JÉSSICA REIS SANTOS

**Estudo metabolômico-alvo do fenótipo metabólico
associado ao câncer de mama com ênfase no
metabolismo do carbono-1**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientadora: Prof^a Dra. Raquel Susana Matos
de Miranda Torrinhas

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Jéssica Reis

Estudo metabolômico-alvo do fenótipo metabólico
associado ao câncer de mama com ênfase no
metabolismo do carbono-1 / Jéssica Reis Santos. --
São Paulo, 2019.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientadora: Raquel Susana Matos de Miranda
Torrinhas.

Descritores: 1.Carcinoma ductal 2.Neoplasias da
mama 3.Tumor/metabolismo 4.Metabolômica
5.Metabolismo do carbono-1

USP/FM/DBD-316/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

A **Graziela Ravacci**, você sempre acreditou em mim; ensinou-me tudo o que sei hoje. Você me apoiou, incentivou-me e dividiu comigo não somente seu tempo e conhecimento, mas também sua amizade, família e seu lar. Obrigada pelos anos de parceria, por toda paciência e por me fazer uma pessoa e uma profissional cada vez melhor. Minha eterna mentora.

Uma vez eu li - *“Primeiro, escolha as pessoas, depois escolha o caminho”*; você foi minha melhor escolha. Só nós sabemos das vitórias e das dificuldades que passamos ao longo do caminho que nos trouxe até aqui, sempre juntas. Palavras não são capazes de expressar minha eterna gratidão, carinho e respeito pela pessoa maravilhosa e pela profissional singular que você é! Esta dissertação é tão minha quanto sua. Meu mais sincero obrigada!

A meus pais, **Francisco e Valéria** e minhas irmãs, **Kamila e Thais**. Vocês me apoiaram incondicionalmente ao longo do caminho, respeitaram minhas escolhas e, muitas vezes, fizeram renúncias em meu favor. Muito passamos juntos para que este momento fosse possível. Nesta longa jornada, eu nada seria sem vocês! - *“Ohana quer dizer família e família quer dizer nunca abandonar”*. Minha eterna gratidão a vocês!

A meu companheiro de vida, **Arthur Azzi**, por partilhar deste sonho comigo, por estar incansavelmente a meu lado, segurando minhas mãos com todo amor, zelo e paciência durante estes 5 anos em que estive aqui. Obrigada por me amar em meus melhores e piores dias; por ser meu porto seguro! -“ *Eu sou feliz...*”.

A minha eterna filha de 4 patas, **Molly**, por muito me ensinar o amor e a persistência.

A todas as **mulheres** que, em um futuro próximo, possam se beneficiar de quaisquer descobertas sobre a otimização do tratamento oncológico.

Agradecimentos

Dedico aqui algumas palavras de agradecimento a todos aqueles que, de alguma forma, estiveram comigo neste percurso que levou à concretização deste trabalho.

Ao Professor Doutor **Dan Linetzky Waitzberg**, meu humilde obrigada. Obrigada por todo apoio e pelos conselhos que contribuíram demasiadamente no desenvolvimento científico e pessoal. Expresso aqui minha profunda gratidão por ter permitido que eu aprendesse entre os melhores e pela oportunidade de ter feito parte deste seletto grupo de pesquisadores, que é a Equipe **Metanutri**.

A minha orientadora, Doutora **Raquel Susana Torrinhas**, grande pesquisadora. Obrigada por me receber e acolher com seu grande coração. Obrigada por dividir seus conhecimentos científicos e por sempre me lembrar que trabalhamos com seres humanos antes de qualquer coisa. Obrigada por sempre me incentivar e por acreditar em meu potencial; por me ensinar e inspirar-me a ser uma cientista sempre em busca da minha melhor versão.

Ao Professor Doutor **Ismael Dale Cotrim**, por confiar-me parte de seu estudo metabólico, que me permitiu valioso desenvolvimento científico.

A **Wéllida Santos** e a **Rayene Rodrigues**, vocês estiveram comigo, apoiaram-me e incentivaram-me incessantemente ao longo dos anos. Obrigada por dividirem comigo esta jornada! Obrigada por acreditarem em mim muito mais do que eu mesma e por me impulsionarem a dar meu melhor, sempre! Esse trabalho também é de vocês!

A **Natasha Mendonça Machado**, presente que recebi no início da jornada científica e metabólica. Parceira imensamente paciente, obrigada por dividir comigo seus conhecimentos e por me presentear com sua amizade a apoio incondicional ao longo do caminho! Muito obrigada!

A **Daniele Fonseca Candian**, primeiramente, por sua amizade, por todas as conversas, cafés e trocas pessoais e profissionais. Grande incentivadora nos momentos difíceis e grande exemplo de persistência e profissionalismo. Seu coração não corresponde a seu tamanho. Meu muitíssimo obrigada!

Ao **Tharcísio C. Tortelli Jr.**, ao **Ronaldo Thomatieli** e ao **Giulliano Esperança**. Grandes conselheiros e apoiadores. Sem a presença de vocês ao longo nos anos, com certeza eu não estaria completando essa fase de forma grandiosa e gratificante.

A **Alweyd Tesser** e ao **Felipe Gutierres**, por serem grandes amigos, apoiadores e, sobretudo, grandes ouvintes ao longo dos anos.

A **Beatriz Ferreira**, **Denise Passin**, **Letícia Callado**, **Illana Marques**, **Natália Magalhães** e **Bianca Depieri**, obrigada pelas incansáveis risadas, pelos eternos cafés, pelas marmitas na copa, pelos 3k. Obrigada pelo apoio, incentivo e, especialmente, por fazerem desta jornada um momento único. Vocês estarão sempre em meu coração!

A **Ana Cristina Martinez**, pela paciência, amizade e grande ajuda no desenvolvimento do trabalho.

À Doutora **Maria Mitzi Brentanni**, por todo apoio, incentivo, auxílio e aconselhamento no início desta jornada.

A Doutora **Angela Waitzberg**, pelas inúmeras colaborações e aprendizados ao longo dos anos.

A todos da **equipe Metanutri – LIM-35**, os quais, de alguma forma, me auxiliaram ou ensinaram lições valiosas. Obrigada pela convivência e pelos ensinamentos diários. Cada um de vocês contribuiu de alguma forma para que eu fosse quem sou hoje.

A todos os professores e funcionários da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do HC-FMUSP do programa de pós-graduação, em especial, a **Vilma de Jesus Libério**, pela paciência em sempre “tirar só mais uma duvidazinha”, obrigada pelo carinho e pela gentileza.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela bolsa de mestrado que me foi concedida.

À **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, pela oportunidade de estar aqui, por ter sido minha segunda casa e pelo apoio concedido ao desenvolvimento desta pesquisa.

A toda minha **família**, a todos os **amigos**, a tudo e todos que acreditaram não somente em mim, mas, nesta causa, e contribuíram para sua concretização.

*Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade
- Raul Seixas*

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”

Cora Coralina

Normalização

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação, 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos, de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	14
3 MÉTODOS	16
3.1 Fomento	17
3.2 Aspectos éticos	17
3.3 Local de execução.....	17
3.4 Desenho do estudo	18
3.5 Casuística e critérios de seleção dos pacientes.....	18
3.6 Análise metabolômica-alvo.....	19
3.7 Análise estatística.....	21
4 RESULTADOS	23
4.1 Características clínico-patológicas das pacientes com IDC	24
4.2 Perfil metabólico dos tecidos tumoral e normal adjacente das pacientes com IDC	26
4.3 Diferenças entre os perfis metabólicos dos tecidos tumoral e normal adjacente das pacientes com IDC	32
5 DISCUSSÃO	45
5.1 Da contribuição do estudo.....	46
5.2 Do método.....	46
5.3 Dos resultados	48
6 CONCLUSÃO	58
6.1 Corolário.....	58
7 PERSPECTIVAS.....	60
8 ANEXOS	63

A	Carta de Propriedade	64
B	Descrição dos kits Biocrates®.....	67
C	Análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS-DA) dos subtipos de câncer de mama	74
D	Análise multivariada dos subtipos de câncer de mama	75
9	REFERÊNCIAS.....	76
	APÊNDICE.....	90
	Carta de submissão para publicação a periódico indexado.....	91
	Prêmios.....	92
	Resumos publicados em Anais de Congressos Internacionais e Nacionais	93

Listas

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
®	Marca registrada
2HG	<i>2-hidroxiglutarato Alpha-hydroxyglutarate acid</i>
3-PG	<i>3-phosphoglycerate</i>
AA	Aminoácido
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ACS	<i>American Cancer Society</i>
ADMA	<i>Asymmetric dimethylarginine</i>
AKT	<i>Protein kinase B</i>
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ANOVA	Análise de Variância
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BCAA	Aminoácidos de cadeia ramificada
BC-S	Tecido mamário adjacente
BC-T	Tecido tumoral
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAPPesq	Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisas do Hospital das Clínicas da FMUSP
CO ₂	Dióxido de carbono
CV	<i>Cross validation</i>
DHFR	<i>Dihydrofolate reductase</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ER	Estrógeno
Erk1/2	<i>Extracellular-signal-regulated kinases</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDR	Taxa de falsa descoberta

GCKR	Somas de hexoses
GLUT1	<i>Glucose transporter 1</i>
HC FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
IDC	<i>Invasive ductal carcinoma</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LC-MS/MS	Espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida
LIM-35	Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo
LOG	Transformação logarítmica generalizada
m/z	Razão massa/carga
MetIQ	Software para cálculo automatizado de concentrações de metabólitos
<i>MSEA</i>	<i>Metabolite set enrichment analysis</i>
mTHF	<i>5-methyltetrahydrofolate</i>
MTHFD	<i>methylenetetrahydrofolate dehydrogenase</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MUFA	Ácido Graxo Monoinsaturado
MYC	<i>MYC proto-oncogene</i>
NA	Não numérico
NAD ⁺	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide oxidized</i>
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide reduced</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NH ₃	Amônia
NO	<i>Nitric oxide</i>
OOB	<i>Out-of-bag error</i>
PCA	Análise multivariada não supervisionada de componentes principais
pH	Potencial hidrogeniônico
PHGDH	<i>Phosphoglycerate dehydrogenase</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PLS DA	Análise discriminante parcial por mínimos quadrados

PLS-DA	Análise multivariada supervisionada
pPYR	<i>3-phospho-hydroxypyruvate</i>
PR	Progesterona
PRESS	Soma Residual Prevista de Quadrados
PUFA	Ácido graxo poli-insaturado
Q2	Estimativa da capacidade preditiva do modelo
R2	Coeficiente de correlação
RF	Análise de Random Forest
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	Reactive oxygen species
SAH	<i>S-adenosylmethionine</i>
SAM	<i>Adenosylmethionine</i>
SFA	Ácido graxo saturado
SREBP1	<i>Sterol regulatory element-binding proteins</i>
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
THF	<i>Tetrahydrofolate</i>
TNM	Classification of Malignant Tumors
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
<i>Trp53</i>	<i>Transformation-related protein 53</i>
UNIFESP	Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo
VIPS	Variáveis de importância
vs	versus
Xls	formato de arquivo do Microsoft Excel
α	alfa
β	beta
Δ 12 Desaturase	<i>Delta 12-fatty acid desaturase</i>
μ L	Microlitro

TABELAS

Tabela 1 - Medicamentos com foco no metabolismo no carbono-1	12
Tabela 2 - Características clínico-patológicas das pacientes com carcinoma ductal invasivo.	25
Tabela 3 - Metabólitos teciduais que diferenciam o tecido de carcinoma ductal invasivo e tecido mamário normal adjacente, usando LC-MS / MS.	33
Tabela 4 - Análise de enriquecimento das 15 principais vias (MSEA) dos metabólitos diferenciais entre os tecidos tumoral e normal adjacente de pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama.	42

FIGURAS

Figura 1 -	Representação metabólica da via do carbono-1	8
Figura 2 -	Normalização dos dados.....	27
Figura 3 -	Análise multivariada do metabolismo tecidual.....	28
Figura 4 -	Análise de qualidade da amostra (Cross Validation PLS- DA).....	29
Figura 5 -	Classificação de metabólitos por Random Forest	30
Figura 6 -	Variáveis de importância (VIPs), conforme análise de RF entre os grupos	31
Figura 7 -	Agrupamento hierárquico de metabólitos entre o tecido tumoral carcinoma ductal invasivo da glândula mamária e o tecido mamário normal adjacente	40
Figura 8 -	Análise de enriquecimento de vias metabólicas (MSEA)	41
Figura 9 -	Interação metabólica entre carcinoma ductal invasivo da glândula mamária e o tecido mamário normal adjacente, de acordo com os principais metabólitos identificados neste estudo	43

Resumo

Santos JR. *Estudo metabolômico-alvo do fenótipo metabólico associado ao câncer de mama com ênfase no metabolismo do carbono-1* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

O metabolismo do carbono-1, ao envolver os ciclos de folato, metionina e transulfuração, pode ser considerado responsável por integrar o estado nutricional celular com seu metabolismo (biossíntese de nucleotídeos, remodelação da matriz extracelular, manutenção do estado redox e eventos epigenéticos), a partir da disponibilidade de nutrientes, como aminoácidos, glicose e vitaminas. Estudos clínicos e experimentais que exploram mecanismos moleculares, vêm sugerindo a hiperativação do metabolismo do carbono-1, como fator importante para adaptação metabólica durante a oncogênese e progressão do câncer. Entretanto, o papel do metabolismo do carbono-1 no câncer de mama ainda é inconclusivo. O presente estudo considerou a hipótese de que o carcinoma ductal invasivo da glândula mamária (IDC) apresenta aumento da atividade do metabolismo do carbono-1, como característica metabólica importante para a progressão da doença. O perfil metabólico de tecidos tumoral ($n = 47$) e mamário normal adjacente ($n = 43$; controle) de mulheres com IDC foi analisado por técnica metabolômica-alvo (Biocrates Life Science®) para identificar componentes prevalentes do fenótipo metabólico associado ao câncer de mama, reportados em estudos prévios. Análises estatísticas e de enriquecimento de vias foram realizadas, usando o software MetaboAnalyst 4.0 (Canadá). Apenas características encontradas em 50% das amostras foram analisadas. Análises multivariadas dos dados metabolômicos foram capazes de diferenciar os tecidos normal e tumoral, de acordo com o perfil metabólico. Foram identificados 99 metabólitos diferencialmente expressos no IDC, em comparação ao tecido mamário normal adjacente ($p < 0,05$). A análise de enriquecimento de vias demonstrou que grande parte dos metabólitos, com maior expressão nas amostras de IDC (vs. controle), esteve envolvida no metabolismo do carbono-1. Observou-se aumento na concentração de aminoácidos doadores de unidades de carbono, como serina, glicina e treonina. Além disso, as análises de enriquecimento das vias metabólicas destacaram aumento da atividade dos ciclos que recebem e doam unidades de carbono, como folato, metionina e homocisteína. Foi também possível identificar aumento na concentração de metabólitos envolvidos em diferentes processos celulares, sabidamente dependentes do metabolismo do carbono-1, como proliferação, biossíntese de nucleotídeos, processos pós-traducionais, remodelação da matriz extracelular e controle do estado redox e de pH celular nas amostras de IDC. Os dados do presente estudo sugerem complementaridade entre as vias metabólicas na progressão de IDC. No entanto, o metabolismo do carbono-1 parece ser via central e poderia constituir potencial-alvo molecular para tratamento de IDC. Considerando que o metabolismo do carbono-1 é sensível à disponibilidade de nutrientes, é possível ainda que essa via metabólica possa representar uma janela terapêutica para intervenções dietéticas para complementar o tratamento farmacológico padrão.

Descritores: Carcinoma ductal; Neoplasias da mama; Tumor/metabolismo; Metabolômica; Metabolismo do carbono-1.

Abstract

Santos JR. *Targeted metabolomic study of metabolic phenotype associated with breast cancer with emphasis on one-carbon metabolism* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

One-carbon metabolism involving the folate, methionine and transsulfuration cycles, can be held responsible for integrating the cellular nutritional status with its metabolism (biosynthesis of nucleotides, extracellular matrix remodeling, maintenance of redox status and epigenetic events) from the availability of nutrients such as amino acids, glucose, and vitamins. Clinical and experimental studies exploring molecular mechanisms have suggested the overactivation of one-carbon metabolism as an important factor for metabolic adaptation during cancer oncogenesis and progression. However, the role of one-carbon metabolism in breast cancer is still inconclusive. The present study considered the hypothesis that invasive mammary gland ductal carcinoma (IDC) has increased one-carbon metabolism activity as an important metabolic characteristic for disease progression. The metabolic profile of tumor (n = 47) and adjacent normal breast (n = 43; control) tissues of women with IDC were analyzed by target metabolomic technique (Biocrates Life Science®) to identify prevalent components of the metabolic phenotype associated with breast cancer, reported in previous studies. Statistical and pathway enrichment analysis were performed using MetaboAnalyst 4.0 software (Canada). Only characteristics found in 50% of the samples were analyzed. Multivariate analysis of metabolomic data were able to differentiate normal and tumor tissues according to metabolic profile. Ninety-nine differentially expressed metabolites in IDC were identified compared to adjacent normal breast tissue (p <0.05). Pathway enrichment analysis showed that most metabolites, with greater expression in the IDC (vs. control) samples, were involved in one-carbon metabolism. An increase in the concentration of donor amino acids from carbon units such as serine, glycine, and threonine was observed. In addition, the metabolic pathways enrichment analyzes showed increased activity cycles that receive and donate carbon units, such as folate, methionine, and homocysteine. It was also possible to identify an increase in the concentration of metabolites involved in different cellular processes, known to be dependent on carbon-1 metabolisms, such as proliferation, nucleotide biosynthesis, post-translational processes, extracellular matrix remodeling and redox and cell pH control, in IDC samples. The data from this study suggest complementarity of the metabolic pathways in the IDC progression. However, carbon-1 metabolism appears to be a central pathway and could be a potential molecular target for treating IDC. Considering that one-carbon metabolism is sensitive to nutrient availability, it is possible that this metabolic pathway may represent a therapeutic window for dietary interventions to complement standard pharmacological treatment.

Descriptors: Carcinoma, ductal; Breast cancer; Neoplasms/metabolism; Metabolomics; One-carbon metabolism.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a afecção maligna mais prevalente em mulheres e a segunda causa mais comum de morte por câncer em todo o mundo ^{1, 2}. De acordo com a Sociedade Americana de Câncer (ACS; *American Cancer Society*), cerca de 316.120 novos casos da doença e 40.610 mortes dela decorrentes são esperados nos Estados Unidos da América (EUA; *United States of America*) durante o biênio 2018-2019 ³. Para cada ano do mesmo período, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) espera 59.700 casos novos de câncer de mama no Brasil, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres ⁴. O carcinoma ductal invasivo (IDC) também conhecido como carcinoma ductal infiltrativo, é um tipo de câncer de mama que se origina no epitélio ductal da mama e invade os tecidos a seu redor. O IDC é o tipo de câncer de mama mais prevalente e representa cerca de 70% de todos os casos ⁵.

A existência de diferentes subtipos moleculares do câncer de mama reflete a heterogeneidade da doença. De acordo com seu perfil de expressão de receptores de estrogênio (ER; do inglês, *estrogen receptors*), progesterona (PR; do inglês, *progesterone receptor*) e fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2; do inglês, *human epidermal growth factor receptor 2*), tumores de mama podem ser classificados em luminal A (ER+/PR+/HER2-), luminal B (ER+/PR+/HER2+), HER2 positivo (ER-/PR-/HER2+) e triplo negativo (ER-/PR-/HER2-) ^{6, 7, 8}. Os subtipos triplo-negativo

e HER2 positivo, ambos com ausência de ER/PR, produzem um grau mais agressivo do câncer de mama ⁹.

Os diferentes subtipos do câncer de mama são definidos por alterações gênicas que resultam na superexpressão de oncôgenes e redução da expressão de genes supressores tumorais, gerando diferentes fenótipos moleculares malignos ^{5, 10, 11}. Entretanto, características fenotípicas celulares adquiridas durante a carcinogênese mamária têm o propósito comum de viabilizar a rápida proliferação da célula tumoral, progressão para carcinoma *in situ*, invasão do tecido adjacente e metástase, independente do subtipo tumoral gerado ^{10, 11}. A obtenção e utilização dos substratos necessários para promover e sustentar esses processos podem advir de modificações metabólicas adquiridas pela célula cancerígena da mama que, se interrompidas, podem desestabilizar vias biológicas que sustentam seu fenótipo maligno ^{11, 12, 13}.

Notadamente, o metabolismo de células tumorais difere-se do de células normais ^{14, 15}. O conhecimento dessa propriedade tumoral é histórico, mas apenas, recentemente, sua importância sobre a fisiologia da célula maligna vem sendo melhor compreendida. Atualmente se reconhece que a ativação de oncôgenes e perda de função de genes supressores tumorais são acompanhados de reprogramação metabólica celular, para viabilizar a manutenção do fenótipo maligno gerado por esses fenômenos gênicos ¹²⁻¹⁶. De tal forma que o metabolismo tumoral foi incluído, como característica fundamental do câncer (i.e., *hallmarks of cancer*) na última atualização de Hanahan e Weinberg (2011) ¹⁴.

Algumas alterações metabólicas são predominantes em células tumorais, a despeito do tipo de câncer, como dependência do metabolismo glicolítico - propriedade conhecida como “Efeito Warburg” ^{15, 16}. Por muito tempo, postulou-se que o efeito Warburg refletia aumento do requerimento energético da célula tumoral e advinha de disfunção na fosforilação oxidativa mitocondrial ¹⁶. Muito embora esta hipótese seja coerente com a alta demanda de energia necessária para proliferação celular, existe o paradoxo de que a glicólise anaeróbia, não é uma via de produção de energia eficiente. Além disso, hoje se sabe que algumas células tumorais também apresentam dependência do metabolismo mitocondrial ^{17, 18, 19}.

No cenário atual, alguns autores consideram que o “Efeito Warburg” evidencia que a demanda metabólica de células tumorais vai além de alto requerimento energético ^{11, 12, 16, 17}. De fato, a proliferação e o crescimento celulares requerem mais do que produção de energia. Ambos implicam formação de novos componentes celulares e macromoléculas, que incluem proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos; assim como na manutenção do estado redox, genético e epigenético. Para suprir estes requerimentos, algumas células tumorais apresentam aumento da atividade de outras vias metabólicas além da glicolítica, a saber: glutaminólise, ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), síntese de ácidos graxos e metabolismo do carbono-1 ^{14, 17, 19, 20, 21, 22}.

Dentro das vias hierárquicas classicamente alteradas no câncer, a reprogramação do metabolismo da glicose e glutamina é, com frequência, observada em tumores malignos com mutações nos oncôgenes *MYC* e

TP53. Até 45% dos tumores de mama mostram mutações no *MYC* e cerca de 80% daqueles enriquecidos com HER2 apresentam mutações no *TP53* ^{23, 24}. Superexpressão de *MYC* associa-se a efeitos metabólicos, que incluem aumento da glicólise, biogênese mitocondrial e catabolismo da glutamina; enquanto mutações em *TP53* também promovem alterações metabólicas a favor da glicólise, bem como aumento da produção de espécies reativas de oxigênio ²³⁻²⁸.

Ambos *MYC* e *TP53* são associados com a via Ras e vias de sinalização envolvendo AMPK (do inglês, *AMP-activated protein kinase*) e PI3K (do inglês, *Phosphoinositide 3-kinase*) ²⁹. No câncer de mama, vias oncogênicas mediadas pela Ras estimulam a captação de glicose, por meio de aumento de *GLUT1* (do inglês, *glucose transporter 1*), e sua utilização por vias anabólicas ^{21, 27}. Além disso, Ras regula o metabolismo da glutamina, especificamente, por direcionar unidades de carbono para a homeostase redox ^{30, 31}. Metade dos tumores de mama luminais apresentam mutações nos genes que regulam a via PI3K/Akt/mTOR que, em semelhança a mutações no *TP53*, se associam com enriquecimento de vias glicolíticas e aumento de vias geradoras de espécies reativas de oxigênio ^{23, 24, 26}.

Independente das clássicas alterações gênicas, células tumorais da mama também podem controlar a ativação de vias metabólicas e adaptar seu metabolismo, de acordo com estímulos extracelulares, como a disponibilidade de nutrientes, pela ativação do metabolismo do carbono-1 ^{13, 22}. A ativação das vias do carbono-1 poderia ser responsável por conferir às células tumorais certa flexibilidade metabólica que lhes

permita ultrapassar limitações impostas pelo microambiente, e viabilizar sua sobrevivência em diferentes situações. Por exemplo, células tumorais podem reestruturar seu metabolismo para compensar a falta de um determinado nutriente ao utilizar um substituto, por meio da ativação do metabolismo do carbono-1 ²².

O metabolismo do carbono-1 engloba uma série de reações bioquímicas que ocorrem no citoplasma e na mitocôndria, essenciais para manter a homeostase celular ³². Estas vias bioquímicas catabolizam diferentes fontes nutricionais para geração de carbonos e os distribuem como substrato para distintas funções celulares fundamentais, como biossíntese, reações de metilação e redução ^{22, 32}. Em razão da maneira específica pela qual as unidades de carbono são obtidas e utilizadas, essa via metabólica funciona como um integrador do estado nutricional da célula, relacionando muitos nutrientes entre si. O fluxo de unidades de carbono, por meio do metabolismo de carbono-1 é plástico e importante para que células cancerosas regulem os níveis de seus nutrientes em resposta às condições intra e extracelulares, que estão em constante mudança ^{22, 32}.

As unidades de carbono geradas pelo metabolismo do carbono-1 trafegam por três vias metabólicas, por meio da modificação bioquímica dos elementos que os compõem: o ciclo do folato, o ciclo da metionina e a via de transulfuração (**Figura 1**) ²². De forma sucinta, o ciclo do folato inicia o metabolismo do carbono-1 ao reduzir o ácido fólico em THF (do inglês, *tetrahydrofolate*), por ação da enzima DHFR (do inglês, *dihydrofolate reductase*). Nessa forma reduzida, unidades de carbono da serina e da

glicina, principais doadores da via, podem ser transferidas para conversão de THF em me-THF (do inglês, *methylenetetrahydrofolate*). A vitamina B6 é um importante cofator para essa transformação bioquímica. Uma vez metilado, o THF pode se submeter a uma sequência de outras biotransformações, por meio da ação de diferentes isoformas da enzima MTHFD (do inglês, *methylenetetrahydrofolate dehydrogenase*), no citosol e na mitocôndria, até sua desmetilação ^{21, 32}.

Na sequência, o carbono resultante da desmetilação de THF é doado para o ciclo da metionina por meio da metilação da homocisteína, com participação da vitamina B12. A transferência de grupos metil e unidades de carbono para formar metionina, liga o ciclo do folato ao da metionina. Em seguida, a metionina é convertida em SAM (do inglês, *adenosylmethionine*) e desmetilada para formar SAH (do inglês, *s-adenosylmethioninamine*). Após o processo de deadenilação, SAH é convertida de volta à homocisteína (hCYS; do inglês, *homocysteine*), completando o ciclo da metionina. A via de transulfuração está conectada ao ciclo da metionina por meio da homocisteína. A homocisteína pode receber unidades de carbono da serina para formar α -cetobutirato, cisteína, taurina e glutatona, como representado nos dados da **Figura 1** ^{22, 32}.

Fonte: Adaptada de Locasale JW (2013)²² e Yang M & Vousden KH. (2016)³²

Legenda. O metabolismo do carbono-1 envolve três vias metabólicas que interagem entre si: 1. O ciclo do folato (círculo azul) fornece unidades de carbono para a síntese de nucleotídeos, auxilia na produção de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH), mantém os níveis de adenosina trifosfato (ATP) celular e transfere grupos metil e unidades de carbono do metil-tetra-hidrofolato (m-THF) para formar metionina (MET), ligando-se ao ciclo da metionina. 2. O ciclo da metionina (círculo verde) atua como doador de unidades de carbono e grupos metil, para subseqüentes reações de metilação e eventos epigenéticos, e se conecta à via de transulfuração por meio da homocisteína (hCYS). 3. A via de transulfuração (círculo rosa) tem como um dos produtos finais a glutatona, contribuindo para o equilíbrio redox celular, por meio da sua capacidade de eliminar e reduzir espécies reativas de oxigênio (ROS) e de manter a relação NADPH/fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida (NADP). THF: tetra-hidrofolato; DHFR: di-hidrofolato redutase; me-THF: metileno-tetra-hidrofolato; B6: piridoxina; MTHFD: metileno-tetra-hidrofolato de-hidrogenase; F-THF: formil-tetra-hidrofolato; B12: cobalamina; MAT: S-adenosilmetionina sintetase; SAM: S-adenosilmetionina; SAHH: S-adenosilhomocisteína hidrolase; CBS: cistationina sintase; ADP: adenosina difosfato

Figura 1 - Representação esquemática do metabolismo do carbono-1

Juntos, os ciclos do folato, metionina e transulfuração geram NADH (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide reduced*) e ATP (do inglês, *adenosine triphosphate*), e distribuem unidades de carbono derivados de nutrientes para síntese de nucleotídeos e glutatona, garantindo a

homeostase energética e redox na célula ^{33, 34}. No entanto, a influência do metabolismo do carbono-1 vai além da homeostase energética e redox. SAM exerce papel significativo em eventos epigenéticos, nas modificações pós-traducionais e nas vias de sinalização, graças à sua capacidade de doar radicais metil para reações de metilação ³⁵. Nesse cenário, o metabolismo do carbono-1 integra o estado nutricional da célula com os mecanismos energéticos, epigenéticos e redox, contribuindo para a manutenção da homeostase celular e manutenção de altas taxas de proliferação de células cancerosas ^{22, 36, 37}.

O metabolismo do carbono-1 é, em grande parte dependente da disponibilidade de aminoácidos não essenciais, como serina e glicina. Ambos podem ser facilmente obtidos, por meio da dieta ou de sua síntese endógena, a partir de outras fontes de carbono ^{20, 30}. A serina pode ser sintetizada “de novo” pela enzima PHGDH (do inglês, *phosphoglycerate dehydrogenase*) durante a glicólise, enquanto a glicina pode ser produzida pelo catabolismo da serina ou treonina ^{22, 36}.

Curiosamente, mutações no *TP53* comuns em tumores de mama parecem aumentar a disponibilidade de serina e glicina, assim como o metabolismo do carbono-1 ^{32, 38}. Em modelos experimentais, algumas células de tumor de mama utilizaram a via glicolítica, para promover a síntese de serina e suprir o metabolismo do carbono-1, pela enzima PHGDH. Isto resulta em grandes quantidades de substrato para síntese *de novo* de serina ³⁹. A superexpressão de PHGDH é, frequentemente, observada em tumores de mama triplo-negativo. Adicionalmente, em

tumores HER2+, altas concentrações de colina e glicina (outros nutrientes doadores de unidades de carbono) associam-se com grau de agressividade do tumor ^{36, 39, 40}.

No câncer, adaptações metabólicas são majoritariamente reguladas por eventos genômicos, mas o microambiente tumoral e a disponibilidade de nutrientes também podem ter papel importante no fluxo de metabólitos que favorece a progressão tumoral ^{12, 23, 26}. Particularmente, o metabolismo do carbono-1 parece ser responsável pelo diálogo entre microambiente, nutrientes e tumor, o que o torna fundamental para a plasticidade e sobrevivência celular em diferentes ambientes ^{22, 23, 26, 41}. Nesse contexto, o efeito Warburg pode não ser a única vantagem metabólica das células tumorais e, portanto, conhecer o perfil metabólico de tumores é de potencial importância para compreensão do complexo cenário bioquímico envolvido na carcinogênese ⁴².

Atualmente, graças ao desenvolvimento da tecnologia de espectrometria de massas, a análise do perfil de metabólitos (metabolôma) do câncer pode ser analisado, por abordagem alvo ou não alvo ^{43, 44, 45}. Ao lado de outras ciências “ômicas”, como a transcriptômica, a metabolômica é entendida como peça final de um quebra-cabeça, capaz de identificar e compreender distintas vias metabólicas implicadas no fenótipo maligno do câncer. A grande vantagem da metabolômica, frente às outras ciências ômicas, é sua capacidade de integrar sinais de diferentes naturezas como, por exemplo, a partir da regulação gênica, atividade pós-traducional, diferentes vias de sinalização e, sobretudo, a partir de estímulos

extracelulares ^{44, 45}. Em conjunto, estes sinais geram metabólitos que podem refletir o estado celular e o fenótipo tumoral.

Avanços na compreensão da biologia do câncer de mama vêm viabilizando terapias combativas e preventivas da doença ⁴⁶. Ao lado do diagnóstico precoce, por meio da mamografia e desenvolvimento de técnicas cirúrgicas conservadoras, estas intervenções contribuíram, desde 1990, para redução, em um terço, da taxa geral de mortalidade relacionada ao câncer de mama ⁴⁷. Dentre as propriedades biológicas tumorais, considera-se o metabolismo celular como potencial alvo terapêutico para o câncer de mama.

De fato, alguns fármacos com alvo em alterações metabólicas tumorais (**Tabela 1**) já estão em desenvolvimento/teste e podem ampliar as oportunidades terapêuticas anticâncer ²³. Particularmente, metotrexato e 5-fluoracil, com alvo no metabolismo do carbono-1, já estão disponíveis para uso clínico ^{22, 48}. A metformina, medicamento frequentemente usado no tratamento de Diabetes tipo 2, tem um efeito metabólico que parece envolver ações no metabolismo do carbono-1, e vem sendo considerada potencial candidata para tratamento e prevenção de alguns cânceres (incluindo o câncer de mama) ^{22, 49, 50}. Adicionalmente, estudos pré-clínicos têm explorado a possibilidade de restringir serina e glicina (doadores de unidades de carbono) para intervenções no câncer ²².

Tabela 1 - Medicamentos com alvo no metabolismo no carbono-1 ²²

Enzimas	Compostos	Status
MTHFR	Metotrexato	Aprovado
TS	5-fluorouracil	Aprovado para câncer colo retal
RNR	Gencitabina	Aprovado para câncer de pâncreas
DNA MTase	Azanucleosides	Aprovado para Leucemia mieloide
OS	DFMO	Estudos clínicos
SAM	MGBG	Estudos pré-clínicos
Metformina	Carbono-1	Estudos pré-clínicos

Legenda. MTHFR, Metilenotetra-hidrofolato redutase; RNR, Ribonucleotídeo redutase; TS, Timidilato sintase; DNA MTase, ácido desoxirribonúcleico metiltransferases, OS, Ornitina descarboxilase, SAM, S-adenosil descarboxilase; DFMO, 2-difluoromethyl ornithine; MGBG, Methylglyoxal bis (guanylhyazone)

Direcionar esforços no estudo da metabolômica do câncer de mama parece ser de fundamental importância para nortear o desenho de estratégias terapêuticas com bom custo-benefício e que permitam combinações com tratamentos já disponíveis e acessíveis para a prática clínica. Apesar de evidências clínicas e experimentais sugerirem que a hiperativação do metabolismo do carbono-1 é importante para a oncogênese, resultados no câncer de mama mantêm-se inconclusivos.

Buscando contribuir para a compreensão da carcinogênese mamária e identificação de potenciais alvos de tratamento, a presente pesquisa explorou a hipótese de que no carcinoma ductal invasivo da glândula mamária (IDC), seu tipo mais prevalente, ocorra aumento da atividade do

metabolismo do carbono-1 para sustentar vias de sobrevivência e desenvolvimento essencial para seu próprio desenvolvimento.

OBJETIVO

2 OBJETIVO

Avaliar o perfil metabólico de biópsias de tecido tumoral e tecido normal adjacente de mulheres com carcinoma ductal invasivo da glândula mamária (IDC), com foco no metabolismo do carbono-1.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Fomento

O presente estudo foi agraciado por bolsa CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

3.2 Aspectos Éticos

O protocolo da presente investigação científica foi aprovado pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisas do Hospital das Clínicas (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC FMUSP), sob Número de Parecer 1.560.877, e devidamente registrado na Plataforma Brasil (CAAE55763516.3.0000.0065).

3.3 Local de Execução

Os procedimentos envolvidos na presente pesquisa foram realizados no Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo (LIM-35) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC FMUSP), em parceria com o Departamento de Ginecologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

3.4 Desenho do Estudo

Trata-se de estudo retrospectivo que envolveu análise e interpretação de dados metabolômicos obtidos a partir de biópsias de IDC e de seu tecido normal adjacente, provenientes de mulheres com câncer de mama, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Gerreiro da Silva, Professor Adjunto do Departamento de Ginecologia da Escola Paulista de Medicina, Coordenador de Pesquisa e Inovação Tecnológica na área de Biológicas junto à Pró-reitora de Pós-graduação e Pesquisa da UNIFESP (**Anexo A**).

3.5 Casuística e critérios de seleção dos pacientes

Entre 2007 e 2010, pacientes com IDC confirmado por análise histopatológica (n = 90) foram recrutadas voluntariamente, após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, no Instituto Gustave-Russy e Institut Curie (Paris), Universidade de Debrecen (Hungria) e Universidade de Tartu (Estônia). Biópsias de tecido tumoral e de tecido mamário normal adjacente (2-5 cm de distância do tumor) foram coletadas no momento do diagnóstico da doença por análise histopatológica. A inclusão das pacientes obedeceu aos seguintes critérios: idade mínima de 35 anos de idade, ausência de metástases, sem tratamento antineoplásico prévio, IDC operável e nos estádios II e III. O estadiamento da doença foi realizado, de acordo com o sistema de estadiamento TNM^{51, 52}.

3.6 Análise Metabolômica-Alvo

Valores quantitativos dos metabólitos teciduais foram obtidos a partir de 100 mg de amostras de IDC e de tecido mamário normal adjacente (controle) por análise metabolômica-alvo. A análise foi conduzida por espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (LC), com o emprego de instrumento de espectrometria de massas tandem (MS / MS) e diferentes kits e ensaios customizados pela Biocrates® Life Sciences (AG, Innsbruck, Áustria), a saber: AbsoluteIDQ® p180, que quantificou 40 acilcarnitinas, 21 aminoácidos, 19 aminas biogênicas, soma de hexoses, 76 fosfatidilcolinas, 14 lisofosfatidilcolinas, 15 esfingomielinas e 90 glicerofosfolípidios; AbsoluteIDQ® Stero17, que quantificou 17 hormônios esteroides; Bile Acids kit®, que quantificou 20 ácidos biliares; ensaio de neurotransmissores, que quantificou 9 neurotransmissores; ensaio de eicosanóides e outros produtos de oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), que quantificou 17 diferentes tipos dessas moléculas; ensaio de ácidos graxos, que quantificou 32 ácidos graxos; ensaio lipídico, que quantificou 162 glicerofosfolípídios, 33 esfingomielinas e 131 ceramidas. Os glicerofosfolípídios foram diferenciados em relação à presença de ligações éster (a) e éter (e) na porção glicerol, onde duas letras indicam que duas posições de glicerol estão ligadas a um resíduo de ácido graxo (aa = diacil, ae = acil- alquil), e uma única letra indica a presença de um único resíduo de ácido graxo (a = acil ou e = alquil). Adicionalmente, as amostras foram analisadas quanto aos seguintes metabólitos do metabolismo

energético: lactato, piruvato / oxaloacetato, α -cetoglutarato, fumarato e succinato (Biocrates® Life Sciences®). Essa abordagem permitiu a detecção e a quantificação absoluta simultânea de > 600 diferentes metabólitos teciduais (**Anexo B**), sob alto rendimento e em uma abordagem alvo^{53, 54}.

A técnica de análise metabolômica empregada no presente estudo foi descrita em detalhes na patente US2007/0004044 - acessível em <http://www.freepatentsonline.com/20070004044.html>. Em resumo, um esquema de criação de perfil segmentado foi utilizado para rastrear quantitativamente os metabólitos totalmente anotados, usando monitoramento de reação múltipla, perda neutra e varreduras precursoras de íons. A quantificação das concentrações de metabólitos e avaliação de controle de qualidade (QC) foi realizada com o pacote de software MetIQ™ (Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Áustria), em conformidade com 21CFR (Código de Regulamentações Federais) parte 11, o que implica prova de reprodutibilidade dentro de um determinado intervalo de erro. Apenas moléculas ionizáveis de baixo peso molecular ($m/z < 1500$) presentes em, pelo menos, 50% das amostras de cada grupo foram consideradas. Um arquivo .xls foi então gerado, que continha identificação de amostras, nomes de metabólitos e concentrações dos metabólitos teciduais (expressos em μM).

3.7 Análise Estatística

O programa estatístico *MetaboAnalyst 4.0* (Canada) ⁵⁵ foi empregado para a comparação entre os perfis metabólicos de IDC e tecido normal adjacente, após a inserção da tabela com os respectivos metabólitos e concentrações em sua plataforma virtual. Na referida tabela, as amostras apresentavam-se em linhas e as concentrações em colunas. Apenas letras, números, sublinhado, hífen e barra (/) foram aceitos - caracteres diferentes foram excluídos. Os valores não numéricos encontrados foram substituídos por *NA*.

No *MetaboAnalyst 4.0*, os dados metabolômicos foram previamente tratados por filtros específicos e analisados pela aplicação do conjunto de ferramentas estatísticas disponibilizadas pelo programa. Os filtros empregados foram: padronização de amostras (normalização pela mediana), transformação de dados [transformação logarítmica generalizada (LOG) e escala de dados (Escala de Pareto - média centrada e dividida pela raiz quadrada do desvio-padrão de cada variável). As ferramentas estatísticas, sequencialmente, empregadas para avaliar diferenças significantes induzidas pelo processo de carcinogênese foram: PCA (análise multivariada não supervisionada de componentes principais), PLS-DA (análise multivariada supervisionada), análise de RF (*Randon Forest*), análise hierárquica, teste T estudante pareado e taxa de falsa descoberta *FDR* – Benjamini-Hochberg (do inglês, *False Discovery Rate*). Os metabólitos mais importantes, capazes de diferenciar os tecidos tumoral e normal adjacente

por meio de variáveis de importância (VIPs), foram selecionados a partir das análises de RF e teste T. Análise complementar para comparação dos perfis metabolômicos entre os subtipos de câncer de mama também realizada, utilizando-se o teste ANOVA. O nível de significância estatística considerada para todos os testes foi 5% ($p \leq 0,05$). Posteriormente, o conjunto de metabólitos estatisticamente significantes entre os grupos foi submetido à análise de enriquecimento de vias (MSEA; do inglês, *Metabolite set enrichment analysis*), também efetuada com uso da plataforma *MetaboAnalyst 4.0* ⁵⁶.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Características clínico-patológicas das pacientes com IDC

As 90 pacientes com carcinoma ductal invasivo da glândula mamária estudadas apresentaram idade média de 55 anos. Suas características clínico-patológicas encontram-se resumidas nos dados da **Tabela 2**.

Tabela 2 - Características clínico-patológicas das pacientes com carcinoma ductal invasivo (n=90)

Variável	Número de casos
<u>Estado de menopausa</u>	
Peri	4
Sim	51
Não	35
<u>Histórico familiar</u>	
Sim	28
Não	62
<u>Subtipo</u>	
Luminal B Her2-	10
Luminal A	47
Luminal B	5
Her2	8
Triplo negativo	20
<u>Tamanho do tumor (mm)</u>	
5-19	31
20-49	48
50+	6
Dados não coletados	5
<u>Estadiamento</u>	
I	0
II	22
III	68
<u>Índice mitótico</u>	
1	18
2	20
3	52
<u>Comprometimento de linfonodos</u>	
pN0	33
pN1	43
pN2	14
Dados não coletados	2

* Para análise do índice mitótico, foi considerado o grau histológico, atipia, formação de túbulos e proliferação ⁵⁷. ** Para avaliar o histórico familiar, foi utilizado o Score de Gail ⁵⁸.

4.2 Perfil metabólico dos tecidos tumoral e normal adjacente das pacientes com IDC

A **Figura 2** apresenta os dados metabolômicos encontrados nos tecidos tumoral e normal adjacente de mulheres diagnosticadas com IDC, antes e após normalização pela mediana. As análises de comparação por PCA (**Figura 3A**) e, sobretudo, PLS-DA (**Figura 3B**) mostraram separação natural entre os tecidos tumoral maligno e normal adjacente, sugestiva de um conjunto de metabólitos específicos para cada grupo. Os resultados da análise de validação cruzada (do inglês, *cross validation*) [componentes máximos = 5; método *cross validation* (CV) = 10 vezes; medida de desempenho = Q2] apontou boa eficácia e precisão do modelo do estudo (**Figura 4**). Além disso, a análise complementar de modelo de previsão de classes supervisionadas RF classificou com precisão quase 100% das amostras em seus respectivos grupos, com uma classe de erro (OOB; do inglês, *Out-of-bag error*) de 0,0108 para ambos os grupos (**Figura 5**). Os principais metabólitos que contribuíram para essa classificação são mostrados nos dados da **Figura 6**.

Legenda. Análise de normalização dos dados, de acordo com a mediana, realizada pelo software MetaboAnalyst 4.0.

Figura 2 - Normalização dos dados metabolômicos identificados nas amostras de tecido tumoral de pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama

Legenda. **A.** A análise de componentes principais (PCA) mostra a separação natural entre o tecido tumoral (BC-T) e o tecido mamário normal adjacente (BC-S) do carcinoma ductal invasivo da mama. **B.** A análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS-DA) evidencia uma separação robusta entre os grupos (BC-T vs BC-S). Cada ponto no gráfico corresponde a uma amostra de tecido.

Figura 3 - Análise multivariada comparativa entre o perfil metabólico dos tecidos tumoral e normal adjacentes de pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama

PLS-DA cross validation details:

Measure	1 comps	2 comps	3 comps	4 comps	5 comps
Accuracy	0.94667	0.96333	0.96667	0.99	0.98667
R2	0.76411	0.82589	0.87762	0.91483	0.93106
Q2	0.72939	0.77135	0.80968	0.82294	0.82489

Legenda. Q2 é uma estimativa da capacidade preditiva do modelo e é calculada por meio de validação cruzada (CV). Em cada CV, os dados previstos são comparados com os dados originais e a soma dos erros quadrados é calculada. O erro de predição é então somado a todas as amostras (Soma Residual Prevista de Quadrados ou PRESS). Por conveniência, a PRESS é dividida pela soma inicial dos quadrados e subtraída de 1 para se assemelhar à escala do R2. Boas previsões têm alto Q2, como observado na figura.

Figura 4 - Análise de qualidade das amostras de tecidos tumoral e normal adjacente de pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama (*Cross Validation PLS-DA*)

The OOB error is 0.0108

	BC T	BC-S	class.error
BC T	50	0	0.0
BC-S	1	42	0.0233

Random Forest classification

BC-T: IDC; BC-S: tecido mamário normal adjacente. A análise de previsão da classe supervisionada comparando os metabólitos identificados no tecido tumoral (BC-T) e normal adjacente (BC-S) do carcinoma ductal invasivo da mama mostra um baixo erro de classificação global de 0,0108 (0,0 para tecido tumoral e 0,0233 para tecido normal adjacente).

Figura 5 - Classificação dos metabólitos de amostras de tecidos tumoral e normal adjacente de pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama por Random Forest

Legenda. A figura mostra os principais metabólitos capazes de diferenciar tecidos tumorais (BC-T) e normal adjacente (BC-S) do carcinoma ductal invasivo da mama, selecionados a partir do teste de RF e teste T-estudante, onde o código de cores indica: verde: baixa e vermelho: alta concentração. Asn / Asp / Glu: razão entre asparagina, aspartato e glutamato; Gln / gln / asp: razão entre glutamina, glutamina e aspartato; Asn / Asp / Phe: razão entre asparagina, aspartato e fenilalanina; PyrGlu: glutamato piruvato; GCKR: soma de hexoses; lactato / GCKR: razão entre lactato e GCKR; Gly: glicina; PC ae C34: 3: fosfatidilcolina ae C34: 4; Ala-Asp-Glu, soma entre alanina + aspartato + glutamina; PUFA ARAC PC aa: fosfatidilcolina enriquecida com ácido araquidônico; PUFA SM: esfingomielina enriquecida com ácido graxo polinsaturado.

Figura 6 - Variáveis de importância (VIPs) dos metabólitos que mais diferenciam tecido tumoral e normal adjacente de pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama, segundo análise de Random Forest

3.9 Diferenças entre os perfis metabólicos dos tecidos tumoral e normal adjacente das pacientes com IDC

A aplicação do teste T de Student identificou 99 metabólitos diferencialmente expressos ($p < 0,05$; *Benjamini-Hochberg False Discovery Rate*) nas amostras de IDC, quando comparados com o tecido mamário normal adjacente. Em alguns desses metabólitos, foi possível aplicar a análise de *fold change* (FC) para determinar as alterações relativas entre os grupos, cujos resultados encontram-se nos dados da **Tabela 3**. Adicionalmente, a análise de agrupamento hierárquico permitiu observar a homogeneidade dos dados dentro de cada grupo (**Figura 6**).

De acordo com o conjunto de metabólitos significativamente aumentados nas amostras de IDC, a análise de MSEA identificou diferentes vias metabólicas ativas na célula tumoral (**Figura 8**), e as 15 principais delas incluíam componentes do metabolismo do carbono-1 (**Tabela 4**). A interação entre as vias metabólicas identificadas, como significativamente alteradas nas amostras de IDC, estão apresentadas nos dados da **Figura 9**.

Tabela 3 - Metabólitos teciduais que diferenciam os tecidos tumoral e normal adjacente de pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama (continuação)

Metabólito	Nome do Metabólito (Inglês)	HMDB ID ⁵⁹	Valor de P	FDR	FC	Regulação BC-T
AMINOÁCIDOS E AMINAS BIOGÊNICAS						
ADMA	Asymmetric dimethylarginine	HMDB0001539	5.806e-13	7.3405E-12	19.469	↑
Ala	Alanine	HMDB0000161	3.1672e-15	7.0075E-14	41.563	↑
Arg	Arginine	HMDB0000517	8.5278e-10	6.5627E-9	31.418	↑
Asn	Asparagine	HMDB0000168	1.485e-20	5.2568E-19	46.432	↑
Asp	Aspartate	HMDB0000191	4.8124e-22	2.4337E-20	12.524	↑
alpha-KGA	Oxoglutaric acid	HMDB0000208	0.017554	0.038123	12.359	↑
Cit	Citrulline	HMDB0000904	0.013627	0.030151	--	↑
Gln	Glutamine	HMDB0000641	2.0831e-18	5.6723E-17	38.825	↑
Glu	Glutamate	HMDB0000148	6.0883e-24	5.3881E-22	99.616	↑
Gly	Glycine	HMDB0000123	1.5345e-22	1.0864E-20	78.578	↑
His	Histidine	HMDB0000177	3.3125e-10	2.727E-9	23.631	↑
Kyn	Kynurenine	HMDB0000684	0.01887	0.040403	---	↑
Lac	Lactate (Lactic acid)	HMDB0000190	2.6137e-16	6.609E-15	18.465	↑
Leu	Leucine	HMDB0000687	1.4903e-13	2.5123E-12	30.532	↑
Ile	Isoleucine	HMDB0000172	2.0693e-06	9.7673E-6	39.912	↑

continua

Tabela 3 - Metabólitos teciduais que diferenciam os tecidos tumoral e normal adjacente de pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama (continuação)

Metabólito	Nome do Metabólito (Inglês)	HMDB ID ⁵⁹	Valor de P	FDR	FC	Regulação BC-T
Lys	Lysine	HMDB0000182	1.5795e-05	6.0774E-5	43.761	↑
Met	Methionine	HMDB0000696	1.3633e-11	1.3406E-10	39.028	↑
Nitro-Tyr	Nitrotyrosine	HMDB0001904	0.00026981	8.6829E-4	0.070651	↓
PEA	Phenylethylamine	HMDB0012275	1.5117e-07	8.3616E-7	0.085832	↓
Phe	Phenylalanine	HMDB0000159	9.7074e-13	1.185E-11	29.721	↑
Pro	Proline	HMDB0000162	6.2455e-20	2.0099E-18	46.891	↑
Putrescine	Putrescine	HMDB0001414	7.5259e-12	7.8358E-11	3.351	↑
Sarcosine	Sarcosinate	HMDB0000271	0.00026348	8.6364E-4	--	↑
Ser	Serine	HMDB0000187	2.7281e-11	2.5414E-10	29.809	↑
Serotonin	Serotonin	HMDB0000259	7.8817e-06	3.3216E-5	0.12851	↓
Spermidine	Spermidine	HMDB0001257	3.2053e-13	4.3641E-12	54.818	↑
Spermine	Spermine	HMDB0001256	6.8351e-08	4.0327E-7	45.088	↑
Taurine	Taurine	HMDB0000251	0.0001114	3.9046E-4	--	↑
Thr	Threonine	HMDB0000167	3.7902e-16	8.9449E-15	38.468	↑
Trp	Tryptophan	HMDB0000929	2.2204e-07	1.2093E-6	--	↑
Tyr	Tyrosine	HMDB0000158	4.3121e-13	5.6537E-12	2.936	↑
Val	Valine	HMDB0000883	9.7074e-13	6.5574E-11	2.981	↑

continua

Tabela 3 - Metabólitos teciduais que diferenciam os tecidos tumoral e normal adjacente de pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama (continuação)

Metabólito	Nome do Metabólito (Inglês)	HMDM ID ⁵⁹	Valor de P	FDR	FC	Regulação BC-T
Suc	Succinic acid	HMDB0000254	0.0032997	0.0084036	36.703	↑
13s-HODE	13S-hydroxyoctadecadienoic acid	HMDB0004667	7.0576E-4	0.0021354	--	↓
HEXOSES						
GCKR	Soma de Hexoses (Incluindo Glicose)	-	2.5333e-13	3.5871E-12	0.31975	↓
ESFINGOLIPÍDIOS						
SM C18:1	SM(d18:1/18:1(9Z))	HMDB0012101	4.4021e-10	3.5417E-9	0.38281	↓
SM C16:1	SM(d18:0/16:1(9Z))	HMDB0013464	9.2127e-10	6.9389E-9	0.41946	↓
SM C22:1-OH	SM(d18:0/24:1(15Z)(OH))	HMDB0013469	5.304e-06	2.3181E-5	0.4944	↓
SM C22:2-OH	SM(d18:1/24:1(15Z))	HMDB0012107	2.5352e-09	1.8697E-8	0.4205	↓
SM C18:0	SM(d18:0/18:0)	HMDB0012087	0.0016394	0.0045697	--	↓
SM C20:2	SM(D18:0/20:2(11Z,14Z))	HMDB0013465	0.0044364	0.01106	--	↓
FOSFOLÍPIDES						
lysoPC a C18:2	LysoPC(18:2(9Z,12Z))	HMDB0010386	1.2771e-07	7.1758E-7	--	↓
lysoPC a C20:4	LysoPC(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	HMDB0010395	4.9868e-06	2.2066E-5	0.49667	↓
lysoPC a C28:0	lysoPC(28:0)	HMDB0029206	0.00031483	9.951E-4	--	↑
lysoPC a C14:0	LysoPC(14:0/0:0)	HMDB0010379	0.00073737	0.0022121	--	↓
lysoPC a C28:1	LysoPC a C28:1	HMDB0029221	0.0018789	0.0050775	--	↑

continua

Tabela 3 - Metabólitos teciduais que diferenciam os tecidos tumoral e normal adjacente de pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama (continuação)

Metabólito	Nome do Metabólito (Inglês)	HMDB ID ⁵⁹	Valor de P	FDR	FC	Regulação BC-T
lysoPC a C16:1	LPC(16:1)	HMDB0010383	0.0035229	0.0089078	--	↑
PC ae C34:3	PC(o-16:1(9Z)/18:2(9Z,12Z))	HMDB0013413	1.4263e-20	5.2568E-19	0.17503	↓
PC ae C42:1	PC(18:1(9Z)/24:0)	HMDB0008124	1.5247e-11	1.4587E-10	23.219	↑
PC ae C36:0	Phosphatidylcholine(36:0)	HMDB0007886	4.3633e-09	3.0892E-8	26.305	↑
PC ae C30:0	Phosphatidylcholine(30:0)	HMDB0007869	2.9032e-07	1.5572E-6	21.835	↑
PC aa C32:1	PC(14:0/18:1(9Z))	HMDB0007873	1.0255e-06	5.1863E-6	2.853	↑
PC ae C36:5	PC(o-16:1(9Z)/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	HMDB0013415	1.5229e-06	7.4877E-6	0.47189	↓
PC aa C40:3	Phosphatidylcholine(40:3)	HMDB0008086	2.494e-06	1.1466E-5	21.341	↑
PC aa C30:2	PC(16:1(9Z)/14:1(9Z))	HMDB0007999	9.2648e-06	3.8137E-5	42.182	↑
PC ae C36:3	PC(o-18:1(9Z)/18:2(9Z,12Z))	HMDB0013429	1.1172e-05	4.479E-5	--	↓
PC ae C34:0	Phosphatidylcholine(34:0)	HMDB0007878	1.3126e-05	5.163E-5	2.713	↑
PC aa C40:4	PC(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/20:0)	HMDB0008438	1.5074e-05	5.864E-5	--	↑
PC aa C32:2	PC(14:0/18:2(9Z,12Z))	HMDB0007874	3.3458e-05	1.2468E-4	27.925	↑
PC aa C34:1	PC(16:1(9Z)/P-18:0)	HMDB0008028	0.00016654	5.6687E-4	--	↑
PC ae C38:6	1-Palmityl-2-docosaheptaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	HMDB0013409	0.00020708	6.9817E-4	--	↓
PC aa C40:2	PC(18:2(9Z,12Z)/22:0)	HMDB0008150	0.00027566	8.7914E-4	2.051	↑
PC ae C34:1	PC(o-16:1(9Z)/18:0)	HMDB0013412	0.00044131	0.0013704	20.298	↑

continua

Tabela 3 - Metabólitos teciduais que diferenciam os tecidos tumoral e normal adjacente de pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama (continuação)

Metabólito	Nome do Metabólito (Inglês)	HMDB ID ⁵⁹	Valor de P	FDR	FC	Regulação BC-T
PC aa C36:6	PC(18:2(9Z,12Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	HMDB0008142	0.00058899	0.0017974	31.515	↑
PC aa C38:1	PC(18:0/20:1(11Z))	HMDB0008044	0.00079705	0.002371	--	↑
PC aa C24:0	1-tetradecanoyl-2-decanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	*	0.0008608	0.0025394	--	↓
PC ae C38:0	PC(o-18:0/20:0)	HMDB0013419	0.0011155	0.0032106	--	↑
PC aa C42:4	PC(22:1(13Z)/20:3(5Z,8Z,11Z))	HMDB0008572	0.0011397	0.0032536	--	↑
PC ae C36:1	PC(o-18:1(9Z)/18:0)	HMDB0013427	0.0015065	0.0042325	--	↑
PC aa C28:1	PC(14:1(9Z)/14:0)	HMDB0007899	0.0018148	0.0050189	--	↓
PC ae C34:2	PC(O-16:0/18:2(9Z,12Z))	HMDB0011151	0.0030729	0.0079402	--	↓
PC aa C26:0	1-tetradecanoyl-2-dodecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	*	0.0055853	0.013672	--	↓
PC aa C34:4	PC(20:3(5Z,8Z,11Z)/14:1(9Z))	HMDB0008362	0.0097275	0.022216	--	↑
PC ae C42:2	PC(o-18:2(9Z,12Z)/24:0)	HMDB0013438	0.011911	0.026858	--	↑
PC ae C38:2	PC(o-18:1(9Z)/20:1(11Z))	HMDB0013431	0.012539	0.028094	--	↑
PC aa C36:5	PC(P-18:1(11Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	HMDB0011280	0.014215	0.031255	--	↓
PC aa C38:3	PC(18:1(9Z)/20:2(11Z,14Z))	HMDB0008111	0.01521	0.033236	--	↑
PC aa C30:0	PC(P-16:0/14:0)	HMDB0011203	0.020546	0.042724	--	↑

continua

Tabela 3 - Metabólitos teciduais que diferenciam os tecidos tumoral e normal adjacente de pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama (conclusão)

Metabólito	Nome do Metabólito (Inglês)	HMDM ID ⁵⁹	Valor de P	FDR	FC	Regulação BC-T
PC ae C36:4	PC(o-18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z))	HMDB0013435	0.020638	0.042724	--	↓
PC aa C36:1	PC(14:0/22:1(13Z))	HMDB0007887	0.022924	0.046908	--	↑
PC ae C42:0	PC(o-18:0/24:0)	HMDB0013423	0.023853	0.048528	--	↑

Legenda: ID do HMDB: ID do Metabólito obtido do banco de dados do HMDB; valor de p: valores de p obtidos após a realização do teste T-estudante (valor de p <0,05); FC: *fold change*, valores obtidos para determinar alterações relativas entre os grupos; FDR: valor obtido após a realização do falso teste de descoberta; Reg. (BC-T vs BC-S): Regulação entre tecido de câncer de mama e tecido mamário normal adjacente: diminuído (↓) ou aumentado (↑). * Dado não encontrado. – Valor não detectado pela análise de FC.

Legenda. Colunas horizontais: concentração relativa de cada metabólito biologicamente relevante exibindo padrões metabólicos distintos entre BC-T e BC-S. Cada barra nas colunas horizontais representa a intensidade da expressão. Por exemplo, a escala azul indica um nível reduzido, enquanto a escala vermelha, um nível aumentado. O dendrograma à esquerda foi construído com base nos perfis de expressão de intensidade de metabólitos. GCKR: soma de hexoses; lactato / GCKR: razão entre lactato e GCKR; Lac: lactato; Asp: aspartato, Glu: glutamina; Ala-Asp-Glu: soma entre alanina + aspartato + glutamina; BCAA: aminoácido de cadeia ramificada; Xle: soma leucina + isoleucina; Leu: leucina; Gln: glutamina; Gly: glicina; Gluc AA: aminoácidos gliconeogênicos; Pro: prolina; Asn: asparagina; Thr: treonina; Ala: alanina; FADS1: ácido graxo desaturase 1 (análise indireta); C14: 1 / C4: razão entre tetradecanoilcarnitina e butirilcarnitina; C5 / C4: razão entre valerilcarnitina e butirilcarnitina; C3 / C4: razão entre propionil e butirilcarnitina; PUFA ARAC PC ae / SFA: razão entre fosfatidilcolina enriquecida com ácido araquidônico e ácidos graxos saturados; PC aa C34: 3: fosfatidilcolina ae C34: 3; Asn / Asp / Phe: razão entre asparagina, aspartato e fenilalanina; Asn / Asp / Glu: razão entre asparagina, aspartato e glutamina; Gln / Gln / asp: razão entre glutamina, glutamina e aspartato.

Figura 7 - Agrupamento hierárquico de metabólitos diferenciais entre os tecidos tumoral (BC-T) e normal adjacente (BC-S) de pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama

Legenda. O gráfico de barras horizontal resume 50 vias metabólicas, usando metabólitos significativamente alterados no IDC.

Figura 8 - Análise de enriquecimento das vias metabólicas (MSEA) dos metabólitos diferenciais entre os tecidos tumoral e normal adjacente de pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama

Tabela 4 - Análise de enriquecimento das 15 principais vias (MSEA) dos metabólitos diferenciais entre os tecidos tumoral e normal adjacente de pacientes com carcinoma ductal invasivo da mama

Via metabólica	Vias envolvidas no metabolismo do carbono-1
Reciclagem de amônia	
Ciclo da ureia	
Metabolismo de aspartato	
Metabolismo de glicina e serina	Doadores preferenciais para o metabolismo do carbono-1
Síntese de carnitina	
Metabolismo de arginina e prolina	Ciclo da metionina
Metabolismo de alanina	
Oxidação de ácidos graxos de cadeia ramificada	
Transporte de malato-aspartato	
Biossíntese de espermidina e espermina	Ciclo da metionina
Metabolismo do glutamato	
Ciclo de glicose-alanina	
Metabolismo de metionina	Ciclo da metionina
Metabolismo de fenilalanina e tirosina	
Metabolismo da glutatona	Via da transulfuração

Legenda. Na figura, os box-plots indicam concentrações normalizadas dos metabólitos significativamente distintos entre os tecidos tumoral (vermelho) e normal adjacente (verde). Comparados ao tecido mamário normal adjacente, os metabólitos que alimentam o metabolismo do carbono-1 (serina, glicina, treonina e metionina), além das vias

classicamente descritas no câncer (i.e., glicólise, glutaminólise, metabolismo de ácidos graxos), estavam aumentados no IDC. Estes metabólitos parecem trabalhar em conjunto para atender à maioria dos requisitos das vias metabólicas envolvidas na proliferação celular, incluindo a biossíntese celular (síntese de nucleotídeos e aminoácidos e formação de membranas), manutenção do genoma (por meio do *pool* de nucleotídeos), regulação epigenética (processos de metilação) e regulação do estado redox. GCKR: soma de hexoses; G6P: glicose 6-fosfato; F6P: frutose-6-fosfato; F-1,6BP: frutose 1,6-bisfosfato; G3P: gliceraldeído 3-fosfato; 3-PG: 3-fosfoglicerato; 1-3 BG: 1,3-bisfosfoglicerato; 2-PG: 2-fosfoglicerato; PEP: ácido fosfoenolpiruvato; ADMA: dimetilarginina assimétrica; BCAA: aminoácido de cadeia ramificada.

Figura 9 - Marcadores metabólicos associados ao carcinoma ductal invasivo da glândula mamária (IDC), de acordo com os principais metabólitos identificados em biópsias de mulheres portadoras do tumor que se diferenciavam de seu tecido mamário normal adjacente

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Da contribuição do estudo

Alterações metabólicas importantes vêm sendo identificadas no câncer de mama e associam-se com o desenvolvimento e progressão da doença ⁹. O presente estudo buscou contribuir com dados sobre a regulação das vias biológicas subjacentes à transformação maligna no IDC, por meio da análise de seu perfil metabólico com foco no metabolismo do carbono-1. Seus dados confirmaram padrões metabolômicos distintos, com quase nenhuma sobreposição entre IDC e o tecido mamário normal adjacente. Além disso, os metabólitos teciduais marcadores do tumor (n = 99) foram, em sua maioria, envolvidos no metabolismo do carbono-1. Nesse sentido, as observações do presente estudo sugerem que o metabolismo do carbono-1 está intimamente envolvido no processo carcinogênico de IDC e pode constituir alvo molecular potencial para o tratamento da doença.

5.2 Do método

A análise metabolômica oferece oportunidade única para aprofundar a regulação de vias subjacentes em vários processos biológicos. Ela é aplicada, com sucesso, em estudos que buscam identificar marcadores metabólicos envolvidos na transformação maligna e carcinogênese, inclusive

no câncer de mama ^{9, 60}. No presente estudo, foi aplicada a técnica de espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (LC-MS) para gerar um perfil metabolômico abrangente do IDC, com foco no metabolismo do carbono-1. A avaliação conjunta de amostras de tecido tumoral e de tecido mamário normal adjacente permitiu, por comparação, a identificação de vias exclusivamente ativadas na vigência de IDC e, portanto, potencialmente associadas com sua transformação maligna.

A análise metabolômica, empregada nesta investigação, envolveu abordagem-alvo e, portanto, limita-se a quantificação de metabólitos pré-definidos - o que pode ser discutido como potencial limitação do estudo, no entanto, a metabolômica-alvo evita a identificação putativa ou múltipla de um mesmo metabólito (em razão da presença de isótopos), vieses comumente intrincados às análises metabolômicas com abordagem global ou *shotgun* ^{61, 62}. Além disso, ao empregar diferentes kits comerciais que, com alvo nos principais metabólitos previamente identificados por plataformas globais (até 600 metabólitos) a abordagem alvo do presente estudo abrangeu, praticamente, o universo metabolômico de tumores de mama ⁶³.

Para avaliação estatística dos dados metabolômicos, análises de classificação multivariadas (PCA e PLS-DA) foram complementadas com modelo de previsão de classes supervisionadas, *Random Forest* (RF). O uso desta ferramenta permitiu determinar a capacidade do perfil metabolômico para classificar com precisão amostras de tecidos tumoral maligno e normal adjacente em seus respectivos grupos, bem como identificar os metabólitos

mais importantes para predição de classes e, portanto, com maior correlação com o tumor (considerando-se a classe “tecido tumoral”).

Uma possível restrição metodológica do presente estudo foi ter avaliado subtipos heterogêneos da IDC, e limitar-se a compreender se a ativação do metabolismo do carbono-1 é uma característica universal da doença. No entanto, embora tenha envolvido grupos numericamente desequilibrados, a análise individual de cada subtipo forneceu observações metabolômicas similares àquela obtida em toda a amostra de IDC (**Anexo C**). Além disso, os dados metabolômicos presentemente encontrados mostraram ativação do carbono-1 altamente associada à proliferação celular; todas as amostras de IDC estudadas foram de tumores primários com estado proliferativo acentuado, independentemente, de seu subtipo. Portanto, considerando-se que a proliferação acentuada é característica comum do desenvolvimento do carcinoma mamário, o conjunto de observações metabolômicas do presente estudo permite inferir a ativação da via do carbono-1, como característica geral de IDC.

5.3 Dos resultados

Como principal doador de unidades de carbono para o metabolismo do carbono-1, a serina pode ser sintetizada endogenamente *de novo* a partir de substratos que incluam glicose e seus intermediários^{22, 32}. Por exemplo, 3-PG (do inglês, *3-phosphoglycerate*) é um metabólito intermediário da via glicolítica que pode ser oxidado para formar pPYR (do inglês, *3-phospho-*

hydroxypyruvate), como reação inicial para a síntese de serina ^{22, 64, 65}. No presente estudo, observou-se diminuição na soma de hexoses (GCKR) em paralelo aos níveis aumentados de serina e lactato, sugerindo que a glicólise possa participar da síntese *de novo* de serina no IDC.

Em concordância, a síntese *de novo* de serina a partir da glicose vem sendo descrita em doenças malignas ^{39, 65}. Estudos reportam desvio de, aproximadamente, 10% de 3-PG da via glicolítica para o metabolismo do carbono-1 por subconjuntos de células tumorais (incluindo tumores de mama), que resultam em grandes quantidades de biossíntese *de novo* de serina ⁶⁶. O processo mostrou envolver a participação ativa da enzima PHGDH (do inglês, phosphoglycerate dehydrogenase; também conhecida como 3PGDH), cuja superexpressão é reportada em câncer de mama triplo negativo ^{39, 65, 66}.

O excesso de lactato gerado a partir da glicólise, sugerido pelos presentes dados metabolômicos, implica diminuição do pH do tumor. A acidificação do ambiente extracelular pode auxiliar no escape imunológico de células tumorais ⁶⁷ e é considerada mecanismo importante pelo qual a glicólise anaeróbica (efeito Warburg) contribui para a agressividade do câncer ⁶⁸. De forma coerente, na presente investigação, o aumento do efeito Warburg foi observado na análise de enriquecimento de vias das amostras tumorais, em paralelo ao aumento indireto no metabolismo da β -alanina. Como β -alanina pode ser metabolizada em carnosina (um tampão intracelular), esses achados permitem sugerir um mecanismo

autorregulatório neoplásico contra a acidificação excessiva e um *feedback* negativo da glicólise ⁶⁹.

Adiciona-se que, além da serina, existem outras vias alternativas de entrada para o metabolismo do carbono-1. Um sistema de clivagem enzimática de glicina que produz amônia (NH₃), dióxido de carbono (CO₂) e unidades de carbono é ativo em algumas células cancerígenas ²². A conversão de treonina, colina e betaína em glicina também foi já foi reportada e pode sustentar esse processo ⁷⁰. No presente estudo, além da serina, todos esses doadores alternativos iniciais de carbono estiveram significativamente aumentados nas amostras de IDC, em comparação ao tecido mamário normal adjacente, o que sugere alta atividade do metabolismo do carbono-1 no câncer de mama.

O metabolismo do carbono-1 desencadeado sobretudo pela serina, envolve a doação de um átomo de carbono pela cadeia lateral desse aminoácido não essencial ao folato, uma vitamina B que é amplamente adicionada aos alimentos (como farinha de trigo) e consumida nas dietas ocidentais, gerando metionina, como um de seus produtos finais ^{22, 71}. Uma vez dentro da célula, o folato é reduzido por uma série de reações enzimáticas à tetra-hidrofolato (THF; do inglês, *tetrahydrofolate*). O THF participa como suporte de um conjunto de reações metabólicas que movimentam átomos de carbono para diferentes posições ao longo da fração THF e com o ciclo da metionina, gera metil-tetra-hidrofolato (mTHF; do inglês, *methyl-THF*). O mTHF doa um carbono por meio da metilação da homocisteína e, assim, gera metionina. O ciclo do folato acoplado ao ciclo da

metionina constitui uma via metabólica bicíclica que distribui unidades de carbono e grupos metil ^{28, 42, 43}. Na sequência, o ciclo da metionina liga-se à via de transulfuração por meio da homocisteína o que, eventualmente, resulta na geração de glutathione - um dos principais sistemas de regulação redox nas células ^{22, 32, 70}. Pela análise de enriquecimento de vias, com base no conjunto de metabólitos significativamente alterados, o presente estudo mostrou enriquecimento no metabolismo de folato, metionina, homocisteína e glutathione, sugerindo aumento da atividade de todos os ciclos que compõem o metabolismo do carbono-1 em amostras de IDC.

As unidades de carbono geradas pela ativação do metabolismo do carbono-1 podem atender à maioria das exigências das vias metabólicas envolvidas na proliferação celular, incluindo biossíntese celular (síntese de nucleotídeos e aminoácidos, tradução de proteínas e formação de membrana), manutenção do genoma (por meio do *pool* de nucleotídeos) regulação epigenética (metilação) e regulação do estado redox ^{22, 72}. As células cancerígenas em proliferação, geralmente, exigem nucleotídeos (purinas e pirimidinas) para a síntese rápida de componentes celulares, que é preenchida pelo ciclo do folato e pelo metabolismo do aspartato ^{72, 73, 74}. Em particular, o aumento nos níveis de aspartato permite a proliferação de células cancerosas, especialmente, sob condições hipóxicas ⁷⁵. Além disso, a biossíntese de poliaminas, espermidina e espermina e seu precursor, putrescina, pelo ciclo da metionina, é necessária para garantir a estabilidade e a função dos nucleotídeos ⁷⁶.

Nesse contexto, o aumento do metabolismo de aspartato, purinas e a biossíntese de espermidina e espermina observadas no presente estudo, em amostras de IDC permitem sugerir que as células de câncer de mama estão em alta proliferação. De fato, o aumento das taxas de proliferação nas células de carcinoma ductal invasivo é consistente com o grau histopatológico de nossas amostras, onde > 70% dos casos de IDC apresentam alto índice mitótico (graus 2 e 3). Além disso, o metabolismo da prolina também se mostrou aumentado nas amostras de IDC, por nós estudadas, sugerindo remodelação da matriz extracelular, para acomodar novas células para o crescimento do tumor ⁷⁶.

Alterações no metabolismo de células cancerosas também podem influenciar diretamente a regulação epigenética e promover transformação. Particularmente, a ativação do ciclo da metionina, sugerida pelos dados do presente estudo, fornece uma importante fonte de substratos para modificações pós-traducionais que envolvem metilação ^{22, 77}. Processos de metilação e acetilação são reconhecidos como mecanismos críticos para a expressão gênica e regulação na síntese de proteínas no DNA (do inglês, *deoxyribonucleic acid*), RNA (do inglês, *ribonucleic acid*) e aminoácidos, como a lisina e a arginina ^{22, 77}. Mais especificamente, a metilação da arginina, uma modificação pós-traducional comum que está implicada em diferentes processos celulares leva à produção de ADMA (do inglês, *asymmetric dimethyl arginine*) ⁷⁸. A principal função de ADMA é inibir a síntese de óxido nítrico, funcionando como inibidor endógeno de NO síntase (do inglês, *nitric oxide synthase*). Esta atividade metabólica resulta no

aumento da produção de ROS (do inglês, *reactive oxygen species*) por meio de aumento na relação NADPH / NADP⁺ (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)^{78, 79}.

O aumento da disponibilidade de NADPH vem sendo considerado vantagem para o metabolismo do carbono-1, pois cada volta do ciclo do folato consome uma molécula de NADPH²². No presente estudo, o aumento preditivo no metabolismo da nicotinamida e ADMA foi observado nas amostras de IDC (*versus* tecido mamário normal adjacente), sugerindo a entrada de unidades de NADPH no ciclo do folato⁸⁰. Considerando-se que altos níveis de ROS são gerados por níveis elevados de NADPH na formação de ADMA, esta observação poderia implicar desvantagem para o tumor.

De fato, em cânceres de mama, a geração de ROS vem sendo associada à indução de apoptose de células tumorais, fazendo com que a capacidade de regular o estresse oxidativo seja fator importante para que o tumor desenvolva-se^{80, 81}. Curiosamente, no presente estudo, o aumento no metabolismo da nicotinamida associado ao aumento de ADMA (ambos provenientes do ciclo da metionina, componente do metabolismo do carbono-1), ocorreu em paralelo ao aumento do metabolismo da glutatona. A glutatona constitui uma saída da via de transulfuração, último componente do metabolismo do carbono-1. Enquanto NADPH e ADMA podem promover estresse oxidativo, a glutatona é importante para a manutenção do estado redox^{22, 78}. Nesse contexto, os presentes achados sugerem a potencial relevância do metabolismo do carbono-1 no câncer de mama, permitindo a

doação de unidades de carbono para processos de proliferação, enquanto busca não comprometer substancialmente a sobrevivência de células tumorais por elevação de estresse oxidativo.

Na vigência do acúmulo de ROS, células cancerosas podem ainda ativar a autofagia de mitocôndrias defeituosas ⁸². Mitocôndrias são organelas bioenergéticas, biossintéticas e sinalizadoras importantes na detecção de estresse permitindo adaptação celular ao microambiente ⁸³. Por sua vez, a aptidão mitocondrial é importante para a ativação do metabolismo do carbono-1, uma vez que a maioria de suas reações químicas ocorre dentro das mitocôndrias ^{22, 82}.

As mitocôndrias contribuem para o metabolismo bioenergético dentro das células hospedeiras por meio do ciclo do TCA, que utiliza como substratos produtos da degradação de aminoácidos, como acetil-CoA e / ou succinil-CoA provenientes dos BCAAs (do inglês, *branched chain amino acid*) ^{29, 84}. Os dados metabolômicos do presente estudo evidenciaram ativação do ciclo TCA e degradação de BCAA, sugerindo aptidão mitocondrial nas células malignas.

Ademais, na mitocôndria, a glutamina é convertida em glutamato e α -cetoglutarato e, além de atuar como um cofator de biotina, é essencial para a atividade do *shuttle* malato-aspartato, que transloca os elétrons produzidos durante a glicólise por meio da membrana mitocondrial interna ⁸⁵. Defeitos nesse transporte *via* malato-aspartato, podem afetar negativamente a fosforilação oxidativa ⁸⁶. Aumento nos metabólitos de succinil-CoA e α -cetoglutarato, metabolismo de biotina e enriquecimento do *shuttle* malato-

aspartato, em paralelo à ativação do ciclo do TCA e degradação de BCAA, foi observado por nós em amostras de IDC, o que pode reforçar a existência de aptidão mitocondrial e sugerir interação metabólica entre TCA e a via glicolítica, além da alta exigência metabólica das células cancerígenas.

Altas exigências de metabólitos para a proliferação celular podem ser diretamente supridas pelo metabolismo do carbono-1 por meio de seu subproduto, a amônia ²². A amônia pode ser utilizada para síntese de aminoácidos *de novo* ou catabolizada em ureia, para excreção. Por exemplo, em camundongos, a amônia acumulada no microambiente tumoral foi usada diretamente para gerar aminoácidos (reciclagem) e acelerar a proliferação do câncer de mama ⁸⁷. De forma similar, as observações do presente estudo evidenciaram enriquecimento da reciclagem de amônia em amostras de IDC (vs. tecido mamário normal adjacente). No entanto, este enriquecimento foi acompanhado pelo aumento no ciclo da ureia, sugerindo que, no IDC, a proliferação foi acompanhada por intenso metabolismo de aminoácidos, com contribuição muito semelhante para síntese e catabolismo.

Além disso, o desenvolvimento e a progressão do câncer requerem fosfolipídios de membrana, que também podem ser parcialmente gerados pelo metabolismo do carbono-1 ²². Compreendendo, aproximadamente, 50% dos fosfolipídios da membrana, as fosfatidilcolinas têm sua porção colina sintetizada a partir do ciclo da metionina, enquanto os ácidos graxos são supridos pela captação e / ou síntese *de novo* ^{22, 88, 89}. Além do aumento da atividade do ciclo da metionina nas amostras de IDC, o presente estudo também encontrou metabolismo alterado de ácidos graxos no tumor,

consistente com achados anteriores em carcinomas ductais invasivos⁹. Especificamente, maiores níveis de ácidos graxos saturados (SFA; do inglês, *saturated fatty acid*) e menores níveis ácidos graxos poli-insaturados (PUFA; do inglês, *polyunsaturated fatty acids*), foram presentemente observados (**Figura 8**).

Maiores níveis de SFAs podem contribuir para compor a estrutura de *lipid rafts*, microdomínios de membrana que funcionam como plataformas para moléculas sinalizadoras, potencializando vias de sinalização oncogênica, como da proliferação celular (i.e., a partir de HER-2)^{90, 91}. Menores níveis de PUFAs podem refletir mecanismo de proteção de membranas celulares à oxidação, já que a presença de duplas ligações torna as moléculas de lipídios mais susceptíveis à peroxidação lipídica⁹². No presente estudo, níveis diminuídos de PUFAs no IDC incluíram metabolitos envolvidos no metabolismo do ácido araquidônico (AA, do inglês, *arachidonic acid*). O maior enriquecimento destes PUFAs no tecido mamário normal adjacente, em lugar das amostras de IDC, sugere contribuição metabólica para a sobrevivência celular: Esta alteração foi previamente descrita, como mecanismo promotor de evasão ao sistema imunológico no tumor e contribuinte para a inflamação no tecido normal adjacente, aumentando a oportunidade de novas mutações^{22, 93}. Portanto, estes achados moleculares sugerem reprogramação do metabolismo lipídico no carcinoma ductal invasivo da glândula mamária para atender, tanto a síntese da membrana celular, como a sinalização mediada por proteínas de superfície para proliferação, enquanto favorece a sobrevivência celular.

Em conjunto, as observações do presente estudo apoiam o papel auxiliar de várias vias metabólicas envolvidas no desenvolvimento do câncer de mama, onde a ativação do metabolismo do carbono-1 parece ser fundamental. A extensão em que estas vias metabólicas representam verdadeiras vulnerabilidades, ainda precisa ser determinada. Estudos que examinam a eficácia da segmentação do metabolismo de folato e nucleotídeos com metotrexato, pemetrexede e outros agentes com alvo no metabolismo do carbono-1 já demonstraram benefícios clínicos ^{22, 94, 95}. Neste cenário, as observações, presentemente, levantadas oferecem subsídios para considerar o uso destes agentes no tratamento de câncer de mama, particularmente, IDC.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo, em mulheres com carcinoma ductal invasivo da glândula mamária (IDC) foram identificadas diferenças no perfil metabolômico de biópsias de tecidos tumoral e normal adjacente. As alterações encontradas foram majoritariamente associadas à ativação do metabolismo do carbono-1.

6.1 Corolário

As observações permitem sugerir que o metabolismo do carbono-1 está envolvido no desenvolvimento de IDC e pode constituir alvo molecular potencial para o tratamento da doença. Uma vez que o metabolismo do carbono-1 é sensível à disponibilidade de nutrientes, modificações dietéticas também podem ser exploradas para prevenir o câncer de mama ou como estratégia complementar às drogas antimetabólicas empregadas em sua terapia.

PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

O conhecimento dos requisitos metabólicos das células epiteliais e estromais mamárias pode não apenas oferecer subsídios que norteiem o desenvolvimento de terapias, mas também a prevenção do câncer ⁹⁶. Sabe-se que a obesidade aumenta o risco de câncer de mama ⁹⁷. A estrutura resultante do excesso de nutrientes, como carboidratos, farinha de trigo, gorduras (especialmente, ácidos graxos saturados) e alimentos industrializados, promove disbiose intestinal, resistência à insulina e aumento da inflamação. Este desequilíbrio metabólico pode contribuir ainda mais para a disponibilidade aumentada de nutrientes (como glicose, aminoácidos e ácidos graxos) na corrente sanguínea, favorecendo sua captura por células cancerígenas, uso pelo metabolismo do carbono-1 e direcionamento para o crescimento do tumor.

Estudos pré-clínicos e clínicos mostraram que a restrição energética e a substituição de carboidratos, gorduras (sobretudo dos SFA) e alimentos industrializados por fibras, ácidos graxos ômega-3 e alimentos *in natura* podem diminuir a contribuição da obesidade no desenvolvimento do câncer de mama e, talvez, no metabolismo do carbono-1 ^{22, 96}. Nesse sentido, intervenções dietéticas podem auxiliar não apenas no tratamento da obesidade, mas também na prevenção de tumores que a têm como fatores de risco, como o câncer de mama. Estudos que identifiquem em outros tipos de tumores o metabolismo do carbono-1, como alteração metabólica

importante podem estender esta abordagem para a prevenção e tratamento de outras malignidades.

ANEXOS

8 ANEXOS

A. Carta de propriedade

Carta de doação de banco de dados metabolômicos de biópsias de tumores de mama humanos e seus tecidos normais adjacentes.

São Paulo, 03 de Março de 2016.

DECLARAÇÃO

Eu, Ismael Dale Cotrim Gerreiro da Silva, Professor Adjunto do Departamento de Ginecologia da Escola Paulista de Medicina, Coordenador de Pesquisa e Inovação Tecnológica na área de Biológicas junto à Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa da UNIFESP, declaro que sou proprietário do banco de dados referente à **mensuração bioquímica dos resultados metabólicos de pacientes com câncer de mama**.

O referido banco de dados contém resultados metabólicos a partir de amostras de tumor primário e tecido adjacente, bem como de plasma de pacientes com câncer de mama, selecionados a partir de uma coorte de 182 pacientes. As pacientes são provenientes do *Institut Gustave-Russy* e *Institut Curie*, ambos de Paris, da University of Debrecen, da Hungria, e University of Tartu, Estônia.

As amostras biológicas foram coletadas entre os anos de 2007 a 2010, e a análise dos metabólitos teciduais e plasmáticos foi realizada pela empresa Biocrates, na Austria. Após análise, nenhum dado foi removido ou submetido a correção. Todos os detalhes metodológicos da avaliação metabólica podem ser observados através da patente US 2007/0004044 (acessível online em <http://www.freepatentsonline.com/20070004044.html>).

A companhia não teve acesso a qualquer informação fenotípica que pudesse interferir na análise bioquímica. O controle da qualidade da análise foi baseada em controles internos e duplicatas.

A interpretação biológicas dos achados metabólicos será de responsabilidade da aluna de mestrado Jéssica Reis Santos, sob a orientação da pesquisadora científica Graziela Ravacci, ambas do Departamento de Gastroenterologia – LIM35, da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP).

De acordo,

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Gerreiro da Silva

Dra. Graziela Ravacci

Ms. Jéssica Reis Santos

B. Descrição dos kits Biocrates®

Absolute/DQ® p180: Kit / Service 1

Acylcarnitines (40)			
C0	Carnitine	C10:1	Decenoylcarnitine
C2	Acetylcarnitine	C10:2	Decadienylcarnitine
C3	Propionylcarnitine	C12	Dodecanoylcarnitine
C3:1	Propenoylcarnitine	C12:1	Dodecenoylcarnitine
C3-OH	Hydroxypropionylcarnitine	C12-DC	Dodecanedioylcarnitine
C4	Butyrylcarnitine	C14	Tetradecanoylcarnitine
C4:1	Butenoylcarnitine	C14:1	Tetradecenoylcarnitine
C4-OH (C3-DC)	Hydroxybutyrylcarnitine	C14:1-OH	Hydroxytetradecenoylcarnitine
C5	Valerylcarnitine	C14:2	Tetradecadienylcarnitine
C5:1	Tiglylcarnitine	C14:2-OH	Hydroxytetradecadienylcarnitine
C5:1-DC	Glutaconylcarnitine	C16	Hexadecanoylcarnitine
C5-DC (C6-OH)	Glutaryl carnitine (Hydroxyhexanoylcarnitine)	C16:1	Hexadecenoylcarnitine
C5-M-DC	Methylglutaryl carnitine	C16:1-OH	Hydroxyhexadecenoylcarnitine
C5-OH (C3-DC-M)	Hydroxyvalerylcarnitine (Methylmalonylcarnitine)	C16:2	Hexadecadienylcarnitine
C6 (C4:1-DC)	Hexanoylcarnitine (Fumaryl carnitine)	C16:2-OH	Hydroxyhexadecadienylcarnitine
C6:1	Hexenoylcarnitine	C16-OH	Hydroxyhexadecanoylcarnitine
C7-DC	Pimelylcarnitine	C18	Octadecanoylcarnitine
C8	Octanoylcarnitine	C18:1	Octadecenoylcarnitine
C8:1 (p150 only)	Octenoylcarnitine	C18:1-OH	Hydroxyoctadecenoylcarnitine
C9	Nonanoylcarnitine	C18:2	Octadecadienylcarnitine
C10	Decanoylcarnitine		

Amino Acids (21)			
Ala ³⁾	Alanine	Lys ³⁾	Lysine
Arg	Arginine	Met	Methionine
Asn ³⁾	Asparagine	Orn	Ornithine
Asp ³⁾	Aspartate	Phe	Phenylalanine
Cit ³⁾	Citrulline	Pro	Proline
Gln	Glutamine	Ser	Serine
Glu ³⁾	Glutamate	Thr	Threonine
Gly	Glycine	Trp	Tryptophan
His	Histidine	Tyr	Tyrosine
Ile ^{3) 4)}	Isoleucine	Val	Valine
Leu ^{3) 4)}	Leucine		

Monosaccharides (1)

Sum of Hexoses (including Glucose)

Glycerophospholipids (90)			
lysoPC a C14:0	PC aa C34:1	PC aa C42:0	PC ae C38:2
lysoPC a C16:0	PC aa C34:2	PC aa C42:1	PC ae C38:3
lysoPC a C16:1	PC aa C34:3	PC aa C42:2	PC ae C38:4
lysoPC a C17:0	PC aa C34:4	PC aa C42:4	PC ae C38:5
lysoPC a C18:0	PC aa C36:0	PC aa C42:5	PC ae C38:6
lysoPC a C18:1	PC aa C36:1	PC aa C42:6	PC ae C40:1
lysoPC a C18:2	PC aa C36:2	PC ae C30:0	PC ae C40:2
lysoPC a C20:3	PC aa C36:3	PC ae C30:1	PC ae C40:3
lysoPC a C20:4	PC aa C36:4	PC ae C30:2	PC ae C40:4
lysoPC a C24:0	PC aa C36:5	PC ae C32:1	PC ae C40:5
lysoPC a C26:0	PC aa C36:6	PC ae C32:2	PC ae C40:6
lysoPC a C26:1	PC aa C38:0	PC ae C34:0	PC ae C42:0
lysoPC a C28:0	PC aa C38:1 ⁹⁾	PC ae C34:1	PC ae C42:1
lysoPC a C28:1	PC aa C38:3	PC ae C34:2	PC ae C42:2
PC aa C24:0	PC aa C38:4	PC ae C34:3	PC ae C42:3
PC aa C26:0	PC aa C38:5	PC ae C36:0	PC ae C42:4
PC aa C28:1	PC aa C38:6	PC ae C36:1	PC ae C42:5
PC aa C30:0	PC aa C40:1	PC ae C36:2	PC ae C44:3
PC aa C30:2 ⁹⁾	PC aa C40:2	PC ae C36:3	PC ae C44:4
PC aa C32:0	PC aa C40:3	PC ae C36:4	PC ae C44:5
PC aa C32:1	PC aa C40:4	PC ae C36:5	PC ae C44:6
PC aa C32:2	PC aa C40:5	PC ae C38:0	
PC aa C32:3	PC aa C40:6	PC ae C38:1	

Sphingolipids (15)			
SM (OH) C14:1	SM C18:0	SM (OH) C22:1	SM (OH) C24:1
SM C16:0	SM C18:1	SM (OH) C22:2	SM C26:0
SM C16:1	SM C20:2	SM C24:0	SM C26:1
SM (OH) C16:1	SM C22:3 ⁹⁾	SM C24:1	

Biogenic Amines (21)			
Ac-Orn	Acetylmethionine	PEA	Phenylethylamine
ADMA	Asymmetric dimethylarginine	cis-OH-Pro	cis-4-Hydroxyproline
alpha-AAA	alpha-Aminoadipic acid	trans-OH-Pro	trans-4-Hydroxyproline
Carnosine	Carnosine	Putrescine	Putrescine
Creatinine	Creatinine	Sarcosine (UHPLC only)	Sarcosine
DOPA	DOPA	SDMA	Symmetric dimethylarginine
Dopamine	Dopamine	Serotonin	Serotonin
Histamine	Histamine	Spermidine	Spermidine
Kynurenine	Kynurenine	Spermine	Spermine
Met-SO	Methionine sulfoxide	Taurine	Taurine
Nitro-Tyr ⁹⁾	Nitrotyrosine		

Stero17/Stero/DQ: Kit / Service 2

Steroid Hormones (17)	
Aldosterone	11-Deoxycortisol
Androstenedione	Dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S)
Androsterone	β -Estradiol (E2)
Corticosterone	Estrone (E1)
Cortisol	Etiocolanone
Cortisone	17 α -Hydroxyprogesterone
Dehydroepiandrosterone (DHEA)	Progesterone
11-Deoxycorticosterone	Testosterone
Dihydrotestosterone (DHT) (Stero17 only)	

Biocrates® Bile Acids: Kit / Service 3

Bile Acids (20)	
CA	Cholic acid
CDCA	Chenodeoxycholic acid
DCA	Deoxycholic acid
GCA	Glycocholic acid
GCDCA	Glycochenodeoxycholic acid
GDCA	Glycodeoxycholic acid
GLCA	Glycolithocholic acid
GUDCA	Glycoursodeoxycholic acid
HDCA	Hyodeoxycholic acid
LCA	Lithocholic acid
MCA α	Alpha-Muricholic acid
MCA β	Beta-Muricholic acid
MCA ω	Omega-Muricholic acid
TCA	Taurocholic acid
TCDCA	Taurochenodeoxycholic acid
TDCA	Taurodeoxycholic acid
TLCA	Tauroolithocholic acid
TMCA α/β	Tauromuricholic acid (sum of alpha and beta)
TUDCA	Tauroursodeoxycholic acid
UDCA	Ursodeoxycholic acid

Neurotransmitter Assay: Service 4

Neurotransmitters (9)	
γ-Amino-butyric acid (GABA)	Glutamate
DOPA	Glutamine
Dopamine	5-Hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA)
Epinephrine	Serotonin
	Norepinephrine

Eicosanoid Assay: Service 5

Eicosanoids and other Oxidation Products of Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) (17)	
Leukotriene B ₄	9S-HODE
Thromboxane B ₂	13S-HODE
Leukotriene D ₄	14(15)-EpETE
Prostaglandin E ₂	12S-HETE
8-iso-Prostaglandin F _{2α}	15S-HETE
Prostaglandin F _{2α}	Arachidonic acid
6-keto-Prostaglandin F _{1α}	Docosahexaenoic acid
Prostaglandin D ₂	15-deoxy PGJ ₂
tetranor PGE-M	

Fatty Acids Assay: Service 6a (free) and 6b (total)

Fatty Acids (31/32)			
C12:0	Lauric acid	C19:0	Nonadecanoic acid
C13:0	Tridecanoic acid	cis-C18:3w6	γ-Linolenic acid
C14:0	Myristic acid	cis-C18:3w3	Linolenic acid
cis-C14:1w5	Myristoleic acid	cis-C18:4w3	Stearidonic acid
C15:0	Pentadecanoic acid	C20:0	Arachidic acid (Eicosanoic acid)
C16:0	Palmitic acid	cis-C20:2w6	cis-11,14-Eicosenoic acid
cis-C16:1w10	Sapienic acid	cis-C20:1w9	cis-11-Eicosenoic acid
cis-C16:1w7	Palmitoleic acid	C21:0	Henicosanoic acid
C17:0	Heptadecanoic acid	cis-C20:3w6	cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid
C18:0	Stearic acid	cis-C20:4w6	Arachidonic acid
cis-C18:1w9	Oleic acid	C22:0	Behenic acid
cis-C18:1w7	Vaccenic acid	cis-C20:5w3	EPA (cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid)
cis-C18:2w6	Linoleic acid	cis-C22:1w9 ⁷⁾	Erucic acid
cis-C22:4w6	Adrenic acid (cis-7,10,13,16-Docosatetraenoic acid)	C23:0	Tricosanoic acid
cis-C22:5w3	DPA (cis-7,10,13,16,19-Docosapentaenoic acid)	C24:0	Lignoceric acid
cis-C22:6w3	DHA (cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid)	cis-C24:1w9	Nervonic acid

⁷⁾ Accour 8a only

Lipid Assay: Service 7

Glycerophospholipids (162)			
Lysophosphatidylcholines (acyl or ether bond)		Phosphatidylglycerols (acyl/ether bonds) ^{a)}	
LPC a C16:0	LPC a C18:2	PG ae C32:0	PG ae C34:1
LPC a C18:0	LPC a C20:4	PG ae C34:0	PG ae C36:1
LPC a C18:1	LPC e C18:0	Lysophosphatidylethanolamines (acyl or ether bond) ^{a)}	
Phosphatidylcholines (diacyl bonds)		LPE a C16:0	LPE a C22:4
PC aa C30:0	PC aa C36:4	LPE a C18:0	LPE a C22:5
PC aa C30:1	PC aa C36:5	LPE a C18:1	LPE a C22:6
PC aa C30:2	PC aa C38:1	LPE a C18:2	LPE e C18:0
PC aa C32:0	PC aa C38:2	LPE a C20:4	
PC aa C32:1	PC aa C38:3	Phosphatidylethanolamines (diacyl bonds) ^{a)}	
PC aa C32:2	PC aa C38:4	PE aa C20:0	PE aa C38:0
PC aa C34:0	PC aa C38:5	PE aa C22:2	PE aa C38:1
PC aa C34:1	PC aa C38:6	PE aa C26:4	PE aa C38:2
PC aa C34:2	PC aa C40:4	PE aa C28:4	PE aa C38:3
PC aa C34:3	PC aa C40:5	PE aa C28:5	PE aa C38:4
PC aa C36:0	PC aa C40:6	PE aa C34:0	PE aa C38:5
PC aa C36:1	PC aa C40:7	PE aa C34:1	PE aa C38:6
PC aa C36:2	PC aa C40:8	PE aa C34:2	PE aa C38:7
PC aa C36:3		PE aa C34:3	PE aa C40:2
Phosphatidylcholines (acyl/ether bonds)		PE aa C36:0	PE aa C40:3
PC ae C32:0	PC ae C36:3	PE aa C36:1	PE aa C40:4
PC ae C32:1	PC ae C36:4	PE aa C36:2	PE aa C40:5
PC ae C32:6	PC ae C36:5	PE aa C36:3	PE aa C40:6
PC ae C34:0	PC ae C38:1	PE aa C36:4	PE aa C40:7
PC ae C34:1	PC ae C38:2	PE aa C36:5	PE aa C48:1
PC ae C34:2	PC ae C38:3	Phosphatidylethanolamines (acyl/ethyl bonds) ^{a)}	
PC ae C34:3	PC ae C38:4	PE ae C34:1	PE ae C38:5
PC ae C34:6	PC ae C38:5	PE ae C34:2	PE ae C38:6
PC ae C36:1	PC ae C38:6	PE ae C34:3	PE ae C40:1
PC ae C36:2	PC ae C40:5	PE ae C36:1	PE ae C40:2
Lysophosphatidylglycerols (ether bond) ^{b)}		PE ae C36:2	PE ae C40:3
LPG e C14:2		PE ae C36:3	PE ae C40:4
Phosphatidylglycerols (diacyl bonds) ^{b)}		PE ae C36:4	PE ae C40:5
PG aa C30:0	PG aa C34:3	PE ae C36:5	PE ae C40:6
PG aa C32:0	PG aa C36:0	PE ae C38:1	PE ae C42:1
PG aa C32:1	PG aa C36:1	PE ae C38:2	PE ae C42:2
PG aa C33:6	PG aa C36:2	PE ae C38:3	PE ae C46:5
PG aa C34:0	PG aa C36:3	PE ae C38:4	PE ae C46:6
PG aa C34:1	PG aa C36:4		
PG aa C34:2	PG aa C38:5		

Phosphatidylserines (diacyl bonds) ^[6]		Phosphatidylserines (acyl/ether bonds) ^[6]	
PS aa C34:1	PS aa C36:2	PS ae C34:2	PS ae C36:2
PS aa C34:2	PS aa C36:3	PS ae C36:1	PS ae C38:4
PS aa C36:0	PS aa C36:4		
PS aa C36:1	PS aa C38:1		
PS aa C38:2	PS aa C40:5		
PS aa C38:3	PS aa C40:6		
PS aa C38:4	PS aa C40:7		
PS aa C38:5	PS aa C42:1		
PS aa C40:1	PS aa C42:2		
PS aa C40:2	PS aa C42:4		
PS aa C40:3	PS aa C42:5		
PS aa C40:4			

Sphingolipids (33)			
SM C3:0	Sphingomyelin with C3:0	SM C21:3	Sphingomyelin with C21:3
SM C14:0	Sphingomyelin with C14:0	SM C22:0	Sphingomyelin with C22:0
SM C15:0	Sphingomyelin with C15:0	SM C22:1	Sphingomyelin with C22:1
SM C16:0	Sphingomyelin with C15:0	SM C22:2	Sphingomyelin with C22:2
SM C16:1	Sphingomyelin with C16:1	SM C22:3	Sphingomyelin with C22:3
SM C17:0	Sphingomyelin with C17:0	SM C23:0	Sphingomyelin with C23:0
SM C18:0	Sphingomyelin with C18:0	SM C23:1	Sphingomyelin with C23:1
SM C18:1	Sphingomyelin with C18:1	SM C23:2	Sphingomyelin with C23:2
SM C19:0	Sphingomyelin with C19:0	SM C23:3	Sphingomyelin with C23:3
SM C19:1	Sphingomyelin with C19:1	SM C24:0	Sphingomyelin with C24:0
SM C19:2	Sphingomyelin with C19:2	SM C24:1	Sphingomyelin with C24:1
SM C20:0	Sphingomyelin with C20:0	SM C24:2	Sphingomyelin with C24:2
SM C20:1	Sphingomyelin with C20:1	SM C24:3	Sphingomyelin with C24:3
SM C20:2	Sphingomyelin with C20:2	SM C24:4	Sphingomyelin with C24:4
SM C21:0	Sphingomyelin with C21:0	SM C26:3	Sphingomyelin with C26:3
SM C21:1	Sphingomyelin with C21:1	SM C26:4	Sphingomyelin with C26:4
SM C21:2	Sphingomyelin with C21:2		

Ceramides (131)			
Ceramides [§]		2-Hydroxyacyl-dihydroceramides [§]	
N-C7:0-Cer	N-C18:0-Cer	N-C7:0(OH)-Cer(2H)	N-C19:0(OH)-Cer(2H)
N-C7:1-Cer	N-C18:1-Cer	N-C8:0(OH)-Cer(2H)	N-C20:0(OH)-Cer(2H)
N-C8:0-Cer	N-C19:0-Cer	N-C9:0(OH)-Cer(2H)	N-C21:0(OH)-Cer(2H)
N-C8:1-Cer	N-C19:1-Cer	N-C10:0(OH)-Cer(2H)	N-C22:0(OH)-Cer(2H)
N-C9:0-Cer	N-C20:0-Cer	N-C11:0(OH)-Cer(2H)	N-C23:0(OH)-Cer(2H)
N-C9:1-Cer	N-C20:1-Cer	N-C13:0(OH)-Cer(2H)	N-C24:0(OH)-Cer(2H)
N-C10:0-Cer	N-C21:0-Cer	N-C14:0(OH)-Cer(2H)	N-C25:0(OH)-Cer(2H)

N-C10:1-Cer	N-C21:1-Cer	N-C15:0(OH)-Cer(2H)	N-C26:0(OH)-Cer(2H)
N-C11:0-Cer	N-C22:0-Cer	N-C16:0(OH)-Cer(2H)	N-C27:0(OH)-Cer(2H)
N-C11:1-Cer	N-C22:1-Cer	N-C17:0(OH)-Cer(2H)	N-C28:0(OH)-Cer(2H)
N-C12:0-Cer	N-C23:0-Cer	N-C18:0(OH)-Cer(2H)	
N-C12:1-Cer	N-C23:1-Cer	Dihydroceramides [§]	
N-C13:0-Cer	N-C24:0-Cer	N-C7:0-Cer(2H)	N-C18:0-Cer(2H)
N-C13:1-Cer	N-C24:1-Cer	N-C7:1-Cer(2H)	N-C18:1-Cer(2H)
N-C14:0-Cer	N-C25:0-Cer	N-C8:0-Cer(2H)	N-C19:0-Cer(2H)
N-C14:1-Cer	N-C25:1-Cer	N-C8:1-Cer(2H)	N-C19:1-Cer(2H)
N-C15:0-Cer	N-C26:0-Cer	N-C9:0-Cer(2H)	N-C20:0-Cer(2H)
N-C15:1-Cer	N-C26:1-Cer	N-C9:1-Cer(2H)	N-C20:1-Cer(2H)
N-C16:0-Cer	N-C27:0-Cer	N-C10:0-Cer(2H)	N-C21:0-Cer(2H)
N-C16:1-Cer	N-C27:1-Cer	N-C10:1-Cer(2H)	N-C21:1-Cer(2H)
N-C17:0-Cer	N-C28:0-Cer	N-C11:0-Cer(2H)	N-C22:0-Cer(2H)
N-C17:1-Cer	N-C28:1-Cer	N-C11:1-Cer(2H)	N-C22:1-Cer(2H)
2-Hydroxyacyl-ceramides [§]		N-C12:0-Cer(2H)	N-C23:0-Cer(2H)
N-C7:0(OH)-Cer	N-C18:0(OH)-Cer	N-C12:1-Cer(2H)	N-C23:1-Cer(2H)
N-C8:0(OH)-Cer	N-C19:0(OH)-Cer	N-C13:0-Cer(2H)	N-C24:0-Cer(2H)
N-C9:0(OH)-Cer	N-C20:0(OH)-Cer	N-C13:1-Cer(2H)	N-C24:1-Cer(2H)
N-C10:0(OH)-Cer	N-C21:0(OH)-Cer	N-C14:0-Cer(2H)	N-C25:0-Cer(2H)
N-C11:0(OH)-Cer	N-C22:0(OH)-Cer	N-C14:1-Cer(2H)	N-C25:1-Cer(2H)
N-C12:0(OH)-Cer	N-C23:0(OH)-Cer	N-C15:0-Cer(2H)	N-C26:0-Cer(2H)
N-C13:0(OH)-Cer	N-C24:0(OH)-Cer	N-C15:1-Cer(2H)	N-C26:1-Cer(2H)
N-C14:0(OH)-Cer	N-C25:0(OH)-Cer	N-C16:0-Cer(2H)	N-C27:0-Cer(2H)
N-C15:0(OH)-Cer	N-C26:0(OH)-Cer	N-C16:1-Cer(2H)	N-C27:1-Cer(2H)
N-C16:0(OH)-Cer	N-C27:0(OH)-Cer	N-C17:0-Cer(2H)	N-C28:0-Cer(2H)
N-C17:0(OH)-Cer	N-C28:0(OH)-Cer	N-C17:1-Cer(2H)	N-C28:1-Cer(2H)

C. Análise de componentes principais (PCA) e Análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS-DA) dos subtipos de câncer de mama

D - Análise multivariada dos subtipos de câncer de mama

A. A análise de componentes principais (PCA) mostra ausência de separação natural entre os subtipos de câncer de mama. **B.** A análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS-DA) confirma ausência de separação entre os subtipos de câncer de mama. Cada ponto no gráfico corresponde a uma amostra de tecido.

REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.
2. DeSantis CE, Fedewa SA, Goding Sauer A, Kramer JL, Smith RA, Jemal A. Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA Cancer J Clin*. 2016 Jan-Feb;66(1):31-42.
3. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2017
4. Instituto Nacional do Câncer (Brasil). Estimativa 2018. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017.
5. Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med*. 2004;350(14):1430-41.
6. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol*. 2015 Dec 21;8:23-31.
7. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.

8. Cornejo KM, Kandil D, Khan A, Cosar EF. Theranostic and molecular classification of breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 Jan;138(1):44-56.
9. More TH, RoyChoudhury S, Christie J, Taunk K, Mane A, Santra MK, Chaudhury K, Rapole S. Metabolomic alterations in invasive ductal carcinoma of breast: A comprehensive metabolomic study using tissue and serum samples. *Oncotarget*. 2017 Dec 23;9(2):2678-2696.
10. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70
11. Pavlova NN, Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab*. 2016;23(1):27-47.
12. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011 Feb;11(2):85-95.
13. Hirschey MD, DeBerardinis RJ, Diehl AME, Drew JE, Frezza C, et al. Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2015 Dec;35 Suppl:S129-S150
14. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74
15. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*. 2016 May 27;2(5):e1600200.
16. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1029-33

17. Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1029-33.
18. Cassim S, Raymond VA, Dehbidi-Assadzadeh L, Lapierre P, Bilodeau M. Metabolic reprogramming enables hepatocarcinoma cells to efficiently adapt and survive to a nutrient-restricted microenvironment. *Cell Cycle*. 2018;17(7):903-16.
19. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: warburg and beyond. *Cell*. 2008;134(5):703-7.
20. Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology. *Cell*. 2017 Feb 9;168(4):657-69.
21. Yang L, Venneti S, Nagrath D. Glutaminolysis: a hallmark of cancer metabolism. *Annu Rev Biomed Eng*. 2017 Jun 21;19:163-94.
22. Locasale JW. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer*. 2013 Aug;13(8):572-83.
23. Mishra P, Ambis S. Metabolic signatures of human breast cancer. *Mol Cell Oncol*. 2015;2(3):pii. e992217..
24. Berkers CR, Maddocks ODK, Cheung EC, Mor I, Vousden KH. Metabolic regulation by p53 family members. *Cell Metab*. 2013;18(5):617-33.
25. Menendez JA, Alarcón T. Metabostemness: a new cancer hallmark. *Front Oncol*. 2014;4:262.

-
26. Won KY, Lim SJ, Kim GY, Kim WY, Han S, Song JY, Leed D. Regulatory role of p53 in cancer metabolism via SCO2 and TIGAR in human breast cancer. *Hum Pathol.* 2012;43(2):221-8.
 27. Sorrentino G, Ruggeri N, Specchia V, Cordenonsi M, Mano M, Dupont S, Manfrin A, Ingallina E, Sommaggio R, Piazza S, Rosato A, Piccolo S, Del Sal G. Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nat Cell Biol.* 2014;16(4):357-66.
 28. Stine ZE, Walton ZE, Altman BJ, Hsieh AL, Dang CV. MYC, Metabolism and cancer. *Cancer Discov.* 2015 Oct;5(10):1024-39.
 29. Boroughs LK, DeBerardinis RJ. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol.* 2015 Apr;17(4):351-9.
 30. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:761-74.
 31. Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2016 Dec;16(12):773.
 32. Yang M, Vousden KH. Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016 Oct;16(10):650-62.
 33. Vazquez A, Markert EK, Oltvai ZN. Serine biosynthesis with one carbon catabolism and the glycine cleavage system represents a novel pathway for ATP generation. *PLoS One.* 2011;6(11):e25881.
 34. Tedeschi PM, Markert EK, Gounder M, Lin H, Dvorzhinski D, Dolfi SC, Chan LL, Qiu J, DiPaola RS, Hirshfield KM, Boros LG, Bertino JR, Oltvai ZN, Vazquez A. Contribution of serine, folate and glycine metabolism to the ATP, NADPH and purine requirements of cancer cells. *Cell Death Dis.* 2013 Oct 24;4:e877.

-
35. Struck AW, Thompson ML, Wong LS, Micklefield J. S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications. *Chembiochem*. 2012 Dec 21;13(18):2642-55.
 36. Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, Heffron G, Metallo CM, Muranen T, Sharfi H, Sasaki AT, Anastasiou D, Mullarky E, Vokes NI, Sasaki M, Beroukhi R, Stephanopoulos G, Ligon AH, Meyerson M, Richardson AL, Chin L, Wagner G, Asara JM, Brugge JS, Cantley LC, Vander Heiden MG. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet*. 2011 Jul 31;43(9):869-74.
 37. Shyh-Chang N, Locasale JW, Lyssiotis CA, Zheng Y, Teo RY, Ratanasirintra Woot S, Zhang J, Onder T, Unternaehrer JJ, Zhu H, Asara JM, Daley GQ, Cantley LC. Influence of threonine metabolism on S-adenosylmethionine and histone methylation. *Science*. 2013 Jan 11;339(6116):222-6.
 38. Maddocks OD, Berkers CR, Mason SM, Zheng L, Blyth K, Gottlieb E, Vousden KH. Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature*. 2013 Jan 24;493(7433):542-6.
 39. Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, Sethumadhavan S, et al. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature*. 2011 Aug 18;476(7360):346-50.
 40. Pollari S, Käkönen SM, Edgren H, Wolf M, Kohonen P, Sara H, Guise T, Nees M, Kallioniemi O. Enhanced serine production by bone metastatic breast cancer cells stimulates osteoclastogenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Jan;125(2):421-30.

-
41. Anastasiou D. Tumour microenvironment factors shaping the cancer metabolism landscape. *Br J Cancer*. 2017 Jan;116(3):277-286.
 42. Dart A. Tumour metabolism: Metabolic flexibility. *Nat Rev Cancer*. 2016 Sep 23;16(10):617.
 43. Tennant DA, Durán RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2010 Apr;10(4):267-77.
 44. Liesenfeld, D.B.; Habermann, N.; Owen, R.W.; Scalbert, A.; Ulrich, C.M. Review of mass spectrometry-based metabolomics in cancer research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013, 22, 2182-201.
 45. Villas-Bôas SG, Mas S, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom Rev*. 2005 Sep-Oct;24(5):613-46.
 46. Howe LR, Subbaramaiah K, Hudis CA, Dannenberg AJ. Molecular pathways: adipose inflammation as a mediator of obesity-associated cancer. *Clin Cancer Res*. 2013 Nov 15;19(22):6074-83.
 47. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF, de Jong D, Van de Vijver MJ, Van't Veer LJ, Peterse JL. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol*. 2008 Oct;216(2):141-50.
 48. Chabner BA, Roberts TG Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005 Jan;5(1):65-72.
 49. Pierotti MA, Berrino F, Gariboldi M, Melani C, Mogavero A, Negri T, Pasanisi P, Pilotti S. Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: metformin, an old drug with multi-faceted effects. *Oncogene*. 2013 Mar 21;32(12):1475-87.

-
50. Jalving M, Gietema JA, Lefrandt JD, de Jong S, Reyners AK, Gans RO, de Vries EG. Metformin: taking away the candy for cancer? *Eur J Cancer*. 2010 Sep;46(13):2369-80.
 51. American Joint Committee on Cancer. Breast. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer; 2017. p.589.
 52. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind CH, eds. *TNM classification of malignant tumors*, 8th ed. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell; 2017.
 53. Menni C, Zhai G, Macgregor A, Prehn C, Römisch-Margl W, Suhre K, Adamski J, Cassidy A, Illig T, Spector TD, Valdes AM. Targeted metabolomics profiles are strongly correlated with nutritional patterns in women. *Metabolomics*. 2013 Apr;9(2):506-14.
 54. Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. Targeted metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol*. 2012 Apr;Chapter 30:Unit 30.2.1-24.
 55. Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, Wishart DS, Xia J. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucl Acids Res*. 2018;46:W486-94.
 56. Xia J, Wishart DS. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2016;55:14.10.1-14.10.91.
 57. van Diest PJ, van der Wall E, Baak J P. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol*. 2004 Jul; 57(7):675-81.

-
58. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Shairer C, Mulvihill JJ: Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst* 1989;81(24):1879-86.
 59. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, et al. HMDB 4.0 — The Human Metabolome Database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 4;46(D1):D608-17.
 60. Jové M, Collado R, Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Sol J, Ruiz-Sanjuan M, Fernandez M, de la Torre Cabrera C, Ramírez-Tortosa C, Granados-Principal S, Sánchez-Rovira P, Pamplona R. A plasma metabolomic signature discloses human breast cancer. *Oncotarget.* 2017 Mar 21;8(12):19522-33.
 61. Zhou B, Xiao JF, Ressom HW. Prioritization of putative metabolite identifications in LC-MS/MS experiments using a computational pipeline. *Proteomics.* 2013 Jan;13(2):248-60.
 62. Phan LM, Yeung SC, Lee MH. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biol Med.* 2014 Mar;11(1):1-19.
 63. McCartney A, Vignoli A, Biganzoli L, Love R, Tenori L, Luchinat C, Di Leo A. Metabolomics in breast cancer: A decade in review. *Cancer Treat Rev.* 2018 Jun;67:88-96.
 64. Fell DA, Snell K. Control analysis of mammalian serine biosynthesis. Feedback inhibition on the final step. *Biochem J.* 1988 Nov 15;256(1):97-101.

-
65. Locasale JW, Cantley LC. Genetic selection for enhanced serine metabolism in cancer development. *Cell Cycle*. 2011 Nov 15;10(22):3812-3.
 66. Pollari S, Kähkönen SM, Edgren H, Wolf M, Kohonen P, Sara H, Guise T, Nees M, Kallioniemi O. Enhanced serine production by bone metastatic breast cancer cells stimulates osteoclastogenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Jan;125(2):421-30.
 67. Choi SY, Collins CC, Gout PW, Wang Y. Cancer-generated lactic acid: a regulatory, immunosuppressive metabolite? *J Pathol*. 2013; 230:350-355
 68. Fu Y, Liu S, Yin S, Niu W, Xiong W, Tan M, Li G, Zhou M. The reverse Warburg effect is likely to be an Achilles' heel of cancer that can be exploited for cancer therapy. *Oncotarget*. 2017 May 25;8(34):57813-57825.
 69. Vaughan RA, Gannon NP, Garcia-Smith R, Licon-Munoz Y, Barberena MA, Bisoffi M, Trujillo KA. β -alanine suppresses malignant breast epithelial cell aggressiveness through alterations in metabolism and cellular acidity in vitro. *Mol Cancer*. 2014 Jan 24;13:14.
 70. Ducker GS, Rabinowitz JD. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab*. 2017 Jan 10;25(1):27-42.
 71. Fedirko V, Lukanova A, Bamia C, Trichopolou A, Trepo E, Nöthlings U, et al. Glycemic index, glycemic load, dietary carbohydrate, and dietary fiber intake and risk of liver and biliary tract cancers in Western Europeans. *Ann Oncol*. 2013 Feb;24(2):543-53.

-
72. Shuvalov O, Petukhov A, Daks A, Fedorova O, Vasileva E, Barlev NA. One-carbon metabolism and nucleotide biosynthesis as attractive targets for anticancer therapy. *Oncotarget*. 2017 Apr 4;8(14):23955-77.
 73. Garcia-Bermudez J, Baudrier L, La K, Zhu XG, Fidelin J, Sviderskiy VO, Papagiannakopoulos T, Molina H, Snuderl M, Lewis CA, Possemato RL, Birsoy K. Aspartate is a limiting metabolite for cancer cell proliferation under hypoxia and in tumours. *Nat Cell Biol*. 2018 Jul;20(7):775-781.
 74. Casero RA Jr, Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 May;6(5):373-90.
 75. Newman AC, Maddocks ODK. Serine and functional metabolites in cancer. *Trends Cell Biol*. 2017 Sep;27(9):645-57.
 76. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol*. 2005 Aug;5(8):641-54.
 77. Morettin A, Baldwin RM, Côté J. Arginine methyltransferases as novel therapeutic targets for breast cancer. *Mutagenesis*. 2015 Mar;30(2):177-89.
 78. Sibal L, Agarwal SC, Home PD, Boger RH. The role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rev*. 2010 May;6(2):82-90.
 79. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Dec;12(12):931-47.

-
80. Cui Y, Xing P, Wang Y, Liu M, Qiu L, Ying G, Li B. NADPH accumulation is responsible for apoptosis in breast cancer cells induced by fatty acid synthase inhibition. *Oncotarget*. 2017 May 16;8(20):32576-85.
 81. Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer*. 2014 Nov;14(11):709-21.
 82. Lu M, Zhou L, Stanley WC, Cabrera ME, Saidel GM, Yu X. Role of the malate-aspartate shuttle on the metabolic response to myocardial ischemia. *J Theor Biol*. 2008 Sep 21;254(2):466-75.
 83. Zong WX, Rabinowitz JD, White E. Mitochondria and cancer. *Mol Cell*. 2016 Mar 3;61(5):667-76.
 84. Lukey MJ, Katt WP, Cerione RA. Targeting amino acid metabolism for cancer therapy. *Drug Discov Today*. 2017 May;22(5):796-804.
 85. Kane DA. Lactate oxidation at the mitochondria: a lactate-malate-aspartate shuttle at work. *Front Neurosci*. 2014 Nov 25;8:366.
 86. Tondo M, Marin-Valencia I, Qian Ma, Pascual JM. Chapter 25 - Pyruvate dehydrogenase, pyruvate carboxylase, krebs cycle and mitochondrial transport disorders. In: Editor(s): Rosenberg RN, Pascual JM. *Rosenberg's molecular and genetic basis of neurological and psychiatric disease*. Fifth Edition. Academic Press; 2015. p. 291-297.
 87. Spinelli JB, Yoon H, Ringel AE, Jeanfavre S, Clish CB, Haigis MC. Metabolic recycling of ammonia via glutamate dehydrogenase supports breast cancer biomass. *Science*. 2017 Nov 17;358(6365):941-6.

-
88. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Feb;9(2):112-24.
 89. Hickman MJ, Petti AA, Ho-Shing O, Silverman SJ, McIsaac RS, Lee TA, Botstein D. Coordinated regulation of sulfur and phospholipid metabolism reflects the importance of methylation in the growth of yeast. *Mol Biol Cell.* 2011 Nov;22(21):4192-204.
 90. Ravacci GR, Brentani MM, Tortelli T Jr, Torrinhas RS, Saldanha T, Torres EA, Waitzberg DL. Lipid raft disruption by docosahexaenoic acid induces apoptosis in transformed human mammary luminal epithelial cells harboring HER-2overexpression. *J Nutr Biochem.* 2013 Mar;24(3):505-15.
 91. Ravacci GR, Brentani MM, Tortelli TC, Torrinhas RS, Santos JR, Logullo AF, Waitzberg DL. Docosahexaenoic acid modulates a HER2-associated lipogenic phenotype, induces apoptosis, and increases trastuzumab action in HER2-overexpressing breast carcinoma cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:838652.
 92. Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, Munck S, et al. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res.* 2010;70: 8117-26.
 93. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, Lichtor T, Decker WK, Whelan RL, Kumara HMCS, Signori E, Honoki K, Georgakilas AG, Amin A, Helferich WG, Boosani CS, Guha G, Ciriolo MR, Chen S, Mohammed SI, Azmi AS, Keith WN, Bilsland A, Bhakta D, Halicka D, Fujii H, Aquilano K, Ashraf SS, Nowsheen S, Yang X, Choi BK, Kwon BS. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol.* 2015;35(Supplement):S185-S198.

-
94. Corominas-Faja B, Quirantes-Piné R, Oliveras-Ferraros C, Vazquez-Martin A, Cufí S, Martin-Castillo B, Micol V, Joven J, Segura-Carretero A, Menendez JA. Metabolomic fingerprint reveals that metformin impairs one-carbon metabolism in a manner similar to the antifolate class of chemotherapy drugs. *Aging (Albany NY)*. 2012 Jul;4(7):480-98.
 95. Martin-Castillo B, Pernas S, Dorca J, Álvarez I, Martínez S, Pérez-Garcia JM, Batista-López N, Rodríguez-Sánchez CA, Amillano K, Domínguez S, Luque M, Stradella A, Morilla I, Viñas G, Cortés J, Cuyàs E, Verdura S, Fernández-Ochoa Á, Fernández-Arroyo S, Segura-Carretero A, Joven J, Pérez E, Bosch N, Garcia M, López-Bonet E, Saidani S, Buxó M, Menendez JA. A phase 2 trial of neoadjuvant metformin in combination with trastuzumab and chemotherapy in women with early HER2-positive breast cancer: the METTEN study. *Oncotarget*. 2018; 9:35687-35704.
 96. Howe LR, Subbaramaiah K, Hudis CA, Dannenberg AJ. Molecular pathways: adipose inflammation as a mediator of obesity-associated cancer. *Clin Cancer Res*. 2013 Nov 15;19(22):6074-83.
 97. Goodwin P.J. Obesity and breast cancer outcomes: how much evidence is needed to change practice? *J Clin Oncol*. 2016;34:646-8.

APÊNDICE

10 APÊNDICE

Carta de Submissão para publicação a periódico indexado

047460 Receipt of New Paper by oncotarget

Dear Jessica Santos,

On February 25, 2019, Oncotarget Journal received your manuscript entitled "Distinct pattern of one-carbon metabolism, a nutrient-sensitive pathway, in invasive breast cancer: A targeted metabolomic study" by Jessica Santos, Dan Waitzberg, Ismael da Silva, Tharcisio Citrangulo Tortelli Junior, Ana Martinez, Ângela Logullo, Raquel Torrinhas, and Graziela Ravacci.

Your manuscript has been assigned the Paper #: 047460.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

<https://oncotarget.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A5JC4UXR4A7CcrP2F6A9ftdXdEExOGQaFdwYIE11VSeIgZ>

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

Please e-mail us if your paper was peer-reviewed in another journals and you submitted previous peer-reviews with rebuttal.

If your submission is accepted, please note that the publisher will contact you thereafter with the required author agreement form and bill form. For more information about publication fees, please visit the For Authors page on our website, www.oncotarget.com, and/or the Author Information page on <https://oncotarget.msubmit.net/cgi-bin/main.plex>

Sincerely,
Staff

Oncotarget Journal

Prêmios

Prêmio Ganep 35 anos, Ganep Nutrição Humana (2016)

Reis J, Dale I, Logullo AF, Brentanni MM, Ravacci G. Assinatura Lipogênica do Tecido Tumoral de Pacientes com Câncer de Mama é Sensível ao Tratamento com DHA e Pode Ser Considerado Alvo Terapêutico.

Resumos em Anais de Congressos internacionais e nacionais

San Antonio Breast Cancer Symposium; 2016

Santos JR, Brentanni MM, Tortelli T, Dale I, Waitzberg A, Waitzberg D, Ravacci G. Metabolomic profiling of breast cancer and adjacent tissue [abstract]. In: Proceedings of the 2016 San Antonio Breast Cancer Symposium; 2016 Dec 6-10; San Antonio, TX. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2017;77(4 Suppl): Abstract nr P6-02-06

Ravacci GR, Santos JR, Brentani MM, Tortelli T, Dale I, Logullo AF, Waitzberg DL. HER2-associated lipogenic phenotype as a potential therapeutical target in breast cancer patients [abstract]. In: Proceedings of the 2016 San Antonio Breast Cancer Symposium; 2016 Dec 6-10; San Antonio, TX. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2017;77(4 Suppl): Abstract nr P4-21-29

AACR International Conference on Translational Cancer Medicine (2017)

Jéssica Reis, Ismael Dale, Angela Logullo, Maria Mitzi, Dan Waitzberg, Graziela Ravacci. Metabolomic analysis reveals association between leucine and lipogenesis for the formation of lipid rafts in the membrane of primary breast tumor samples [abstract]. In: Proceedings of the AACR International Conference held in cooperation with the Latin American Cooperative Oncology Group (LACOG) on Translational Cancer Medicine; May 4-6, 2017;

São Paulo, Brazil. Philadelphia (PA): AACR; Clin Cancer Res 2018;24(1_Suppl):Abstract nr B82.

Ganepão 2018 - 8º Congresso Brasileiro de Nutrição em Câncer CBNC e 8th International Conference of Nutritional Oncology – ICNO (2018)

Jéssica Reis Santos, Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva, Raquel Torrinhas, Tharcisio Tortelli Júnior, Graziela Ravacci. Caracterização de assinaturas metabólicas de tumores primários de mulheres com câncer de mama.

ESPEN Congress (2018)

Santos, J.R. et al. Clinical Nutrition, Volume 37 , S79 - S80. Metabolomics shows distinct pattern of one-carbon metabolism in invasive breast cancer.