
	FA(20:1(Ke2,ciclo))
	FA(20:1(Ke,Ep,ciclo))
	FA(20:2(Ep2))
	FA(20:2(Ke2))
	FA(20:2(Ke,Ep))
	FA(20:2(OH,Ep,ciclo))
	FA(20:2(OH,Ke,ciclo))
	FA(20:3(OH2,ciclo))
	FA(20:3(OH,Ep))
	FA(20:3(OH,Ke))
	FA(20:4(OH2))
	FA(20:0(Ep2,ciclo))
	FA(20:0(Ke2,ciclo))
	FA(20:0(Ke,Ep,ciclo))
	FA(20:1(Ep2))
	FA(20:1(Ke2))
337,2375	FA(20:1(Ke,Ep))
	FA(20:1(OH,Ep,ciclo))
	FA(20:1(OH,Ke,ciclo))
	FA(20:2(OH2,ciclo))
	FA(20:2(OH,Ep))
	FA(20:2(OH,Ke))
	FA(20:3(OH2))
	FA(22:0(Ke2,Ep,ciclo))
	FA(22:0(Ke,Ep2,ciclo))
	FA(22:1(Ke2,Ep))
	FA(22:1(Ke,Ep2))
379,2482	FA(22:1(OH,Ep2,ciclo))
	FA(22:1(OH,Ke2,ciclo))
	FA(22:1(OH,Ke,Ep,ciclo))
	FA(22:2(OH2,Ep,ciclo))
	FA(22:2(OH2,Ke,ciclo))
	FA(22:2(OH,Ep2))
	FA(22:2(OH,Ke2))
	FA(22:2(OH,Ke,Ep))
	FA(22:3(OH2,Ep))
	FA(22:3(OH2,Ke))
	FA(22:3(OH3,ciclo))
FA(22:4(OH3))	

Cont/ Tabela 2

Massa Experimental	Metabólito proposto
391,2468	FA(23:1(Ke2,Ep,ciclo))
	FA(23:1(Ke,Ep2,ciclo))
	FA(23:2(Ke2,Ep))
	FA(23:2(Ke,Ep2))
	FA(23:2(OH,Ep2,ciclo))
	FA(23:2(OH,Ke2,ciclo))
	FA(23:2(OH,Ke,Ep,ciclo))
	FA(23:3(OH2,Ep,ciclo))
	FA(23:3(OH2,Ke,ciclo))
	FA(23:3(OH,Ep2))
	FA(23:3(OH,Ke2))
	FA(23:3(OH,Ke,Ep))
	FA(23:4(OH2,Ep))
	FA(23:4(OH2,Ke))
	FA(23:4(OH3,ciclo))
FA(23:5(OH3))	
391,2620	FA(21:0(OH2,ciclo))
	FA(21:0(OH,Ep))
	FA(21:0(OH,Ke))
	FA(21:1(OH2))
	FA(23:0(Ke2,Ep,ciclo))
	FA(23:0(Ke,Ep2,ciclo))
	FA(23:1(Ke2,Ep))
	FA(23:1(Ke,Ep2))
	FA(23:1(OH,Ep2,ciclo))
	FA(23:1(OH,Ke2,ciclo))
	FA(23:1(OH,Ke,Ep,ciclo))
	FA(23:2(OH2,Ep,ciclo))
	FA(23:2(OH2,Ke,ciclo))
	FA(23:2(OH,Ep2))
	FA(23:2(OH,Ke2))
FA(23:2(OH,Ke,Ep))	
FA(23:3(OH2,Ep))	
FA(23:3(OH2,Ke))	
FA(23:3(OH3,ciclo))	
FA(23:4(OH3))	
FA(23:1(Ke2,ciclo))	
FA(23:1(Ep2,ciclo))	
FA(23:1(Ke,Ep,ciclo))	
FA(23:2(Ep2))	
FA(23:2(Ke2))	
FA(23:2(Ke,Ep))	
FA(23:2(OH,Ke,ciclo))	
FA(23:2(OH,Ep,ciclo))	
FA(23:3(OH2,ciclo))	
FA(23:3(OH,Ke))	
FA(23:3(OH,Ep))	
FA(23:4(OH2))	
413,2464	FA(23:4(OH2))

Cont/ Tabela 2

Massa Experimental	Metabólito proposto
415,2476	FA(25:3(Ke2,Ep,ciclo))
	FA(25:3(Ke,Ep2,ciclo))
	FA(25:4(Ke2,Ep))
	FA(25:4(Ke,Ep2))
	FA(25:4(OH,Ep2,ciclo))
	FA(25:4(OH,Ke2,ciclo))
	FA(25:4(OH,Ke,Ep,ciclo))
	FA(25:5(OH2,Ep,ciclo))
	FA(25:5(OH2,Ke,ciclo))
	FA(25:5(OH,Ep2))
	FA(25:5(OH,Ke2))
	FA(25:5(OH,Ke,Ep))
	FA(25:6(OH2,Ep))
	FA(25:6(OH2,Ke))
FA(25:6(OH3,ciclo))	
465,3048	Sulfato de colesterol
	FA(33:0(Ep2))
	FA(33:0(Ke2))
	FA(33:0(Ke,Ep))
521,4589	FA(33:0(OH,Ep,ciclo))
	FA(33:0(OH,Ke,ciclo))
	FA(33:1(OH2,ciclo))
	FA(33:1(OH,Ep))
	FA(33:1(OH,Ke))
	FA(33:2(OH2))
523,4733	FA(33:0(OH2,ciclo))
	FA(33:0(OH,Ep))
	FA(33:0(OH,Ke))
	FA(33:1(OH2))
	FA(34:0(Ep2,ciclo))
	FA(34:0(Ke2,ciclo))
533,4576	FA(34:0(Ke,Ep,ciclo))
	FA(34:1(Ep2))
	FA(34:1(Ke2))
	FA(34:1(Ke,Ep))
	FA(34:1(OH,Ep,ciclo))
	FA(34:1(OH,Ke,ciclo))
	FA(34:2(OH2,ciclo))
	FA(34:2(OH,Ep))
	FA(34:2(OH,Ke))
	FA(34:3(OH2))
	FA(34:0(Ep2))
	FA(34:0(Ke2))
	FA(34:0(Ke,Ep))
	FA(34:0(OH,Ep,ciclo))
FA(34:0(OH,Ke,ciclo))	
535,4730	FA(34:1(OH2,ciclo))
	FA(34:1(OH,Ep))
	FA(34:1(OH,Ke))
	FA(34:2(OH2))
	FA(34:0(OH2,ciclo))
	FA(34:0(OH,Ep))
537,4887	FA(34:0(OH,Ke))
	FA(34:1(OH2))
	FA(34:1(OH2))

Cont/ Tabela 2

Massa Experimental	Metabólito proposto
549,4892	FA(34:1(ciclo)) FA(34:2) WE(34:2) FA(34:0(OH2,Ep,ciclo)) FA(34:0(OH2,Ke,ciclo)) FA(34:0(OH,Ep2)) FA(34:0(OH2,Ke2))
551,4653	FA(34:0(OH,Ke,Ep)) FA(34:1(OH2,Ep)) FA(34:1(OH2,Ke)) FA(34:1(OH3,ciclo)) FA(34:2(OH3)) FA(34:0(ciclo))
551,5049	FA(34:1) WE(34:1)
557,4568	WE(35:5)
559,4729	FA(36:3)
561,4886	WE(35:3) FA(34:2(ciclo))
561,4891	FA(34:3) WE(34:3)
563,5046	WE(35:2)
564,5080	CAR(28:1) Cer(t35:2)
565,5203	WE(35:1)
572,4812	Cer(d34:1)
572,4816	Cer(d34:1)
583,4730	FA(37:6) WE(37:6)
585,4888	WE(37:5)
585,4888	FA(36:5) WE(36:5)
587,5044	WE(37:4)
589,5206	WE(37:3)
591,5357	WE(36:2)
607,4730	WE(39:8)
607,4739	FA
607,4739	WE(39:8)
609,4880	WE(39:7)
611,5045	WE(39:6)
611,5045	FA(38:6) WE(38:6)
613,5201	WE(39:5)
626,5367	CAR(29:0) Cer(t36:1)
627,4758	DG(20:2(11Z,14Z)/14:0/0:0) DG(17:1(9Z)/17:1(9Z)/0:0) DG(18:1(11Z)/16:0/0:0)
629,4918	DG(18:0/16:1(9Z)/0:0) DG(20:0/14:1(9Z)/0:0) DG(20:1(11Z)/14:0/0:0)
633,5105	FA(37:3)
635,5040	WE(40:8)

Cont/ Tabela 2

Massa Experimental	Metabólito proposto
637,5196	WE(41:7)
637,5196	WE(40:7)
637,5418	TG(12:0/12:0/12:0)
654,4660	CerP(d34:0)
654,5645	CAR(31:0)
654,5645	Cer(t38:1)
654,5645	CAR(30:0)
680,5747	Cer(t37:1)
682,5913	Cer(d42:3)
684,6069	Cer(d42:2)
710,6302	Cer(d42:1)
710,6302	Cer(t42:1)
710,6302	CAR(34:0)
716,5241	Cer(t41:1)
716,5241	PE(34:1)
716,5241	PE(O-34:2(OH))
716,5241	PE(P-34:1(OH))
722,5129	PE(O-36:5)
722,5129	PE(P-36:4)
736,6467	Cer(t44:2)
737,5366	PG(O-33:0(OH))
738,6610	Cer(t44:1)
738,6610	Cer(t43:1)
742,5386	PE(36:2)
742,5386	PE(O-36:3(OH))
742,5386	PE(P-36:2(OH))
744,5538	PE(36:1)
744,5538	PE(O-36:2(OH))
744,5538	PE(P-36:1(OH))
748,5270	PE(O-38:6)
748,5270	PE(P-38:5)
750,5439	PE(O-38:5)
750,5439	PE(P-38:4)
751,5276	PA(40:4)
751,5276	PA(O-40:5(OH))
751,5276	PA(P-40:4(OH))
751,5276	MGDG(34:3)
766,5391	PE(38:4)
766,5391	PE(O-38:5(OH))
766,5391	PE(P-38:4(OH))
768,5314	PC(32:0)
768,5314	PC(O-32:1(OH))
768,5314	PC(P-32:0(OH))
768,5314	PE(35:0)
768,5314	PE(O-35:1(OH))
768,5314	PE(P-35:0(OH))
771,5181	PG(36:3)
771,5181	PG(O-36:4(OH))
771,5181	PG(P-36:3(OH))
773,5334	PG(36:2)
773,5334	PG(O-36:3(OH))
773,5334	PG(P-36:2(OH))

Cont/ Tabela 2

Massa Experimental	Metabólito proposto
786,5287	PS(36:2) PS(O-36:3(OH)) PS(P-36:2(OH))
788,5442	PS(36:1) PS(O-36:2(OH)) PS(P-36:1(OH))
792,5311	PC(34:2) PC(O-34:3(OH)) PC(P-34:2(OH))
794,5450	PE(37:2) PE(P-37:2(OH)) SHexCer(d35:0)
810,5280	PS(38:4) PS(O-38:5(OH)) PS(P-38:4(OH))
885,5501	PI(38:4) PI(O-38:5(OH)) PI(P-38:4(OH)) DGDG(32:3)

Tabela 3 - Íons detectados nesse estudo com sua massa experimental e teórica, fórmula molecular e erro em ppm (ionização pelo modo positivo por DESI-MS).

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
145,1224	[M+2H] ²⁺	C ₁₆ H ₃₂ O ₄	290,2451	0,646
162,0501	[M+2Na-H] ⁺	C ₅ H ₁₁ NO ₂	162,0501	-0,275
163,9779	[M+K] ⁺	C ₂ H ₇ NO ₃ S	163,9779	0,474
175,1115	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	175,1117	-1,380
203,0527	[M+Na] ⁺	C ₆ H ₁₂ O ₆	203,0526	0,447
227,2004	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	227,2005	-0,557
230,2473	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₃₁ NO	230,2478	-2,263
269,1471	[M+Na] ⁺	C ₁₁ H ₂₂ N ₂ O ₄	269,1471	0,068
279,2314	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	279,2318	-1,636
289,1773	[M+Na] ⁺	C ₁₆ H ₂₆ O ₃	289,1774	-0,504
291,0699	[M+Na] ⁺	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	291,0699	-0,311
291,2298	[M+Na] ⁺	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	291,2294	1,368
293,1359	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₆ N ₆ O ₃	293,1356	0,938
301,1404	[M+Na] ⁺	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	301,1410	-1,927
305,1572	[M+Na] ⁺	C ₁₃ H ₂₂ N ₄ O ₃	305,1584	-3,676
313,2135	[M+2H] ²⁺	C ₃₅ H ₆₁ O ₇ P	626,4305	-4,795
315,1561	[M+2H] ²⁺	C ₂₉ H ₄₀ N ₈ O ₈	315,1559	1,201
327,2274	[M+2Na-H] ⁺	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	327,2270	1,142
370,2018	[M+Na] ⁺	C ₁₇ H ₃₃ NO ₄ S	370,2022	-1,217
			M ⁺ 742,4367	
371,2190	[M+2Na] ²⁺	C ₃₅ H ₆₉ O ₁₁ P	M ²⁺ 371,2181	2,678
			M ⁺ 746,3976	
373,1979	[M+2Na] ²⁺	C ₄₀ H ₆₀ O ₁₀	M ²⁺ 373,1985	-1,648
386,2654	[M+2Na-H] ⁺	C ₂₀ H ₃₉ NO ₃	386,2641	3,210

Cont/ Tabela 3

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
89,2504	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₆ H ₂₉ N ₅ O ₅	389,2506	-0,757
391,2084	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₈ H ₂₃ N ₅ O ₄	391,2088	-1,099
395,2149	[M+2Na-H] ⁺	C ₂₁ H ₃₄ O ₄	395,21632	-4,998
			M+	
			798,5567	
399,2780	[M+2H] ²⁺	C ₃₉ H ₇₂ O ₁₂ P	M2+	-0,975
			399,7811	
400,3419	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₄₅ NO ₄	400,3415	-0,588
401,266	[M+Na] ⁺	C ₂₃ H ₃₈ O ₄	401,2656	-0,575
410,2739	[M+Na] ⁺	C ₁₈ H ₃₇ N ₅ O ₄	410,2732	0,303
411,2498	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₃₉ O ₇ P	411,2500	-1,985
413,2258	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₁₆ H ₃₀ N ₈ O ₆	413,2249	0,623
423,1989	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₁₈ H ₂₈ N ₆ O ₇	423,19865	0,569
426,2172	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₁₉ H ₃₃ N ₅ O ₅ S	426,2164	0,583
426,3579	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₄₇ NO ₄	426,3572	0,269
428,2297	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₂₂ H ₃₁ N ₅ O ₅	428,2286	1,095
429,2007	[M+H-2H ₂ O] ⁺	C ₁₉ H ₂₈ N ₈ O ₆	429,1987	3,197
429,2968	[M+Na] ⁺	C ₂₅ H ₄₂ O ₄	429,2969	-1,703
429,3721	[M+Na] ⁺	C ₂₇ H ₅₀ O ₂	429,3697	4,188
430,2068	[M+Na] ⁺	C ₁₉ H ₂₉ N ₅ O ₅	430,2055	1,650
430,3124	[M+2Na] ²⁺	C ₄₇ H ₉₁ O ₈ P	860,6235	-1,073
431,3486	[M+NH ₄] ⁺	C ₂₃ H ₄₃ NO ₅	431,3474	1,509
432,2250	[M+H-2H ₂ O] ⁺	C ₂₁ H ₃₃ N ₅ O ₇	432,2235	1,977
433,2833	[M+Na] ⁺	C ₁₉ H ₄₃ N ₂ O ₅ P	433,2820	1,253
435,2354	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₆	435,2344	0,817

Cont/ Tabela 3

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
437,2359	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₆ H ₂₉ N ₅ O ₈	437,2348	1,056
437,3243	[M+H-2H ₂ O] ⁺	C ₂₂ H ₄₄ N ₆ O ₅	437,3229	1,908
441,3201	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₂₁ H ₄₂ N ₆ O ₅	441,3178	3,897
442,1919	[M+2Na-H] ⁺	C ₁₇ H ₃₆ NO ₇ P	442,19355	-4,986
443,2037	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₅ O ₁₀ P	443,2035	-0,813
443,2398	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₃₉ O ₉ P	443,2398	-1,457
			M+	
			886,6052	
443,3021	[M+2Na] ²⁺	C ₅₅ H ₈₄ O ₆	M2+	-1,165
			443,3026	
			M+	
			443,8343	
443,3336	[M+2H] ²⁺	C ₅₀ H ₉₃ O ₁₀ P	M2+	2,269
			886,6651	
444,4192	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₃₀ H ₅₅ NO ₂	444,4199	-1,782
445,2918	[M+2Na-H] ⁺	C ₂₃ H ₄₄ O ₅	445,2900	3,952
447,2716	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₂₂ H ₃₆ N ₆ O ₅	447,2714	0,380
450,3577	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₇ NO ₄	450,3577	-0,190
453,2088	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₉ H ₂₅ N ₅ O ₇	453,2092	-0,935
			M+	
			455,2756	
455,2762	[M+2Na] ²⁺	C ₄₅ H ₈₅ O ₁₃ P	M2+	1,294
			910,5512	
457,3289	[M+Na] ⁺	C ₂₇ H ₄₆ O ₄	457,3288	0,151
463,2668	[M+NH ₄] ⁺	C ₂₂ H ₃₁ N ₅ O ₅	463,2657	0,983

Cont/ Tabela 3

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
			M+	
464,3056	[M+2H] ²⁺	C ₅₀ H ₈₆ O ₁₅	464,3056	-0,027
			M2+	
			928,6112	
465,2975	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₄₅ O ₇ P	465,2970	-0,143
467,2254	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₈	467,2243	1,126
469,2923	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₄₅ O ₈ P	469,2919	-0,386
471,2876	[M+K] ⁺	C ₂₇ H ₄₄ O ₄	471,2865	1,022
473,3449	[M+NH ₄] ⁺	C ₂₂ H ₄₁ N ₅ O ₅	473,3440	0,644
474,3268	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₄₃ N ₅ O ₆	474,3280	-3,817
479,2609	[M+2Na-H] ⁺	C ₂₁ H ₄₃ N ₂ O ₅ P	479,2615	-2,556
485,2677	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₄₁ O ₇ P	485,2657	2,954
485,3244	[M+H-2H ₂ O] ⁺	C ₂₆ H ₄₄ N ₆ O ₅	485,3229	1,925
489,2972	[M+Na] ⁺	C ₂₃ H ₄₇ O ₇ P	489,2946	4,166
490,2901	[M+Na] ⁺	C ₂₂ H ₄₆ NO ₇ P	490,2898	-0,633
499,3024	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₄₇ O ₉ P	499,3024	-2,095
503,1929	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₁₉ H ₃₂ N ₆ O ₉ S	503,1913	2,069
503,3336	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₂₆ H ₄₄ N ₆ O ₅	503,3334	-0,855
507,3659	[M+H-2H ₂ O] ⁺	C ₂₆ H ₅₀ N ₆ O ₆	507,3647	1,123
517,3126	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₄₀ N ₆ O ₅	517,3127	-1,343
517,3496	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₂₇ H ₄₆ N ₆ O ₅	517,3491	-0,001
518,3220	[M+Na] ⁺	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	518,3217	0,559
519,2921	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₃₈ N ₆ O ₆	519,2925	-0,885
525,2863	[M+Na] ⁺	C ₁₉ H ₃₈ N ₁₀ O ₆	525,2868	-0,876
533,2802	[M+Na] ⁺	C ₂₂ H ₃₈ N ₈ O ₆	533,2801	-0,848

Cont/ Tabela 3

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
533,3065	[M+H-2H ₂ O] ⁺	C ₂₂ H ₄₀ N ₁₂ O ₆	533,3049	1,830
533,3448	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₂₇ H ₄₆ N ₆ O ₆	533,34404	0,384
533,3697	[M+Na] ⁺	C ₂₅ H ₅₅ N ₂ O ₆ P	533,3684	1,322
534,2820	[M+Na] ⁺	C ₂₃ H ₄₆ NO ₉ P	534,2796	3,295
534,3196	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₂₆ H ₅₀ NO ₉ P	534,3184	1,066
541,2613	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₃₆ N ₆ O ₉	541,26165	-0,652
542,3213	[M+Na] ⁺	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	542,3217	-0,757
548,3430	[M+H] ⁺	C ₂₈ H ₄₅ N ₅ O ₆	548,3442	-2,299
551,3337	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₅₁ O ₉ P	551,3343	-1,172
553,3881	[M+Na] ⁺	C ₃₃ H ₅₄ O ₅	553,3857	3,332
561,3387	[M+NH ₄] ⁺	C ₂₄ H ₄₉ NO ₁₀ S	561,3409	-4,922
562,3254	[M+K] ⁺	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	562,3263	-2,664
567,3279	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₂₇ H ₅₃ O ₁₁ P	567,32871	-2,345
579,4383	[M+H] ⁺	C ₃₁ H ₆₃ O ₇ P	579,4378	-0,202
595,3621	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₂₉ H ₅₇ O ₁₁ P	595,3600	2,602
597,3065	[M+K] ⁺	C ₂₉ H ₅₀ O ₁₀	597,3030	4,962
605,3404	[M+Na] ⁺	C ₂₈ H ₅₅ O ₁₀ P	605,3419	-3,445
615,4942	[M+Na] ⁺	C ₃₇ H ₆₈ O ₅	615,4953	-2,821
617,4595	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄₁ H ₆₂ O ₅	617,4564	4,977
617,5108	[M+Na] ⁺	C ₃₇ H ₇₀ O ₅	617,5115	-1,128
618,4632	[M+NH ₄] ⁺	C ₃₂ H ₆₁ N ₂ O ₆ P	618,4605	4,285
621,3352	[M+Na] ⁺	C ₂₈ H ₅₅ O ₁₁ P	621,3368	-3,557
621,3959	[M+2Na-H] ⁺	C ₃₀ H ₆₁ N ₂ O ₆ P	621,3978	-3,202
639,4944	[M+2Na-H] ⁺	C ₃₇ H ₇₀ O ₅	639,4934	1,500
643,5270	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄₁ H ₇₂ O ₆	643,5296	-4,012

Cont/ Tabela 3

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
644,5271	[M+NH ₄] ⁺	C ₄₀ H ₆₆ O ₅	644,5248	3,552
647,5570	[M+Na] ⁺	C ₃₉ H ₇₆ O ₅	647,5584	-2,249
655,3819	[M+K] ⁺	C ₃₃ H ₆₀ O ₁₀	655,3818	0,219
656,3483	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₄₅ N ₁₁ O ₉	656,3474	1,313
665,4220	[M+Na] ⁺	C ₃₅ H ₆₂ O ₁₀	665,4235	-2,148
667,4535	[M+H] ⁺	C ₃₄ H ₆₇ O ₁₀ P	667,4544	-1,440
671,5728	[M+Na] ⁺	C ₄₅ H ₇₆ O ₂	671,5737	-1,419
672,4204	[M+Na] ⁺	C ₃₃ H ₆₄ NO ₉ P	672,4210	-0,892
673,5881	[M+Na] ⁺	C ₄₅ H ₇₈ O ₂	673,5894	-1,934
682,5233	[M+Na] ⁺	C ₃₇ H ₇₃ NO ₈	682,5228	0,675
685,4345	[M+K] ⁺	C ₃₄ H ₆₇ N ₂ O ₇ P	685,4311	4,133
			M ⁺ 1374,9554	
687,4793	[M+2H] ²⁺	C ₇₅ H ₁₃₈ O ₁₇ P ₂	M ²⁺ 687,4777	2,328
687,5521	[M+NH ₄] ⁺	C ₃₈ H ₇₁ NO ₈	687,5517	0,446
689,5670	[M+NH ₄] ⁺	C ₃₈ H ₇₃ NO ₈	689,5674	-0,527
691,4172	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₃₅ H ₆₅ O ₁₂ P	691,4180	-1,223
692,4201	[M+Na] ⁺	C ₃₂ H ₆₃ NO ₁₃	692,4191	1,384
697,5873	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄₅ H ₈₀ O ₂	697,5864	0,520
698,3982	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₃₂ H ₆₄ NO ₁₀ P	698,3974	0,473
703,4522	[M+Na] ⁺	C ₃₅ H ₆₉ O ₁₀ P	703,4520	0,333
703,5468	[M+NH ₄] ⁺	C ₃₈ H ₇₁ NO ₉	703,5467	0,130
705,4328	[M+H] ⁺	C ₃₆ H ₆₅ O ₁₁ P	705,4337	-1,227
707,3898	[M+K] ⁺	C ₃₃ H ₆₅ O ₁₁ P	707,3896	0,399
708,3605	[M+K] ⁺	C ₃₅ H ₆₀ NO ₉ P	708,3637	-4,443
709,4665	[M+H] ⁺	C ₃₆ H ₆₉ O ₁₁ P	709,4650	2,191

Cont/ Tabela 3

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
710,5911	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄₂ H ₈₁ NO ₈	710,5929	-2,547
714,5815	[M+H] ⁺	C ₄₁ H ₈₀ NO ₆ P	714,5796	2,656
715,5068	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄₃ H ₇₃ O ₇ P	715,5061	1,058
719,4478	[M+Na] ⁺	C ₃₅ H ₆₉ O ₁₁ P	719,4469	1,139
719,5588	[M+H] ⁺	C ₄₀ H ₇₉ O ₈ P	719,5585	0,428
720,4108	[M+NH ₄] ⁺	C ₃₅ H ₅₉ O ₁₂ P	720,4082	3,652
721,5726	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₃ H ₈₀ O ₅	721,5717	1,301
722,3875	[M+K] ⁺	C ₃₃ H ₆₅ NO ₁₁ S	722,3909	-4,818
725,5210	[M+Na] ⁺	C ₃₈ H ₇₅ N ₂ O ₇ P	725,5204	0,882
726,5270	[M+K] ⁺	C ₃₉ H ₇₇ NO ₈	726,5280	-1,482
727,3652	[M+2Na-H] ⁺	C ₃₃ H ₆₂ O ₁₂ S	727,3673	-2,947
			M ⁺ 1453,0024	
727,5103	[M+2H] ²⁺	C ₈₁ H ₁₄₆ O ₁₇ P ₂	M ²⁺ 728,5079	1,829
728,4571	[M+2Na-H] ⁺	C ₃₈ H ₇₀ NO ₇ P	728,4596	-4,195
728,5196	[M+Na] ⁺	C ₃₈ H ₇₆ NO ₈ P	728,5195	-0,639
729,5228	[M+K] ⁺	C ₃₉ H ₇₉ O ₇	729,5189	4,524
730,3751	[M+H] ⁺	C ₃₂ H ₆₀ NO ₁₅ P	730,3773	-3,030
733,4654	[M+H] ⁺	C ₃₈ H ₆₉ O ₁₁ P	733,4650	0,537
736,6075	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄₄ H ₈₃ NO ₈	736,6085	-1,439
737,5446	[M+NH ₄] ⁺	C ₃₈ H ₇₄ NO ₉ P	737,5439	0,902
737,5691	[M+H] ⁺	C ₄₀ H ₈₁ O ₉ P	737,5690	0,058
738,6229	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄₄ H ₈₅ NO ₈	738,6242	-1,733
739,6265	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄₈ H ₈₄ O ₆	739,6235	4,134
745,5934	[M+NH ₄] ⁺	C ₄₁ H ₇₇ NO ₉	745,5936	-0,293
750,6226	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄₅ H ₈₅ NO ₈	750,6242	-2,105

Cont/ Tabela 3

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
752,3871	[M+K] ⁺	C ₃₇ H ₆₄ NO ₁₀ P	752,3899	-4,681
752,6383	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄₅ H ₈₇ NO ₈	752,6398	-2,087
753,4929	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₀	753,4936	-0,863
753,6420	[M+H] ⁺	C ₄₉ H ₈₆ O ₆	753,6391	3,872
756,5501	[M+Na] ⁺	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	756,5513	-1,607
759,5159	[M+H] ⁺	C ₄₁ H ₇₅ O ₁₀ P	759,5170	-1,437
759,5499	[M+Na] ⁺	C ₄₀ H ₈₁ O ₉ P	759,5510	-1,385
760,5844	[M+H] ⁺	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	760,5850	-0,896
761,5666	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₅ H ₈₀ O ₆	761,5666	-0,021
764,6384	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄₆ H ₈₇ NO ₈	764,6398	-1,858
767,5789	[M+H] ⁺	C ₄₁ H ₈₃ O ₁₀ P	767,5796	-0,927
778,6141	[M+Na] ⁺	C ₄₄ H ₈₅ NO ₈	778,6167	-3,352
778,6539	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄₇ H ₈₉ NO ₈	778,6555	-2,030
780,5282	[M+H] ⁺	C ₄₀ H ₇₇ NO ₁₁ S	780,5290	-1,037
780,5500	[M+Na] ⁺	C ₄₂ H ₈₀ NO ₈ P	780,5513	-1,750
781,5951	[M+H] ⁺	C ₄₂ H ₈₅ O ₁₀ P	781,5953	-0,207
781,6729	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₅₁ H ₉₀ O ₆	781,6704	3,221
782,5653	[M+Na] ⁺	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	782,5670	-2,193
783,5747	[M+K] ⁺	C ₄₂ H ₈₅ N ₂ O ₆ P	783,5776	-3,731
785,5669	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₇ H ₈₀ O ₆	785,5666	0,311
786,5680	[M+H] ⁺	C ₄₃ H ₈₀ NO ₉ P	786,5643	4,747
789,5874	[M+H] ⁺	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₀	789,5875	-0,102
790,6542	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄₈ H ₈₉ NO ₈	790,6555	-1,9632
793,5454	[M+NH ₄] ⁺	C ₄₀ H ₇₃ NO ₁₃	793,5420	4,276
793,5945	[M+H] ⁺	C ₄₃ H ₈₅ O ₁₀ P	793,5953	-0,985

Cont/ Tabela 3

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
793,6732	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₅₂ H ₉₀ O ₆	793,6704	3,563
801,5848	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₃ H ₈₅ N ₂ O ₆ P	801,5856	-1,074
802,4527	[M+K] ⁺	C ₃₉ H ₇₃ NO ₁₁ SK	802,4535	-0,998
803,5414	[M+Na] ⁺	C ₄₁ H ₈₁ O ₁₁ P	803,5408	0,569
806,5533	[M+H] ⁺	C ₄₂ H ₈₀ NO ₁₁ P	806,5541	-0,973
806,5666	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₂ H ₈₄ NO ₈ P	806,5694	2,656
807,5578	[M+NH ₄] ⁺	C ₄₁ H ₇₅ NO ₁₃	807,5576	,0202
807,6884	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₅₃ H ₉₂ O ₆	807,6861	2,931
808,5826	[M+Na] ⁺	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	808,5826	-0,082
809,5727	[M+H] ⁺	C ₄₆ H ₈₁ O ₉ P	809,5690	4,451
810,5945	[M+Na] ⁺	C ₄₄ H ₈₆ NO ₈ P	810,5983	-4,708
812,6220	[M+NH ₄] ⁺	C ₄₆ H ₈₂ O ₁₀	812,6246	-3,278
812,6464	[M+Na] ⁺	C ₄₅ H ₉₂ NO ₇ P	812,6503	-4,875
813,5987	[M+Na] ⁺	C ₄₄ H ₈₇ O ₉ P	813,5979	0,920
814,5559	[M+Na] ⁺	C ₄₂ H ₈₂ NO ₁₀ P	814,5568	-1,148
815,5627	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₄ H ₈₂ O ₁₀	815,5619	0,963
816,5872	[M+K] ⁺	C ₄₃ H ₈₈ NO ₈ P	816,5879	-0,861
817,5796	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₃ H ₈₅ N ₂ O ₇ P	817,5806	-1,132
818,4256	[M+NH ₄] ⁺	C ₃₆ H ₆₆ O ₁₅ P ₂	818,4215	5,059
819,5165	[M+H] ⁺	C ₄₆ H ₇₅ O ₁₀ P	819,5170	-0,673
819,5996	[M+H] ⁺	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₀	819,5980	1,934
820,5163	[M+H] ⁺	C ₄₅ H ₇₄ NO ₁₀ P	820,5123	4,899
821,5176	[M+Na] ⁺	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₀	821,5174	0,268
821,6601	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₉ H ₉₂ O ₆	821,6605	-0,482
825,5644	[M+H] ⁺	C ₄₆ H ₈₁ O ₁₀ P	825,5640	0,483

Cont/ Tabela 3

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
827,5532	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₅ H ₈₃ O ₈ P	827,5537	-0,522
303	[M+Na] ⁺	C ₄₂ H ₈₀ NO ₁₁ P	828,5361	-1,810
831,5698	[M+NH ₄] ⁺	C ₄₀ H ₈₀ NO ₁₃ P	831,5705	-0,798
832,4516	[M+K] ⁺	C ₄₃ H ₇₂ NO ₁₁ P	832,4525	-1,084
832,5733	[M+H] ⁺	C ₄₄ H ₈₂ NO ₁₁ P	832,5698	4,282
833,5520	[M+Na] ⁺	C ₄₂ H ₈₃ O ₁₂ P	833,5514	0,713
834,5575	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₃ H ₈₄ NO ₉ P	834,5565	-2,487
837,6222	[M+H] ⁺	C ₄₅ H ₈₉ O ₁₁ P	837,6215	0,804
838,6387	[M+NH ₄] ⁺	C ₄₈ H ₈₄ O ₁₀	838,6402	-1,829
839,6415	[M+K] ⁺	C ₄₆ H ₉₃ N ₂ O ₆ P	839,6402	1,461
840,4396	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₂ H ₇₀ NO ₁₁ P	840,4398	-0,231
841,6657	[M+Na] ⁺	C ₄₇ H ₉₅ O ₈ P	841,6656	0,110
843,5949	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₆ H ₈₆ O ₁₀	843,5932	2,022
844,5963	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄₆ H ₈₇ NO ₁₁ S	844,5966	-0,385
845,6110	[M+Na] ⁺	C ₄₈ H ₈₆ O ₁₀	845,6113	-0,284
846,6140	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₄₆ H ₈₉ NO ₁₁ S	846,6123	1,955
849,6936	[M+H] ⁺	C ₄₈ H ₉₇ O ₉ P	849,6942	-0,821
850,6998	[M+Na] ⁺	C ₄₉ H ₉₈ NO ₆ P	850,7023	-2,947
854,4644	[M+Na] ⁺	C ₃₈ H ₇₄ NO ₁₆ P	854,4637	0,804
857,5701	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₅₀ H ₈₃ O ₁₀ P	857,5690	1,216
859,6253	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₇ H ₉₀ O ₁₀	859,6245	0,879
860,5710	[M+2Na-H] ⁺	C ₄₅ H ₈₆ NO ₉ P	860,5751	-4,852
862,5550	[M+Na] ⁺	C ₄₆ H ₈₂ NO ₁₀ P	862,5568	-2,116
865,6684	[M+H] ⁺	C ₅₁ H ₉₃ O ₈	865,6680	0,401
881,7548	[M+NH ₄] ⁺	C ₅₂ H ₉₇ NO ₈	881,7552	-0,481

Cont/ Tabela 3

Massa Experimental	Espécie iônica	Fórmula molecular	Massa Teórica	Erro (ppm)
892,6868	[M+NH ₄] ⁺	C ₅₂ H ₉₀ O ₁₀	892,6872	-0,464
906,4774	[M+K] ⁺	C ₄₂ H ₇₈ NO ₁₅ P	906,4740	3,734
907,4810	[M+K] ⁺	C ₄₆ H ₇₆ O ₁₅	907,4815	-0,595
909,6486	[M+H] ⁺	C ₅₅ H ₈₈ O ₁₀	909,6450	4,029
910,7197	[M+Na] ⁺	C ₅₁ H ₁₀₂ NO ₈ P	910,7235	-4,158
965,7032	[M+H] ⁺	C ₅₂ H ₁₀₁ O ₁₃ P	965,7052	-2,046
983,7142	[M+H] ⁺	C ₅₉ H ₉₉ O ₉ P	983,7099	4,333
1075,6040	[M+K] ⁺	C ₅₃ H ₉₈ O ₁₅ P ₂	1075,6012	2,526
1157,8926	[M+H] ⁺	C ₆₆ H ₁₂₅ O ₁₃ P	1157,8930	-0,325

Tabela 4 - Metabólitos identificados através dos bancos de dados *Metlin*, *LipidMaps* e *Metabolomics Workbench* (ionização pelo modo positivo por DESI-MS).

Massa Experimental	Metabólito
145,1224	MG(13:0)
162,0501	Valina
163,9779	Taurina
175,1115	WE(12:3)
203,0527	Hexose
227,2004	WE(14:1)
230,2473	Sph(m14:0)
269,1471	peptídeo
279,2314	WE(18:3)
289,1773	Tetranor 12-HETE
291,0699	Iosina
291,2298	WE(17:1)

Cont/ Tabela 4

Massa Experimental	Metabólito
293,1359	Dímero de Histidina
301,1404	alfa-tocoferonolactona
305,1572	peptídeo
313,2135	LPA(32:5)
315,1561	peptídeo
327,2274	WE(18:1)
370,2018	NAT(15:1)
371,2190	PG(29:0(OH))
373,1979	MGDG(31:8)
386,2654	Cer(d20:1)
389,2504	Peptídeo
391,2084	Peptídeo
395,2149	MG(18:4)
	LPI(32:0)
399,2780	PI(O-32:0)
400,3419	CAR(16:0)
401,266	MG(20:4)
410,2739	Peptídeo
411,2498	LPA(16:0)
413,2258	Peptídeo
423,1989	Peptídeo
426,2172	Peptídeo
426,3579	CAR(18:1)
428,2297	Peptídeo
429,2007	Peptídeo

Cont/ Tabela 4

Massa Experimental	Metabólito
429,2968	MG(22:4)
429,3721	WE(27:2)
430,2068	Peptídeo PA(44:1)
430,3124	PA(O-44:2(OH)) PA(P-44:1(OH))
431,3486	CAR(16:1(OH))
432,2250	Peptídeo
433,2833	LisoSM(d14:0)
435,2354	Peptídeo
437,2359	Peptídeo
437,3243	Peptídeo
441,3201	Peptídeo
442,1919	LPE(12:0)
443,2037	PG(6:0/6:0)
443,2398	LPG(13:0)
443,3021	TG(52:11) PG(44:3)
443,3336	PG(O-44:4(OH)) PG(P-44:3(OH))
444,4192	NAE(28:3)
445,2918	DG(20:0)
447,2716	Peptídeo
450,3577	CAR(20:3)
453,2088	Peptídeo

Cont/ Tabela 4

Massa Experimental	Metabólito
	PI(36:1)
455,2762	PI(O-36:2(OH)) PI(P-36:1(OH)) MGDG(43:10)
457,3289	MG(24:4)
463,2668	Peptídeo
464,3056	DGDG(35:4)
465,2975	LPA(20:1)
467,2254	Peptídeo
469,2923	LPG(P-16:0)
471,2876	MG(24:5)
473,3449	Peptídeo
474,3268	Peptídeo
479,2609	LisoSM(d16:2)
485,2677	LPA(22:5)
485,3244	Peptídeo
489,2972	LPA(20:0)
	LPC(14:0)
490,2901	LPE(17:0)
	PC(O-14:0)
499,3024	LPG(17:0)
503,1929	Peptídeo
503,3336	Peptídeo
507,3659	Peptídeo
517,3126	Peptídeo

Cont/ Tabela 4

Massa Experimental	Metabólito
517,3496	Peptídeo
	LPC(16:0)
518,3220	LPE(19:0)
	PC(O-16:0)
519,2921	Peptídeo
525,2863	Peptídeo
533,2802	Peptídeo
533,3065	Peptídeo
533,3448	Peptídeo
533,3697	LisoSM(t20:0)
534,2820	LPS(17:0)
	fosfoserine
534,3196	PS(20:1(11Z)/0:0)
541,2613	L-Lisil-L-seril-L-serilglicil-L-tirosine
542,3213	LPC(18:2)
548,3430	Peptídeo
551,3337	PA(24:1(OH))
553,3881	DG(30:5)
561,3387	SHexSph(d18:0)
	CerP(t26:0)
	LPC(18:0)
562,3254	LPE(21:0)
	PC(O-18:0)
	NAT(28:4)
567,3279	LPI(P-18:0)

Cont/ Tabela 4

Massa Experimental	Metabólito
579,4383	PA(O-28:0)
595,3621	LPI(P-20:0)
	PG(23:0(OH))
597,3065	MGDG(20:2)
605,3404	PG(22:0)
615,4942	DG(34:2)
617,4595	DG(38:9)
617,5108	DG(34:1)
618,4632	PE-Cer(d30:3)
621,3352	PG(22:0(OH))
621,3959	PE-Cer(d28:1)
639,4944	DG(34:1)
643,5270	TG(38:3)
644,5271	DG(37:6)
647,5570	DG(36:0)
	TG(O-36:0)
655,3819	MGDG(24:1)
656,3483	Glicilglicilglicil-L-prolil-N-metilglicilglicilglicilglicil-
	L-lisinamida
665,4220	MGDG(26:2)
667,4535	PG(28:0)
	PG(P-28:0(OH))
671,5728	CE(18:2)
	WE(45:7)

Cont/ Tabela 4

Massa Experimental	Metabólito
	LPS(27:1)
672,4204	PC(25:1(OH))
	PE(28:1(OH))
673,5881	CE(18:1)
	WE(45:6)
682,5233	HexCer(d31:0)
685,4345	PE-Cer(t32:2)
687,4793	CL(66:4)
687,5521	HexCer(d32:2)
689,5670	HexCer(d32:1)
691,4172	LPI(26:2)
692,4201	LacSph(t20:0)
	CE(18:0)
697,5873	WE(45:5)
698,3982	PS(O-26:0(OH))
	PG(29:0)
703,4522	PG(P-29:0(OH))
703,5468	HexCer(t32:2)
705,4328	PG(30:3(OH))
707,3898	PG(27:0(OH))
708,3605	PE(30:5(OH))
709,4665	PG(30:1(OH))
710,5911	HexCer(d36:1)
714,5815	CerP(d41:2)
715,5068	PA(P-40:6)

Cont/ Tabela 4

Massa Experimental	Metabólito
719,4478	PG(29:0(OH)) PA(37:0)
719,5588	PA(O-37:1(OH)) PA(P-37:0(OH))
720,4108	LPI(26:5) DG(40:2)
721,5726	TG(P-40:1)
722,3875	SHexCer(d27:0)
725,5210	PE-Cer(t36:2)
726,5270	HexCer(d33:0)
727,3652	SQDG(24:0)
727,5103	CL(72:6)
728,4571	LPC(30:4) PC(30:0) PC(O-30:1(OH)) PC(P-30:0(OH))
728,5196	PE(33:0) PE(O-33:1(OH)) PE(P-33:0(OH))
729,5228	PA(O-36:0)
730,3751	MIPC(d20:2)
733,4654	PG(32:3(OH))
736,6075	HexCer(d38:2)

Cont/ Tabela 4

Massa Experimental	Metabólito
	LPS(32:1)
	PC(30:1(OH))
737,5446	PE(33:1(OH))
	PS(O-32:1)
	PS(P-32:0)
737,5691	LPG(34:0)
	PG(O-34:0)
738,6229	HexCer(d38:1)
739,6265	TG(45:4)
745,5934	HexCer(t35:2)
750,6226	HexCer(d39:2)
752,3871	PS(31:4)
752,6383	HexCer(d39:1)
753,4929	MGDG(36:8)
753,6420	TG(46:4)
	PC(32:0)
	PC(O-32:1(OH))
	PC(P-32:0(OH))
756,5501	PE(35:0)
	PE(O-35:1(OH))
	PE(P-35:0(OH))
759,5159	PG(35:3)
	LPG(34:0)
759,5499	PG(O-34:0)

Cont/ Tabela 4

Massa Experimental	Metabólito
	PC(34:1)
	PC(O-34:2(OH))
760,5844	PC(P-34:1(OH))
	PE(37:1)
	PE(O-37:2(OH))
	PE(P-37:1(OH))
761,5666	TG(42:3)
764,6384	HexCer(d40:2)
767,5789	PG(O-35:0(OH))
778,6141	HexCer(d38:1)
778,6539	HexCer(d41:2)
780,5282	SHexCer(d34:1)
	PC(34:2)
	PC(O-34:3(OH))
780,5500	PC(P-34:2(OH))
	PE(37:2)
	PE(P-37:2(OH))
781,5951	PG(O-36:0(OH))
781,6729	TG(48:4)
	PC(34:1)
	PC(O-34:2(OH))
	PC(P-34:1(OH))
782,5653	PE(37:1)
	PE(O-37:2(OH))
	PE(P-37:1(OH))

Cont/ Tabela 4

Massa Experimental	Metabólito
783,5747	PE-Cer(d40:1) SM(d37:1)
785,5669	TG(44:5) PC(35:3(OH))
786,5680	PE(38:3(OH)) PS(P-37:2)
789,5874	MGDG(38:4)
790,6542	HexCer(d42:3)
793,5454	LacCer(d28:2)
793,5945	PG(37:0)
793,6732	TG(49:5)
801,5848	PE-Cer(d41:2) SM(d38:2)
802,4527	SHexCer(d33:2)
803,5414	PG(35:0(OH)) PI-Cer(d36:2)
806,5533	PS(36:1(OH)) SHexCer(d36:2) LacCer(d30:1) PC(34:0)
806,5666	PC(O-34:1(OH)) PC(P-34:0(OH)) PE(37:0) PE(O-37:1(OH)) PE(P-37:0(OH))

Cont/ Tabela 4

Massa Experimental	Metabólito
807,5578	LacCer(d29:2)
807,6884	TG(50:5) PC(36:2)
808,5826	PC(O-36:3(OH)) PC(P-36:2(OH)) PE(39:2) PA(43:5(OH))
809,5727	PG(O-40:6) PG(P-40:5) PC(36:1)
810,5945	PC(O-36:2(OH)) PC(P-36:1(OH)) PE(39:1)
812,6220	MGDG(37:3)
812,6464	PC(O-37:0) PE(O-40:0) PA(41:0(OH))
813,5987	PG(O-38:1) PG(P-38:0)
814,5559	PS(36:0)
815,5627	MGDG(35:1)
816,5872	PC(O-35:0(OH)) PE(O-38:0(OH))
817,5796	SM(t38:2)
818,4256	LPI(27:3)

Cont/ Tabela 4

Massa Experimental	Metabólito
819,5165	PG(40:8)
819,5996	MGDG(39:5)
820,5163	PS(39:7)
821,5176	MGDG(38:8)
821,6601	TG(46:1)
	PG(40:5)
825,5644	PG(O-40:6(OH))
	PG(P-40:5(OH))
	PA(42:3)
827,5532	PA(O-42:4(OH))
	PA(P-42:3(OH))
	PI-Cer(d36:2)
828,5346	PS(36:1(OH))
831,5698	PI-Cer(t34:0(OH))
832,4516	PS(37:6)
	PI-Cer(d38:3)
832,5733	PS(38:2(OH))
	LacCer(d32:2)
	LPI(33:0)
833,5520	PI(O-33:0)
	PC(35:1(OH))
	PE(38:1(OH))
834,5575	PS(O-37:1)
	PS(P-37:0)
837,6222	PG(39:0(OH))

Cont/ Tabela 4

Massa Experimental	Metabólito
838,6387	MGDG(39:4)
839,6415	PE-Cer(d44:1) SM(d41:1)
840,4396	PS(36:6(OH))
841,6657	PA(O-44:0(OH))
843,5949	MGDG(37:1)
844,5963	
845,6110	MGDG(39:3)
846,6140	SHexCer(d40:1)
849,6936	PG(O-42:0)
850,6998	CerP(d49:1)
854,4644	MIPC(d26:0)
857,5701	PG(44:8)
859,6253	MGDG(38:0) PC(37:2(OH))
860,5710	PE(40:2(OH)) PS(P-39:1) PS(P-40:4(OH))
862,5550	PS(O-40:5(OH)) PS(40:4) PA(48:4)
865,6684	PA(O-48:5(OH)) PA(P-48:4(OH))
881,7548	HexCer(d46:3)
892,6868	MGDG(43:5)

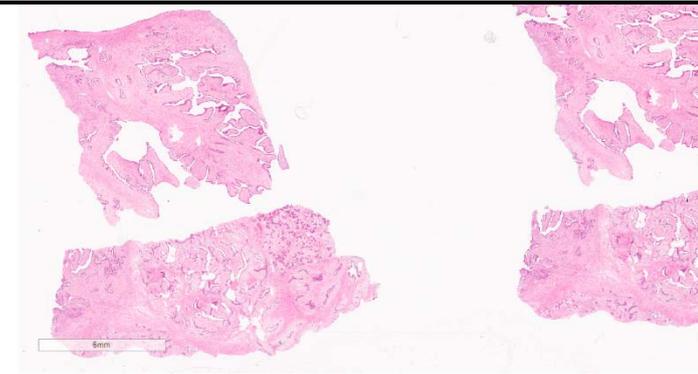
Cont/ Tabela 4

Massa Experimental	Metabólito
906,4774	MIPC(m30:2)
907,4810	DGDG(31:5)
909,6486	MGDG(46:9)
910,7197	PE(46:0)
	PI(43:0)
965,7032	PI(O-43:1(OH))
	PI(P-43:0(OH))
983,7142	PA(56:9(OH))
1075,6040	PIP(O-44:4)
	PIP(P-44:3)
1157,8926	PI(57:2)

Apêndice 2 - Fotos de cortes histológicos corados em H&E, provenientes das peças cirúrgicas dos Tumores Phyllodes que tinham tecido congelado no biobanco do A.C.Camargo Cancer Center e que foram utilizados no DESI-MS

Amostra S5

TUMOR *PHYLLODES* BENIGNO



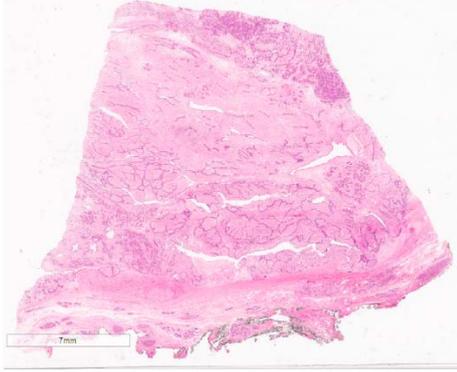
Menor aumento (6mm)



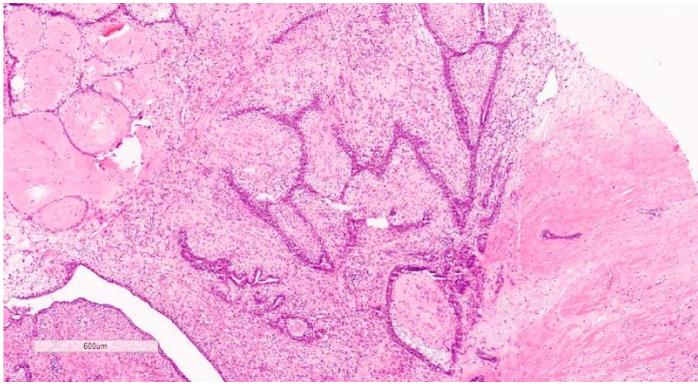
Maior aumento (600 micrômetros)

Amostra S11

TUMOR *PHYLLODES* BORDERLINE



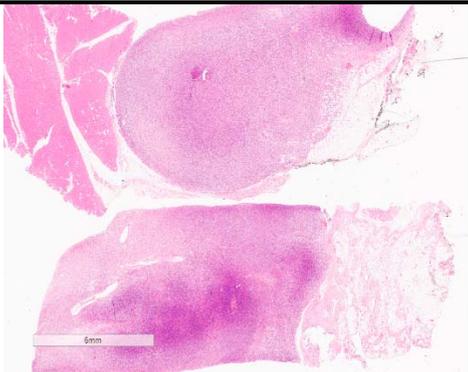
Menor aumento (7mm)



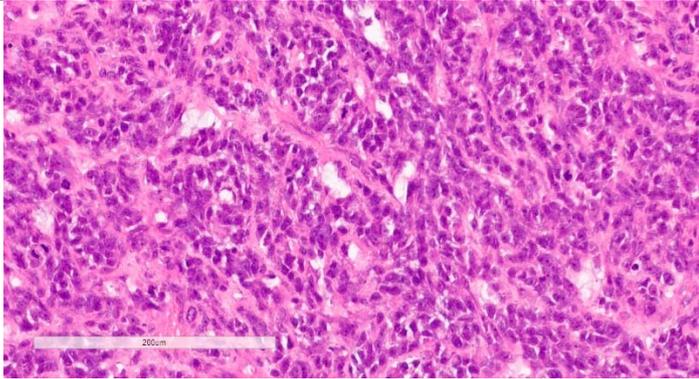
Maior aumento (600 micrômetros)

Amostra S23

TUMOR *PHYLLODES* MALIGNO



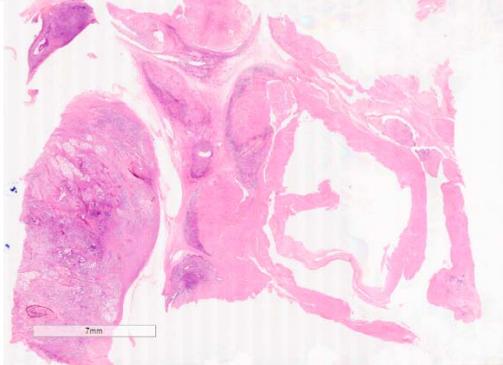
Menor aumento (6mm)



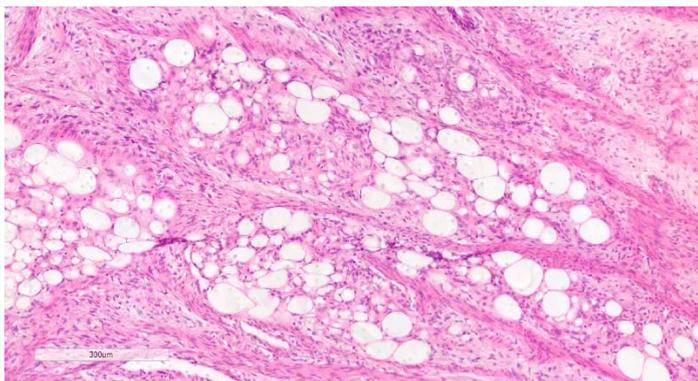
Maior aumento (200 micrômetros)

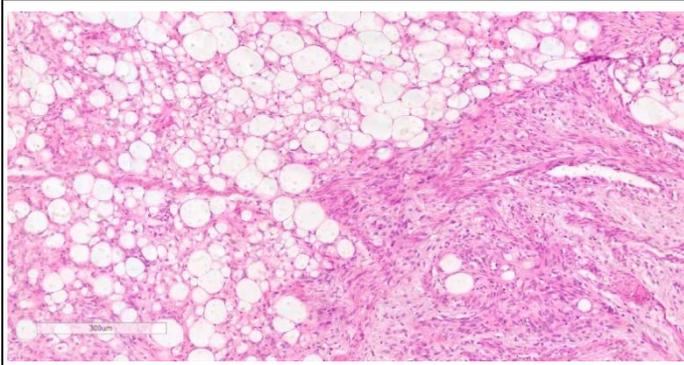
Amostra S22

TUMOR *PHYLLODES* MALIGNO - elemento heterólogo



Menor aumento (7mm)





Maior aumento (300 micrômetros)

Lipossarcoma (elemento heterólogo)

Apêndice 3 - Tumores *Phyllodes* no A.C.Camargo Cancer Center – levantamento em 19 anos

RESUMO

O TP é uma neoplasia mamária pouco estudada e rara. Afeta mulheres em média de 40 a 50 anos e é classificada como TP benigno, *borderline* e maligno com base nos protocolos da Organização Mundial da Saúde.

Realizamos um estudo retrospectivo de 144 tumores *Phyllodes* de 139 pacientes atendidas no A.C.Camargo Cancer Center, entre 1997 e 2016, para relatar a experiência sobre esse tumor raro em um centro brasileiro especializado em câncer. Este hospital possui um grande número desses tumores raros por ser um hospital quaternário e referência no tratamento do câncer no Brasil.

Definimos o perfil dos tumores de *Phyllodes* e dos pacientes com esses tumores nessa instituição a respeito da recorrência, metástase, sobrevida e presença de outros tumores, sejam benignos ou malignos, da mama ou de outros órgãos.

Nesses 19 anos, apenas 8 pacientes tiveram recidiva tumoral, 3 pacientes tiveram metástase e 3 pacientes morreram, mas apenas uma morreu devido a essa patologia. O *follow-up* médio foi de 76,8 meses. 75% das pacientes que apresentaram recidiva local, fizeram excisão local e 25% dos casos recidivados fizeram quadrantectomia. 9% das pacientes com TPM apresentaram metástase ao diagnóstico. A sobrevida livre de doença foi de 92% e a sobrevida global foi de 97% em 19 anos. 25% das pacientes que tiveram TP, apresentaram fibroadenoma antes, durante ou após o diagnóstico de TP. 14,5% dos pacientes com TP apresentaram outra neoplasia maligna.

Esse tumor apresenta taxas variadas de metástase e recorrência entre seus grupos, mas analisando as taxas de metástase, recorrência e sobrevida nesses 19 anos, observamos que nesse grande centro de tratamento de câncer, poucas pacientes apresentaram recorrência, metástase ou óbito devido a esta patologia.

INTRODUÇÃO

O tumor *Phyllodes* (TP) é um tumor mamário raro. Esses tumores são pouco estudados e acometem mulheres entre 40 e 50 anos em média. Quando foi descrito por Johannes Müller em 1838, foi chamado de *Cystossarcoma Phyllodes* (FIKS 1981), mas hoje em dia esses tumores são denominados tumores *Phyllodes* (TPs) e são classificados em benigno (TPB), *borderline* (TPBo) e maligno (TPM) com base no protocolo da Organização Mundial da Saúde, de acordo com algumas características como atividade mitótica, atipia, celularidade estromal, supercrescimento estromal e aspecto das margens em que os TPB têm 0-4 mitoses por 10 campos de grande aumento, margens bem circunscritas, baixa celularidade estromal, atipia mínima e ausência de supercrescimento estromal; TPBo tem 5-9 mitoses por 10 campos de grande aumento, zona de invasão microscópica ao redor das margens do tumor, celularidade estromal moderada, atipia moderada e pode ou não apresentar supercrescimento estromal; os TPM têm mais de 10 mitoses por 10 campos de grande aumento, margens infiltrativas, alta celularidade estromal, atipia celular e supercrescimento estromal (LAKHANI, S, ELLIS. I, SCHNITT, S, TAN, P, VAN DE VIJVER 2012).

O diagnóstico padrão-ouro é o exame anatomopatológico, mas, em alguns casos, as características microscópicas se sobrepõem, como no caso do TPB que pode se assemelhar ao fibroadenoma celular ou fibroadenoma juvenil e no caso do TPM, pode assemelhar-se ao TPBo ou sarcoma primário da mama (TAN et al. 2016). Nesses casos, o diagnóstico pode se tornar difícil devido à falta de critérios histológicos bem demarcados para classificação desses tumores. O diagnóstico assertivo do TP nas *core biopsies* apresenta maior dificuldade diagnóstica devido à heterogeneidade tumoral; por exemplo, uma área com aspecto foliáceo e baixa celularidade estromal sendo biopsiada, haverá uma impressão de que se trata de um tumor benigno, quando na verdade em outra área não representada pela *core biopsy* podem haver áreas com supercrescimento estromal, atipia intensa e elementos

heterólogos, o que levaria ao diagnóstico de um TPM (WIRATKAPUN et al. 2014).

O consenso dos TPs de 2016 (TAN et al. 2016) mostra que a diferenciação entre fibroadenoma celular e TPB não é muito importante devido às taxas semelhantes de recorrência; portanto o termo neoplasia fibroepitelial benigna pode ser usado quando não é possível fazer essa distinção diagnóstica. Esse consenso reafirmou os critérios de classificação dos tumores de *Phyllodes* usados pela Organização Mundial da Saúde de 2012 (LAKHANI, S, ELLIS. I, SCHNITT, S, TAN, P, VAN DE VIJVER 2012), então é importante diferenciar com precisão esses tumores: TPB, TPBo e TPM; principalmente porque o maligno deve ser tratado com maior cautela, uma vez que esses tumores conferem ao paciente um risco, embora pouco frequente, de metástase e óbito (TAN et al. 2016). No entanto, a margem cirúrgica ideal para o TP permanece em discussão, sendo importante considerar o tamanho do tumor, o tipo de tumor e o resultado cosmético (TAN et al. 2016).

Neste estudo retrospectivo, realizado em um dos maiores centros de câncer da América Latina, com 65 anos de experiência em cirurgia oncológica, fornecemos informações histopatológicas relacionadas aos TPs e ao *follow-up* dessas pacientes ao longo de 19 anos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Revisamos retrospectivamente 144 TPs entre 1997 e 2016. Foram incluídos neste estudo 139 pacientes com TPs diagnosticados e operados no A.C.Camargo Cancer Center nestes 19 anos. O número de tumores é maior que o número de pacientes, pois algumas pacientes apresentaram dois ou três tumores na mesma mama, ou na mama contralateral. Foram excluídos os pacientes que fizeram apenas a biópsia, mas não realizaram a cirurgia neste Cancer Center. Após a cirurgia, as peças cirúrgicas foram encaminhadas para o laboratório de anatomia patológica do mesmo Cancer Center, onde foram analisados por um patologista especializado. Para esse estudo, outro patologista (MBDCL) revisou as lâminas a fim de confirmar o

diagnóstico previamente dado. Os dados clínicos foram obtidos a partir do prontuário eletrônico deste mesmo hospital.

Os dados coletados incluíram idade, lateralidade, cirurgia realizada (nodulectomia, quadrantectomia ou mastectomia), tamanho do tumor (cm) e tipo histológico (benigno, *borderline* ou maligno). Os tumores foram medidos pelo seu diâmetro transversal máximo no exame patológico macroscópico. Os dados de *follow-up* incluíram tempo, estado atual, sobrevida global, sobrevida livre de doença, incidência de recidiva local e doença metastática.

Os dados obtidos foram analisados no *software* estatístico SPSS. Para os dados relacionados ao paciente, foi utilizado o teste do qui-quadrado, o teste de log-rank e as curvas de sobrevida de Kaplan-Meier. Para os dados relacionados ao tumor, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Qui-quadrado.

RESULTADOS

144 TPs foram diagnosticados em 19 anos. Algumas pacientes apresentam dois ou três tumores na mesma mama ou na mama contralateral; por isso, o número de tumores é maior que o número de pacientes. A média de idade das pacientes foi de 41 anos. A paciente mais jovem apresentava 14 anos no momento do diagnóstico e a mais idosa, 82 anos (Figura A). Essa paciente mais jovem apresentou TPBo e a mais idosa apresentou TPB.

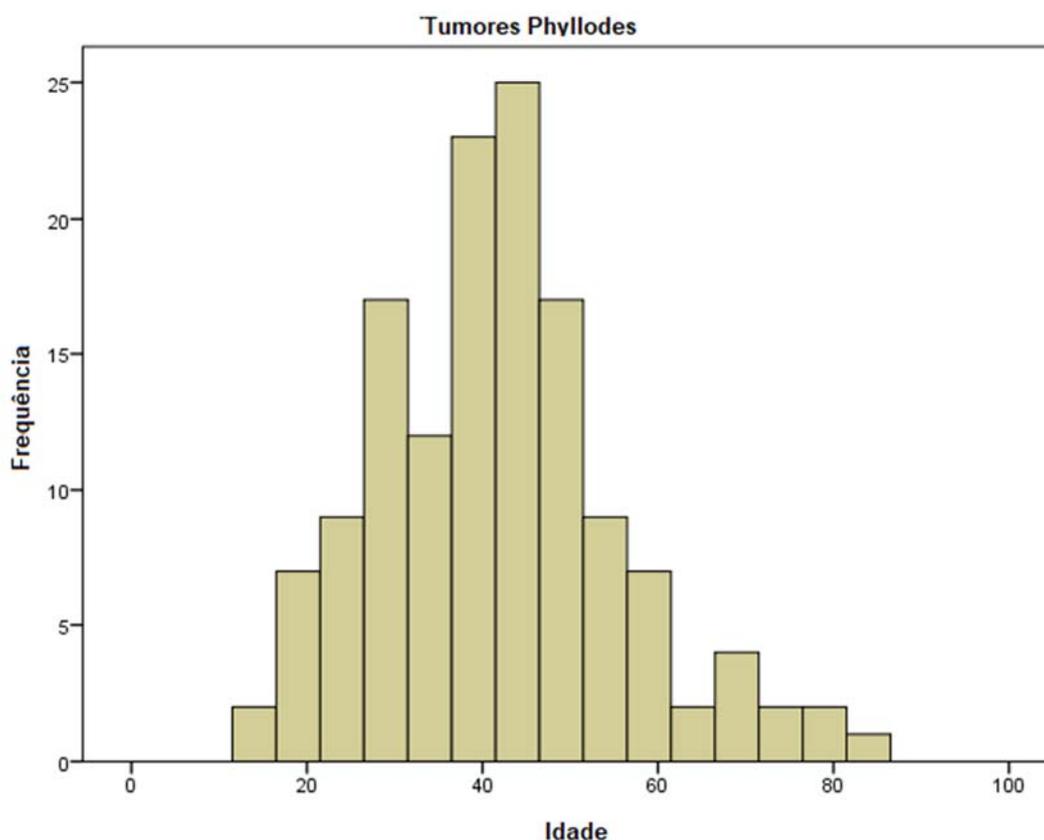


Figura A: Frequência dos TPs por idade neste estudo.

Os TPs foram classificados como benignos em 69,9% dos casos, *borderlines* em 14,7% e malignos em 15,4%. 2,9% dos pacientes apresentaram tumores bilaterais. Quanto maior o grau histológico, maior foi a idade média encontrada ao diagnóstico, 40 anos nos tumores *Phyllodes* benignos (TPBs), 48 anos nos tumores *Phyllodes borderlines* (TPBs) e 49 anos nos tumores *Phyllodes* malignos (TPMs) (Figura B).

Nodulesctomias foram realizadas em 53,5% (a maioria em TPBs - 64,8%), quadrantectomias em 33,3% (a maioria em TPBs - 68,7%) e mastectomias em 13,2% (a maioria em TPMs - 66,6%). O tamanho médio dos tumores foi de 3,2 cm (0,7 a 29 cm). Pacientes com tumores menores que 5 cm foram submetidos à nodulesctomia. (Tabela A). Não houve diferença estatística entre o tamanho do tumor relacionado ao grau histopatológico.

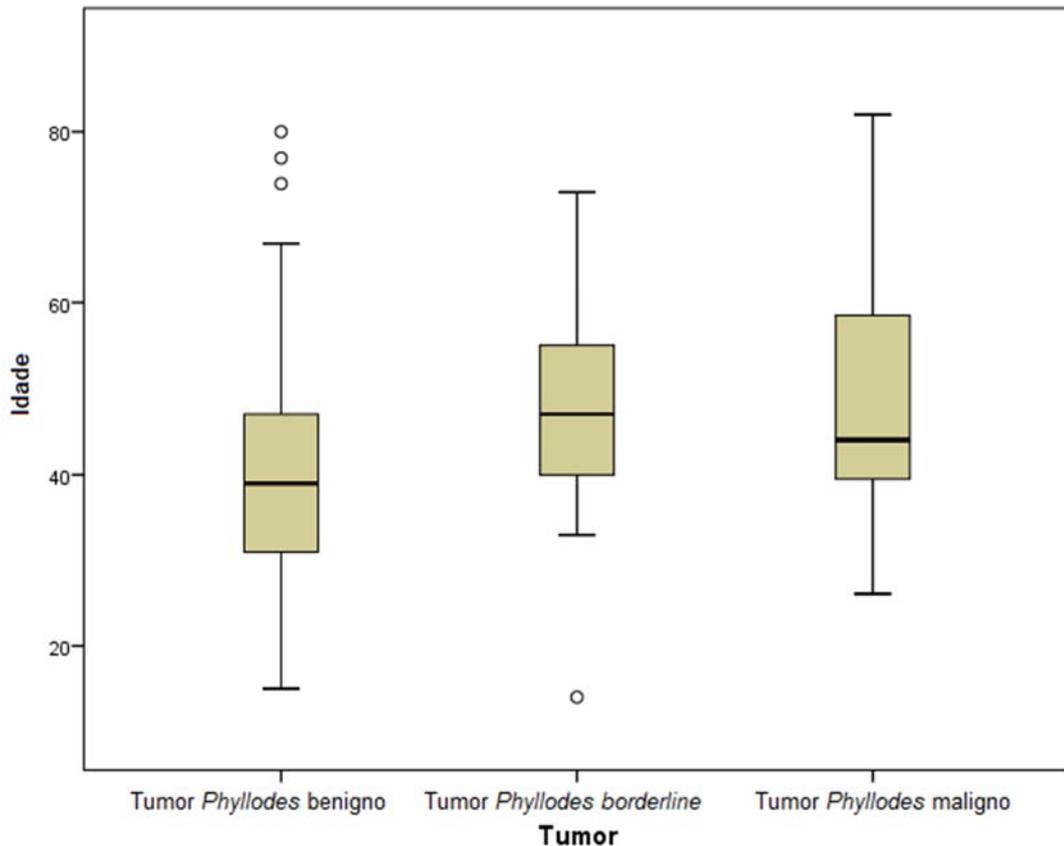


Figura B: Relação entre idade e grau histopatológico.

8% dos TPBs apresentaram recidiva local (7 pacientes) e 12,5% dos TPMs (1 paciente). 75% dos pacientes que apresentaram recidiva local realizaram nodulectomia e 25% dos casos recidivados realizaram quadrantectomia (Tabela B). 62,5% dos pacientes que apresentaram recidiva local tiveram margens livres e 37,5% margens comprometidas.

As recidivas locais ocorreram de 5 meses a 8 anos após a cirurgia. Neste estudo não foi encontrada significância estatística entre o tamanho do tumor e a recidiva local, nem relação entre o tamanho do tumor e o tempo até a recorrência local (Tabela B e C). Metade dos casos de recidiva local apresentaram fibroadenomas (FAs) associados. Os pacientes com dois ou três tumores na mesma mama ou na mama contralateral não apresentaram mais recidiva local do que os pacientes com apenas um tumor.

Tabela A: Relação entre o tratamento cirúrgico e o tipo histológico dos TPs, bem como com o tamanho do tumor. Não houve significância estatística. ($p > 0,05$)

TRATAMENTO CIRÚRGICO			
TIPO	NODULECTOMIA	QUADRANTECTOMIA	MASTECTOMIA
HISTOLÓGICO			
Benigno	59 (64,8%)	26 (28,5%)	6 (6,6%)
<i>Borderline</i>	4 (25,0%)	11 (68,7%)	1 (6,2%)
Maligno	3 (20,0%)	2 (13,3%)	10 (66,6%)
TAMANHO DO TUMOR (cm)			
<2	15 (65,2%)	8 (34,7%)	0 (0%)
2-5	41 (64,0%)	21 (32,8%)	2 (3,1%)
>5	11 (29,7%)	11 (29,7%)	15 (40,5%)

Tabela B: Relação entre recorrência e tipo histológico de TPs, bem como com o tamanho do tumor. Não houve significância estatística. ($p > 0,05$)

RECORRÊNCIA			
TIPO	NODULECTOMIA	QUADRANTECTOMIA	MASTECTOMIA
HISTOLÓGICO			
Benigno	5 (5,2%)	2 (2,1%)	0 (0%)
<i>Borderline</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Maligno	1 (4,7%)	0 (0%)	0 (0%)
TAMANHO DO TUMOR (CM)			
<2	3 (3,1%)	0 (0%)	0 (0%)
2-5	3 (15%)	2 (10%)	0 (0%)
>5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabela C: Tamanho dos tumores *Phyllodes* x recidiva, $p > 0,05$

TAMANHO DO TUMOR	TEMPO ATÉ A RECORRÊNCIA LOCAL
1,1 cm	3,9 anos
1,2 cm	5,1 anos
1,7 cm	1,2 anos
2,4 cm	6,9 anos
2,6 cm	2,8 anos
3,2 cm	1,0 ano
3,8 cm	8,6 anos
4,0 cm	0,41 ano

9% dos pacientes com tumor maligno tiveram metástase ao diagnóstico. A sobrevida livre de doença foi de 92% e a sobrevida global foi de 97% em 19 anos.

O *follow-up* médio foi de 76,8 meses, quase 7 anos. 74,2% não apresentaram recidiva da doença, 1,5% (3 pacientes) foram a óbito nesses 19 anos, 16,7% não tiveram *follow-up*, 7,6% apresentaram nódulos ou cistos com aspecto benigno na radiologia, mas sem um diagnóstico definitivo.

A causa dos três óbitos foram: uma recorrência locorregional avançada de um carcinoma epidermóide da vulva, consequências de um adenocarcinoma do reto e TPs metastáticos para o pulmão.

25% apresentavam fibroadenoma antes do diagnóstico de TP (Tabela D, E e F). 14,5% dos pacientes com TP tinham outra neoplasia maligna (Tabela G). 8% tinham neoplasia maligna da mama, sendo o carcinoma ductal invasivo o mais comum, seguido pelo carcinoma ductal *in situ*, carcinoma lobular e sarcoma estromal da mama (Tabela H). E um paciente tem síndrome de Li-Fraumeni com outros tumores diagnosticados previamente, como condrossarcoma metastático e carcinoma papilar da tireoide.

Tabela D: Número de pacientes que tiveram anteriormente um diagnóstico de fibroadenoma antes do diagnóstico de TP.

TIPO HISTOLÓGICO X FIBROADENOMAS	Fibroadenoma antes do diagnóstico de TP
TPB	3 (3,15%)
TPBo	0 (0,00%)
TPM	2 (8,70%)

Tabela E: Número de pacientes que tiveram anteriormente um diagnóstico de TP antes do diagnóstico de fibroadenoma.

TIPO HISTOLÓGICO X FIBROADENOMAS	Fibroadenoma após o diagnóstico de TP
TPB	14 (14,71%)
TPBo	0 (0,00%)
TPM	2 (8,70%)

Tabela F: Número de pacientes que foram diagnosticados ao mesmo tempo com fibroadenoma e TP.

TIPO HISTOLÓGICO X FIBROADENOMAS	Fibroadenoma e TP diagnosticados ao mesmo tempo
TPB	13 (13,66%)
TPBo	1 (5,00%)
TPM	1 (4,35%)

Tabela G: Número de pacientes que tiveram diagnóstico prévio de neoplasias malignas antes do diagnóstico de TP.

TIPO HISTOLÓGICO X NEOPLASIAS MALIGNAS	NEOPLASIA MALIGNA DA MAMA	OUTRAS NEOPLASIAS MALIGNAS
TPB	5 (5,2%)	7 (7,3%)
TPBo	3 (15,0%)	0 (0%)
TPM	3 (13,0%)	5 (21,7%)

Tabela H: Neoplasias Malignas da mama diagnosticadas e tratadas antes do diagnóstico de TP.

TIPO HISTOLÓGICO X NEOPLASIAS MALIGNAS DA MAMA	Carcinoma ductal invasivo	Carcinoma ductal <i>in situ</i>	Carcinoma lobular	Sarcoma do estroma da mama
TPB	3 (3,1%)	1 (1,0%)	1 (1,0%)	0 (0%)
TPBo	3 (15,0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
TPM	2 (8,7%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4,3%)

DISCUSSÃO

Este estudo retrospectivo é um dos maiores relacionados ao TP e ao seguimento a longo prazo desses pacientes (Tabela I) e foi realizado em um dos maiores centros de câncer da América Latina.

No presente estudo, a idade média foi de 41 anos, concordando com a média de idade dessa patologia que é entre 40 e 50 anos; no entanto, este estudo mostra 40 pacientes com menos de 35 anos e 19 com mais de 55 anos. Os pacientes mais jovens e mais velhos tinham 14, 15, 17, 80 e 82 anos, o que é incomum para essa patologia. A paciente mais jovem (14 anos de idade) apresentou um TPBo. Alguns estudos também relataram jovens ou idosos com esses tumores: um estudo americano relatou as idades de 14 a 77 anos (ASOGLU et al. 2004)), e um estudo italiano relatou as idades de 9 a 88 anos (SALVADORI et al. 1989).

Neste estudo, 69,9% dos casos foram classificados como TPBs, 14,7% como TPBo e 15,4% como TPM. A proporção entre os tipos histopatológicos foi semelhante aos outros estudos publicados (Tabela I), sendo o TPB responsável pela maioria dos casos e o número de TPBo e TPM semelhantes. Como demonstrado em outros estudos, este presente estudo mostrou que quanto maior a idade, maior a classificação histológica (EFARED et al. 2018; RUVALCABA-LIMÓN et al. 2016), comparando TPBs e TPMs ($p < 0,05$).

Três pacientes apresentavam dois tumores unilaterais de *Phyllodes* mamários síncronos e três pacientes apresentavam tumores síncronos de *Phyllodes* mamários bilaterais. O tumor multifocal de *Phyllodes* de mama, bilateral ou unilateral, é uma apresentação incomum desta doença (MALLORY et al. 2015; SEAL et al. 2010).

O tamanho do tumor variou de 0,7 a 29cm. O tamanho mediano foi de 3,2; semelhante a outros estudos que mostram mediana do tamanho 3,6 ou 4,5 (OSSA et al. 2016; RUVALCABA-LIMÓN et al. 2016). Não houve diferença estatística entre o tamanho do tumor relacionado ao grau histopatológico; mas alguns autores mostraram uma relação entre o tamanho do tumor e o grau histopatológico dos TPs (EFARED et al. 2018) outros não mostraram diferença quanto ao presente estudo (LENHARD et al. 2008).

Tabela I: Alguns estudos retrospectivos publicados sobre TP, comparando com este estudo.

REFERÊNCIA	NÚMERO DE CASOS	TPB (%)	TPBo (%)	TPM (%)
Este estudo	114 (em 19 anos)	69,9	14,7	15,4
(EFARED et al. 2018)	106 (em 7 anos)	73,58	18,86	7,54
(GANESH et al. 2018)	79 (em 10 anos)	67,1	21,5	11,4
(RUVALCABA-LIMÓN et al. 2016)	307 (em 10 anos)	72,3	12	11,4
(BUMPERS et al. 2015)	50 (em 30 anos)	78	6	14
(SAWALHI e AL-SHATTI 2013)	42 (em 5 anos)	38,09	21,42	40,47
(IAU et al. 1998)	40 (em 13 anos)	82,5	12,5	5
(GRANIĆ et al. 2006)	84 (em 5 anos)	82,14	4,7	13,09
(LENHARD et al. 2008)	33 (em 21 anos)	40	27	33
(OSSA et al. 2015)	77 (em 10 anos)	33,8	31,2	35
(ABDELKRIM et al. 2010)	26 (em 7 anos)	50	26,9	23,07

Para este tumor, o tratamento de escolha é cirúrgico. Neste estudo, a cirurgia mais utilizada foi a nodulectomia em TPBs, quadrantectomia em TPBs e mastectomia em TPMs; mas não foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre as técnicas cirúrgicas utilizadas e a frequência de recidivas ou metástases. A ressecção da lesão com margem de pelo menos 1 centímetro é recomendada, de acordo com alguns estudos (OSSA et al. 2015; SALVADORI et al. 1989).

A literatura mostra que, nesses pacientes, os locais mais comuns de metástases são pulmões e ossos (HODGES et al. 2009; LAKHANI et al. 2012). 9% dos TPMs deste estudo tinham metástases. Essa porcentagem concorda com a literatura (WIRATKAPUN et al. 2014). Todas essas metástases foram encontradas no pulmão.

A literatura mostra que a recidiva ocorre em geral após 2 anos do diagnóstico (LAKHANI et al. 2012). No presente estudo, a recidiva ocorreu de 5 meses a 8 anos e meio após o diagnóstico (Tabela J). Neste estudo, 8% dos TPBs e 12,5% de tumores de TPMs apresentaram recidiva; esses números de recidiva tumoral são menores do que os encontrados na literatura, nos quais 10-17% dos casos benignos apresentam recidiva e 23-30% dos malignos recorrem (WIRATKAPUN et al. 2014). Talvez esses resultados tenham sido baixos devido à perda de *follow-up*.

Não houve significância estatística entre o tamanho do tumor e a recidiva local, nem relação entre o tamanho do tumor e o tempo até a recorrência local (Tabela B e C). Os pacientes com dois ou três tumores na mesma mama ou na mama contralateral não apresentaram mais recidiva local do que os pacientes com apenas um tumor. 75% dos pacientes que apresentaram recidiva local realizaram excisão local e 25% realizaram excisão ampla. 62,5% dos pacientes que apresentaram recidiva local tiveram margens livres e 37,5% de margens positivas (Tabela J). A presença de margens comprometidas e tumores de maior dimensão aumenta a chance de recorrência e metástase (MALLORY et al. 2015; SEAL et al. 2010).

O seguimento médio foi de 76,8 meses. Durante o seguimento, 74,2% não mostraram retorno da doença; 7,6% apresentaram nódulos ou cistos com

aspecto benigno na radiologia, mas sem diagnóstico definitivo. O seguimento de 16,7% dos pacientes foi perdido provavelmente porque os pacientes continuaram seu tratamento e acompanhamento em outros hospitais ou em outra cidade próxima às suas residências.

Tabela J: Recidiva dos tumores *Phyllodes* por tipo histológico, tamanho do tumor, tipo de cirurgia, status da margem e tempo até a recorrência.

RECORRÊNCIA (n=8)	
Tipo histológico	
Benigno	6
Borderline	0
Maligno	2
TAMANHO DO TUMOR (cm)	
<2	2
2-5	5
>5	1
TIPO DA CIRURGIA	
Nodulesctomia	6
Quadrantectomia	2
Mastectomia	0
STATUS DAS MARGENS	
Livre	5
Comprometida	3
TEMPO ATÉ A RECORRÊNCIA (MESES)	
<12	1
12-24	2
24-48	2
>48	3

A sobrevida livre de doença foi de 92% e a sobrevida global foi de 97% em 19 anos. Essa sobrevida livre de doença e a sobrevida global foram maiores que as relatadas na literatura (ABDALLA e SAKR 2006). Três de 139 pacientes morreram durante esses 19 anos, duas devido a complicações de outros tumores: uma recorrência loco-regional avançada de carcinoma epidermóide da vulva e outra consequências de um adenocarcinoma do reto. Mas uma das mortes ocorreu devido ao TP metastático para o pulmão, 7 anos

após o diagnóstico. Esta foi a única paciente no presente estudo que morreu de causas derivadas do TP. Esses pacientes frequentemente morrem após 5 anos do diagnóstico de metástase (LAKHANI et al. 2012). A Tabela K mostra baixo índice de recorrência, metástase e óbito em TPs. Os óbitos não foram mencionados na maioria dos artigos relacionados.

Tabela K: Alguns estudos retrospectivos publicados sobre TP, comparando com este estudo sobre óbitos, recorrência e metástase. NR: não relatado.

REFERÊNCIA	NÚMERO DE CASOS	ÓBITOS	RECORRÊNCIA (%)	METÁSTASES (%)
Este estudo	114 (em 19 anos)	1	8,0 TPB; 12,5 TPM	9 (total)
(RUVALCABA-LIMÓN et al. 2016)	307 (em 10 anos)	NNR	8.2 (total); 18.7 TPM	NR
(SAWALHI e AL-SHATTI 2013)	42 (em 5 anos)	NNR	18 (total); 4 TPB; 2 TPBo; 12 TPM	14 (total)
(IAU et al. 1998)	40 (em 13 anos)	NNR	10 (total)	NR
(GRANIĆ et al. 2006)	84 (em 5 anos)	NNR	20,2 (total). 16,6 TPB; 2,38 TPBo; 1,19 TPM	7,1 TPM/pulmão
(LENHARD et al. 2008)	33 (em 21 anos)	NNR	8 TPB; 20 TPBo; 50 TPM	9 (total)
(OSSA et al. 2015)	77 (em 10 anos)	NNR	2,59 (total)	5,19 (total)
(ABDELKRIM et al. 2010)	26 (7 anos)	3	23 (total)	3 (total)

36 casos (25%) dos TPs tinham fibroadenoma antes e/ ou após o diagnóstico e metade dos casos de recidiva local tinham fibroadenoma associado. Alguns autores relatam a relação entre o fibroadenoma e o TP. Eles sugerem que é possível haver uma progressão do fibroadenoma para o

TP (MARCIL et al. 2017; PISCUOGLIO et al. 2016). HODGES et al. (2009) acredita que a progressão do fibroadenoma para o TP está associada à perda clonal e alélica no TP53 e D22S264. Mas não apenas o fibroadenoma está relacionado ao TP: outras neoplasias mamárias e benignas foram relacionadas a TPs como Carcinoma Ductal *in situ*, Carcinoma Ductal Invasivo, hiperplasia epitelial, adenoma tubular benigno e hiperplasia estromal pseudoangiomatosa (PANDA e NAIK 2016). No presente estudo, 23 pacientes tinham outros tumores malignos, sendo 11 tumores malignos da mama e 12 tumores malignos em outros órgãos, como mostrado na Tabela G. Um desses tumores malignos da mama foi um sarcoma do estroma mamário que ocorreu concomitantemente com um TPB, na mesma mama, mas em diferentes quadrantes e, 7 anos depois, apresentou TPM na mesma mama, em outro quadrante.

Este estudo mostra também uma paciente com síndrome de Li-Fraumeni, esta paciente apresentou condrossarcoma metastático e carcinoma papilar da tireoide. A síndrome de Li-Fraumeni está relacionada ao TP em pelo menos 5 estudos recentes nos quais os pacientes tiveram este tumor, dentre outros. No presente estudo, a paciente tinha 45 anos a mais que as pacientes desses estudos, cuja idade foi 9,10,17, 31 e 34 (HEYMANN et al. 2010; OSSA et al. 2016; PROCHAZKOVA et al. 2008). Nestas pacientes foi encontrada a mutação TP53, típica da síndrome de Li-Fraumeni, e isso nos mostra que o TP pode estar associado a essa mutação (BIRCH et al. 2001; HEYMANN et al. 2010).

REFERÊNCIAS

Abdalla HM, Sakr MA. Predictive factors of local recurrence and survival following primary surgical treatment of *Phyllodes* tumors of the breast. **J Egypt Natl Canc Inst** 2006; 18:125-33.

Abdelkrim S, Trabelsi A, Bouzrara M, et al. *Phyllodes* Tumors of the Breast: A Review of 26 Cases. **World J Oncol** 2010; 1:129-134.

Asoglu O, Ugurlu MM, Blanchard K, et al. Risk Factors for Recurrence and Death After Primary Surgical Treatment of Malignant *Phyllodes* Tumors. **Ann Surg Oncol** 2004; 11:1011-1017.

Birch JM, Alston RD, McNally RJ, et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. **Oncogene** 2001; 20:4621-4628.

Bumpers HL, Tadros T, Gabram-Mendola S, et al. *Phyllodes* tumors in African American women. **Am J Surg** 2015; 210:74-79.

Efared B, Ebang GA, Tahiri L, et al. *Phyllodes* tumors of the breast: clinicopathological analysis of 106 cases from a single institution. **Breast Dis** 2018; 37:139-145.

Fiks A. Cystosarcoma *Phyllodes* of the mammary gland--Müller's tumor. For the 180th birthday of Johannes Müller. **Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.** 1981; 392:1-6.

Ganesh V, Drost L, Lee J, et al. A retrospective review of *Phyllodes* tumours of the breast: A single institution experience. **The Breast** 2018; 38:52-57.

Granić M, Oprić D, Pupić G, et al. [Surgical methods for the treatment of breast *Phyllodes* tumors--a report of 319 cases]. **Acta Chir Iugosl** 2006; 53:57-62.

Heymann S, Delaloge S, Rahal A, et al. Radio-induced malignancies after breast cancer postoperative radiotherapy in patients with Li-Fraumeni syndrome. **Radiat Oncol** 2010; 5:104.

Hodges KB, Abdul-Karim FW, Wang M, et al. Evidence for Transformation of Fibroadenoma of the Breast to Malignant *Phyllodes* Tumor. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2009; 17:345-350.

Iau PT, Lim TC, Png DJ, Tan WT. *Phyllodes* tumour: an update of 40 cases. **Ann. Acad Med Singapore** 1998; 27:200-3.

Lakhani, S, Ellis. I, Schnitt, S, Tan, P, van de Vijver M. WHO Classification of Tumours of the Breast, Fourth Edition. In: **IARC WHO Classif Tumours**, No 4. 4th. ed. Lyon: [s.n.].

Lenhard MS, Kahlert S, Himsl I, Ditsch N, Untch M, Bauerfeind I. *Phyllodes* tumour of the breast: Clinical *follow-up* of 33 cases of this rare disease. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 2008; 138:217-221.

Mallory MA, Golshan M, Chikarmane SA, Raza S, Lester S, Caterson SA. Bilateral synchronous benign *Phyllodes* tumors. **Am Surg** 81(5):192-194.

Marcil G, Wong S, Trabulsi N, et al. Fibroepithelial breast lesions diagnosed by core needle biopsy demonstrate a moderate rate of upstaging to *Phyllodes* tumors. **Am J Surg** 2017; 214:318-322.

Ossa CA, Herazo F, Gil M, et al. *Phyllodes* tumor of the breast: a clinic-pathologic study of 77 cases in a Hispanic cohort. **Colomb Med** 2015; 46:104-8.

Ossa CA, Molina G, Cock-Rada AM. Síndrome de Li-fraumeni. **Biomedica** 2016; 36:182-187.

Panda KM, Naik R. A Clinicopathological Study of Benign *Phyllodes* Tumour of Breast with Emphasis on Unusual Features. **J Clin Diagn Res** 2016; 10:EC14-7.

Piscuoglio S, Geyer FC, Burke KA, et al. Massively parallel sequencing analysis of synchronous fibroepithelial lesions supports the concept of progression from fibroadenoma to *Phyllodes* tumor. **npj Breast Cancer** 2016; 2:16035.

Prochazkova K, Foretova L, Sedlacek Z. A rare tumor and an ethical dilemma in a family with a germline TP53 mutation. **Cancer Genet Cytogenet** 2008; 180:65-69.

Ruvalcaba-Limón E, Jiménez-López J, Bautista-Piña V, et al. *Phyllodes* Tumor of the Breast: 307 Treated Cases, the Largest Mexican Experience at a Single Breast Disease Institution. **Iran J Pathol** 2016; 11:399-408.

Salvadori B, Cusumano F, Del Bo R, et al. Surgical treatment of *Phyllodes* tumors of the breast. **Cancer** 1989; 63:2532-6.

Sawalhi S, Al-Shatti M. *Phyllodes* tumor of the breast: a retrospective study of the impact of histopathological factors in local recurrence and distant metastasis. **Ann Saudi Med** 2013; 33:162-168.

Seal SK, Kuusk U, Lennox PA. Bilateral and multifocal *Phyllodes* tumours of the breast: A case report. **Can J Plast Surg** 2010; 18:145-6.

Tan BY, Acs G, Apple SK, et al. *Phyllodes* tumours of the breast: a consensus review. **Histopathology** 2016; 68(1):5-21.

Wiratkapun C, Piyapan P, Lertsithichai P, Larbcharoensub N. Fibroadenoma versus *Phyllodes* tumor: distinguishing factors in patients diagnosed with fibroepithelial lesions after a core needle biopsy. **Diagn Interv Radiol** 2014; 20:27-33.