

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

SALVADOR SÁNCHEZ VINCES

**PERFIL LIPIDÔMICO DE TECIDO DE CÂNCER DE RETO E
SUA RELAÇÃO COM A QUIMIORADIOTERAPIA
NEOADJUVANTE**

Bragança Paulista
2023

SALVADOR SÁNCHEZ VINCES - R.A. 001202010048

**PERFIL LIPIDÔMICO DE TECIDO DE CÂNCER DE RETO E
SUA RELAÇÃO COM A QUIMIORADIOTERAPIA
NEOADJUVANTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da saúde.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho

Bragança Paulista
2023

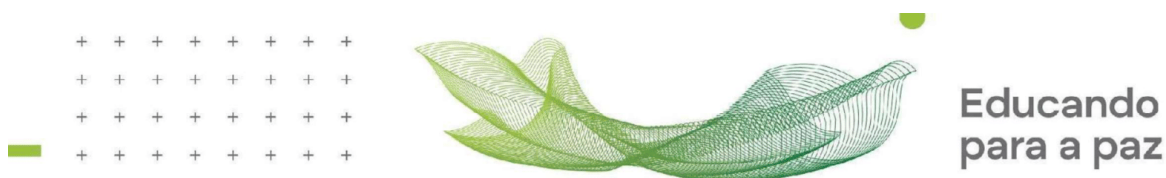
WI 610
V786p

Vinces, Salvador Sánchez
Perfil lipidômico de tecido de câncer de reto e sua relação
com a quimiorradioterapia neoadjuvante / Salvador Sánchez
Vinces. – Bragança Paulista, 2023.
51 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São
Francisco.

Orientação de: Patrícia de Oliveira Carvalho.

1. Adenocarcinoma. 2. Neoplasias Retais.
3. Lipidômica. 4. Resistência a Medicamentos.
5. Terapia Neoadjuvante. I. Carvalho, Patrícia de Oliveira.
II. Título.



VINCES, Salvador Sánchez. “Perfil lipidômico de tecido de câncer de reto e sua relação com a quimiorradioterapia neoadjuvante”. Tese defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 17 de agosto de 2023 pela Banca examinadora constituída pelos membros:

Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho - Orientadora e Presidente
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Andréia de Melo Porcari
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Célio Fernando Figueiredo Angolini
Universidade Federal do ABC

Prof. Dr. Fernando Augusto de Lima Marson
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Murillo de Oliveira Antunes
Instituto do Coração

AGRADECIMENTOS

Agradeço intensamente a Deus por me conceder a sabedoria e principalmente a força para a conclusão desta etapa importante na minha vida.

À professora Patrícia de Oliveira Carvalho, por acreditar em mim e me brindar oportunidades para continuar e conseguir minhas metas.

À minha família, pelo apoio em todas as decisões importantes da minha vida.

À Jennifer, por estar sempre nos momentos importantes.

A Universidade São Francisco, a CAPES pela bolsa concedida e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (2018/13317-6).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento: 88887.484091/2020-00

RESUMO

Uma abordagem atualmente usada para o tratamento do adenocarcinoma de reto implica uso de quimiorradioterapia neoadjuvante (QRT) associado com a cirurgia de excisão total do mesorreto. Entretanto, os pacientes respondem de maneiras variadas a esta terapia, não se conhecendo completamente os mecanismos bioquímicos envolvidos nesta resposta. Clinicamente, é altamente relevante discriminar os tumores que não respondem ao tratamento. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações do lipidoma de pacientes com adenocarcinoma de reto localmente avançado, assim como o efeito da QRT neoadjuvante, buscando uma assinatura molecular capaz de prever a resposta tumoral ao tratamento. Para isso, amostras de tecido antes e após a QRT neoadjuvante de pacientes com câncer retal localmente avançado (n=13) foram coletadas no Hospital Universitário São Francisco da Providência de Deus HUSF em Bragança Paulista, SP (CAAE 14958819.8.0000.5514). Após a extração, as amostras foram analisadas usando a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-QTOF-MS^E). Os dados foram avaliados utilizando o método *limma* (*linear model for microarray*). Os resultados mostraram diferenças na abundância relativa de alguns tipos de lipídeos (p.e. lisofosfolipídios, éter fosfolipídios e lipídeos oxidados) relacionados ao agravamento e à resposta ao tratamento. As moléculas identificadas nas amostras de tecido sugerem que a diferença do metabolismo lipídico celular entre pacientes que respondem ou não à QRT neoadjuvante está relacionada ao desequilíbrio na oxidação de fosfolipídios e na presença de radicais lipídicos. Esse estudo, aliado a outros mais aprofundados de lipidômica, devem colaborar para o melhor entendimento da fisiopatologia do câncer de reto, relacionando uma assinatura característica capaz de caracterizar ou prever o comportamento do câncer de reto frente a QRT neoadjuvante.

Palavras chaves: adenocarcinoma. câncer retal. lipidômica. farmacorresistência. terapia neoadjuvante.

ABSTRACT

One approach currently used to treat adenocarcinoma of the rectum involves the use of neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT) associated with total excision surgery of the mesorectum. However, patients respond in different ways to this therapy and the biochemical mechanisms involved in this response are not fully understood. Clinically, it is highly relevant to discriminate between tumours that do not respond to treatment. The aim of this study was to evaluate changes in the lipidome of patients with locally advanced adenocarcinoma of the rectum, as well as the effect of neoadjuvant CRT, looking for a molecular signature capable of predicting tumor response to treatment. To this end, tissue samples before and after neoadjuvant CRT from patients with locally advanced rectal cancer (n=13) were collected at the Hospital Universitário São Francisco da Providência de Deus HUSF in Bragança Paulista, SP (CAAE 14958819.8.0000.5514). After extraction, the samples were analysed using ultra-performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (UPLC-QTOF-MSE). The data was evaluated using the limma (linear model for microarray) method. The results showed differences in the relative abundance of some types of lipids (e.g., lysophospholipids, ether phospholipids and oxidized lipids) related to worsening and response to treatment. The molecules identified in the tissue samples suggest that the difference in cellular lipid metabolism between patients who respond or not to neoadjuvant CRT is related to an imbalance in phospholipid oxidation and the presence of lipid radicals. This study, together with others more in-depth lipidomic studies, should contribute to a better understanding of the pathophysiology of rectal cancer, relating a characteristic signature capable of characterizing or predicting the behaviour of rectal cancer and neoadjuvant CRT.

Keywords: *adenocarcinoma. rectal cancer. lipidomics, drug resistance. Neoadjuvant therapy.*

Lista de Símbolos e Abreviações

CA19-9	Antígeno carboidrato 19-9
CCR	Câncer coloretal
CEA	Antígeno carcinoembrionário
Cer	Ceramida
cGy	Grays
CRT	Quimiorradioterapia
Da	Daltons
DAG	Diacilglicerol
ETM	Excisão total do mesorreto
FA	Ácido graxo
GPL	Glicerofosfolipídio
GSL	Glicosfingolipídios
IDE	Ambiente de desenvolvimento integrado
IRM	Imagem por ressonância magnética
LC	Cromatografia líquida
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPCAT1	Lisofosfatidilcolina aciltransferase 1
LPE	Liso fostatidiletanolamina
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
-NH ₂	Grupo amino
PC	Fosfatidilcolina

PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PI	Fosfatidilinositol
PLA ₂	Fosfolipase A2
PS	Fosfatidilserina
PSL	Fosfoesfingolípídios
PUFA	Ácido graxo poliinsaturado
QRT	Quimiorradioterapia
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2
SL	Esfingolípídio
SM	Esfingomielinas
TAG	Triacilgliceróis
TNM	Tumor-nódulo-metástase
TNT	Terapia neoadjuvante total
TRG	Grau de regressão tumoral
UPLC	Cromatografia líquida de ultra-eficiência
UPLC-QTOF-MS ^E	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução

Lista de Figuras

FIGURA 1. Fluxograma para o tratamento de câncer de reto..... 16

FIGURA 2. Estruturas representativas das classes lipídicas que conformam um lipidoma..... 22

Lista de Quadros

QUADRO 1. Estadiamento pelo sistema TNM.....	14
QUADRO 2. Estadiamento do câncer colorretal usando TNM e a sua correspondência na classificação simplificada.....	15
QUADRO 3. Grau de regressão tumoral usando a patologia e imageamento por ressonância magnética.....	19
QUADRO 4. Principais lipídios alterados em pacientes com câncer de reto e cólon em relação às amostras controle.....	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Câncer de reto: fatores de risco, mecanismos bioquímicos envolvidos e tratamento.....	12
1.2. Resposta ao tratamento neoadjuvante e grau de regressão tumoral.....	18
1.3. Lipidômica aplicada ao estudo de câncer de reto	21
1.4. Técnicas analíticas usadas no estudo do lipidoma.....	28
1.5. Ferramentas de bioinformática para o tratamento de dados	29
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. CAPÍTULO 1	34
5. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de reto: fatores de risco, mecanismos bioquímicos envolvidos e tratamento

O câncer de reto, juntamente com o cólon, é a terceira causa mais comum de câncer no Brasil e no mundo, sendo a terceira principal causa de morte por câncer em homens e em mulheres (SUNG et al., 2021). No Brasil, essa neoplasia ocupa a terceira posição em incidência na população, com 40 mil novos casos sendo diagnosticados a cada ano, em ambos os sexos (INCA, 2022).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (2022), o câncer colorretal (CCR) abrange os tumores desde a parte do intestino grosso (cólon) e no reto e ânus. A depender de sua topografia e patogênese, o câncer distal (após a flexura esquerda) é de maior responsividade a imunoterapia com melhor prognóstico do que o câncer no cólon proximal.

O câncer de reto apresenta algumas particularidades anatômicas, fisiopatológicas e, principalmente, no seu tratamento, pelo que deveria ser estudado separadamente do câncer de cólon ao qual se assemelha nos seus aspectos epidemiológicos, etiológicos e de patogênese. (GORDON, 2007).

Os fatores de risco destacados no CCR são o histórico de câncer familiar, idade (≥ 50 anos), dieta e obesidade, com destaque para pouco consumo de alimentos com fibras alimentares (frutas, vegetais e outros alimentos) e o consumo excessivo de alimentos processados e carne vermelha. Alguns hábitos de vida também se destacam entre os fatores de risco, como o etilismo, sedentarismo e tabagismo (SAWICKI et al., 2021). Isso mostra a complexidade da patogênese do CCR resultante da interação entre o genótipo, o fenótipo e aspectos ambientais.

O crescimento da lesão do adenocarcinoma de reto a partir da mucosa atinge as camadas da parede do reto, se estendendo além da camada muscular e invadindo a gordura mesorretal circundante até, finalmente, infiltrar nos órgãos adjacentes. A profundidade de infiltração parietal e da gordura mesorretal pela lesão incrementa o risco de disseminação linfática e vascular, com consequente maior risco de metástases à distância (DUKES; BUSSEY, 1958).

Evidências recentes têm mostrado que um evento precoce e universal na carcinogênese, de forma geral, é a ativação do metabolismo dos lipídeos, macromoléculas que, além de estarem envolvidas em complexos sistemas biológicos e processos metabólicos da célula, são altamente

susceptíveis ao processo de lipoperoxidação desencadeado pelo estresse oxidativo (FERNANDES MESSIAS et al., 2018; MENDONÇA; CARIOCA; MAIA, 2014; NGUYEN et al., 2017).

As principais alterações no metabolismo induzidas pelos tumores avançados de reto, e de outros tumores, afetam a depleção dos depósitos lipídicos, aumentam a lipólise, incrementam o *turnover* de glicerol e ácidos graxos livres e reduzem a lipogênese (NEAGU et al., 2019; NGUYEN et al., 2017). Os mecanismos que se relacionam com o aumento da taxa de lipólise incluem redução da ingestão oral, perda de massa ponderal, resistência à insulina, resposta de estresse frente à doença e liberação de fatores lipolíticos pelo tumor (ZAIDI et al., 2013).

O UICC (*Union for International Cancer Control*) (BRIERLEY; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2016) recomendam o uso do sistema TNM (tumor-nódulo-metástase) para classificação de tumores malignos (BRIERLEY; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2016) (QUADRO 1). Neste sistema é referenciada a profundidade do tumor (T), comprometimento de linfonodos (N) e o grau de metástases à distância (M). Também é comum o estadiamento do câncer com uma classificação simplificada onde, usando o estadiamento TNM como base, podemos indicar o estádio global de um tumor que pode variar de I a IV (QUADRO 2) (ROSEN; SAPRA, 2023).

O estadiamento dos pacientes de câncer de reto é feito baseado nos resultados da ressonância magnética de pelve para avaliação local e tomografia computadorizada de tórax e abdome para estadiamento sistêmico. Estes procedimentos estão adotados no HUSF. Também são realizados os exames laboratoriais para medir os marcadores tumorais CEA (antígeno carcinoembrionário) e CA19-9 (antígeno carboidrato 19-9), além de exame físico e nutricional. Os exames de reestadiamentos são realizados de 8 a 12 semanas após o tratamento neoadjuvante para avaliação da resposta ao tratamento, mapeamento da lesão para guiar o procedimento cirúrgico e avaliação de metástases à distância (GLYNNE-JONES et al., 2017). O exame de ressonância é o método padrão-ouro na detecção de fatores de mau prognóstico preditores de recidiva local.

QUADRO 1. Estadiamento pelo sistema TNM.

/T - Tumor Primário	
T0	Tumor primário não pode ser avaliado
Tx	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : invasão da lâmina própria
T1	Tumor invadindo submucosa
T2	Tumor invadindo a muscular própria
T3	Tumor invadindo através muscular própria até subserosa ou nos tecidos pericólicos não peritonizados ou perirretais
T4a; 4b	Tumor perfura peritônio visceral; tumor invade diretamente outros órgãos ou estruturas
N - Linfonodos Regionais	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástase em linfonodo regional
N1a; 1b; 1c	Metástases em 1 linfonodo regional; metástases em 2 ou 3 linfonodos regionais; depósitos tumorais, satélites, na subserosa ou em tecido mole pericólico ou perirretal sem metástase em linfonodo regional.
N2a; 2b	Metástases 4-6 linfonodos regionais; metástases 7 ou mais linfonodos regionais
M - Metástase À Distância	
M0	Sem metástase a distância
M1a; 1b; 1c	Metástase confinada a um órgão (Fígado, pulmão, ovário, linfa não regional) nódulos sem metástase peritoneais; metástase em mais de um órgão; metástase para o peritônio com ou sem envolvimento para outro órgão.

Em pacientes submetidos à terapia neoadjuvante, é importante avaliar a resposta a essa terapia por meio de reestadiamento, o que pode conferir impacto na sobrevida global e no tempo livre de doença. A identificação de regressão do tumor caracteriza o “*downstaging*” e o prefixo “y” é acrescentado ao TNM, anteriormente à letra “p” de resultado patológico. Da mesma forma, utilizam-se as letras “c”, “u”, “mr” e “ct” para referir-se às respostas clínica e àquelas identificadas por ultrassonografia endorretal, ressonância magnética e tomografia computadorizada, respectivamente.

QUADRO 2. Estadiamento do câncer colorretal usando TNM e a sua correspondência na classificação simplificada

Estágio do câncer		T (tumor)	N (Linfonodos regionais)	M (metástase a distância)
0	<i>in situ</i>	Tis	N0	M0
I	Localizado	T1, T2	N0	M0
IIA	Localmente avançado inicial	T3	N0	M0
IIB		T4a	N0	M0
IIC		T4b	N0	M0
IIIA	Localmente avançado tardio	T1, T2	N1/N1c/N2a	M0
IIIB		T3, T4aT2, T3T1, T2	N1/N1cN2aN2b	M0
IIIC		T4aT3, T4aT4b	N2aN2bN1/N2	M0
IVA	Metastático	Qualquer T	Qualquer N	M1a
IVB		Qualquer T	Qualquer N	M1b

Tis = carcinoma *in situ*; T1 = tela submucosa; T2 = túnica muscular; T3 = penetra todas as camadas (no câncer retal, inclui o tecido perirretal); T4 = órgãos adjacentes ou peritônio. N0 = nenhum; N1 = 1 a 3 linfonodos regionais; N2 = ≥ 4 linfonodos regionais; N3 = linfonodos apicais ou vasculares do tronco. M0 = nenhum; M1 = presente.

Após o correto diagnóstico e o estadiamento adequado, é necessária a melhor escolha do tipo de tratamento visando a maior sobrevida e a menor chance de recidiva. A FIGURA 1 apresenta o fluxo de tomada de decisão e a intervenção proposta nos modelos atuais direcionados por imageamento por ressonância magnética (IRM) (GLYNNE-JONES et al., 2017; KELLER et al., 2020).

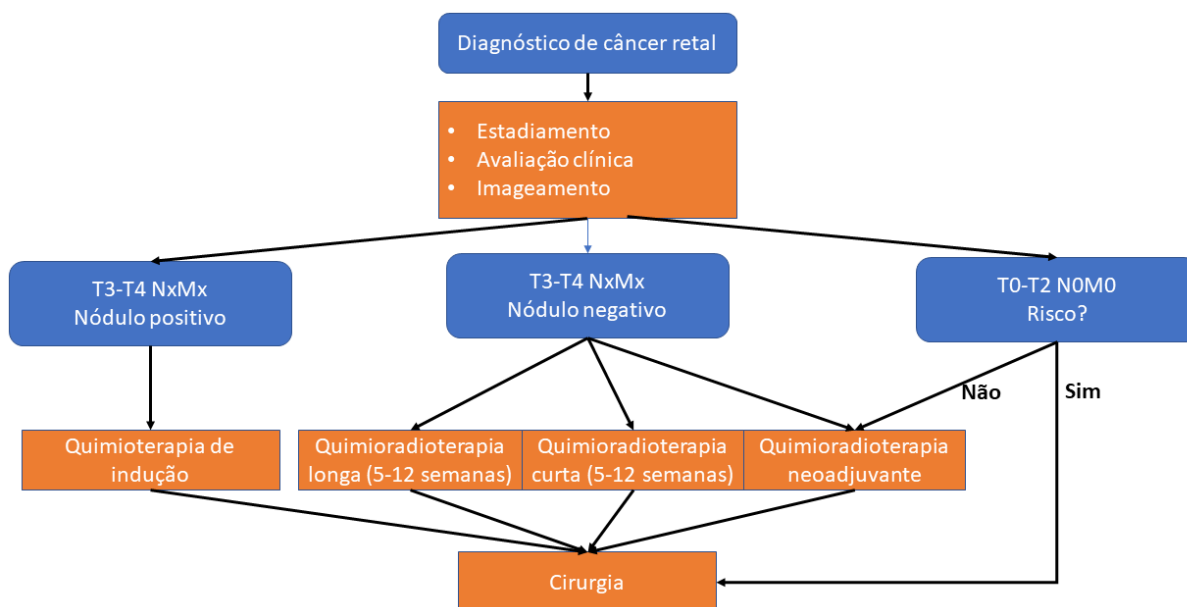


FIGURA 1. Fluxograma para o tratamento de câncer de reto. Fonte: figura adaptada de (KELLER *et al.*, 2020).

Nos últimos 15 anos, avanços importantes foram feitos no tratamento do câncer retal. Melhor compreensão da história natural da doença, precisão no estadiamento radiológico, técnicas cirúrgicas mais eficazes e análises histopatológicas mais detalhadas contribuem positivamente na sobrevida dos pacientes.

O tratamento padrão de câncer de reto médio ou baixo localmente avançado se baseia em QRT neoadjuvante antes da cirurgia, seguida de cirurgia no término da terapia e posteriormente, dependendo da análise histopatológica da peça cirúrgica, avaliação de quimioterapia adjuvante. Para tumores localmente avançados, o tratamento QRT neoadjuvante, associado à técnica de excisão total do mesorreto, é necessária para a melhoria dos resultados cirúrgicos da neoplasia de reto (SAUER et al., 2004).

A realização de quimioterapia e radioterapia complementar, juntamente com a intervenção cirúrgica, é necessária para o tratamento do adenocarcinoma de reto no estágio II e III. O consenso atual recomenda que pacientes com neoplasias retais baixas extirpáveis em estágio II e III, e sem contraindicações clínicas, devem ser submetidos à terapia neoadjuvante (GLYNNE-JONES et al., 2017). É recomendável que o tratamento cirúrgico seja realizado após o período de seis a oito semanas do término da QRT, aumentando a possibilidade de redução do tamanho tumoral e, portanto, sua ressecção completa. Já os pacientes sem fatores de risco para recidiva local podem ser operados sem necessidade de tratamento QRT pré-operatório para evitar possíveis efeitos adversos (TAYLOR et al., 2011).

No HUSF, local onde foram selecionados os pacientes para participarem desse trabalho, utiliza-se dois protocolos para o tratamento de câncer de reto. O primeiro, o protocolo de Mayo, o paciente é submetido a radioterapia a 180 cGy (Grays) por 28 dias totalizando a dose de 5040 cGy, associada a medicação via oral Capecitabina 1200 mg/ dia, sendo de segunda a sexta-feira e descansa sábado e domingo. Essa medicação pode ser substituída pelo uso do 5-fluorouracil administrada por via endovenosa sendo a 350 mg por m² na superfície corpórea, por três dias na primeira semana e repetindo na última semana de radioterapia e em associação com o ácido fólico. Estudos recentes mostram que os desfechos oncológicos, perfil de efeitos adversos e taxa de regressão tumoral completa pode variar (JANG et al., 2023; PASZT et al., 2022). A capecitabina é um pró-fármaco (5'-deoxi-5-fluorouridina) do 5-FU (5-Fluorouracil) antineoplásico de uso oral com ação citotóxica, indicado para o tratamento de câncer de mama, câncer de cólon e reto e câncer de estômago (WALKO; LINDLEY, 2005). O 5-Fluorouracil é uma fluoropirimidina, amplamente usado no tratamento de carcinomas de alta incidência. Este fármaco inibe a síntese de precursores essenciais do DNA, através da formação de metabólitos que bloqueiam a família de cofatores enzimáticos ativadores da divisão e do reparo de DNA (VODENKOVA et al., 2020).

O segundo protocolo, terapia neoadjuvante total (TNT), foi implementado a pouco tempo na instituição, trata-se de cinco ciclos de Capecitabina associada Oxaliplatina, com intervalo de vinte e um dia cada ciclo seguido por radioterapia e suspensão da Oxaliplatina. Embora o protocolo de TNT é o mais atualizado, os pacientes selecionados no desenvolvimento deste trabalho foram submetidos ao protocolo de Mayo, uma vez que na data da coleta das amostras coincidiu com o início da pandemia do SARS-CoV-2 (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2) no

Brasil, para que os pacientes não fossem expostos ao risco da doença, optou-se em utilizar o primeiro protocolo, onde a medicação é administrada por via oral.

É conhecido que os tumores têm diferentes níveis de resposta à terapia neoadjuvante, não se conhecendo completamente os mecanismos envolvidos nesta resposta (ANDRADE et al., 2016; KONG et al., 2018), onde, ao final da terapia, alguns pacientes apresentam uma significativa regressão do tumor que consiste em estágio patológico menor do que aquele definido pelo exame clínico e por imagem no momento do diagnóstico, enquanto outros pacientes não apresentam regressão tumoral (FEENEY et al., 2019).

1.2. Resposta ao tratamento neoadjuvante e grau de regressão tumoral

A terapia neoadjuvante no período pré-operatório tem se mostrado capaz de promover uma redução do tamanho do tumor, o que melhora as condições de ressecabilidade e reduz o comprometimento da região esfíncteriana (LI et al., 2016). A possibilidade da preservação do órgão no tratamento de câncer de reto sem expor o paciente aos riscos e sequelas resultantes de uma abordagem cirúrgica radical (como a excisão total do mesorreto ou ETM) foi evidenciada pelos resultados da terapia neoadjuvante na redução significativa ou completa no tamanho do tumor.

A partir da década de 90, tiveram destaque alguns trabalhos realizados por grupo de pesquisadores brasileiros (HABR-GAMA, 2006; HABR-GAMA et al., 1998, 2004), os quais sugeriam um tratamento não operatório em casos de aparente resposta completa à terapia neoadjuvante. A estratégia chamada “Watch & Wait” (“observar e esperar”), tem como pressuposto não operar pacientes com resposta clínica completa com o objetivo de evitar morbidade, mortalidade e consequências funcionais graves (p.e. colostomias) devido a cirurgia radical (HABR-GAMA, 2006). Um estudo retrospectivo multicêntrico usando o conjunto de dados do International Watch & Wait Database (período de 1991 a 2015) em pacientes com resposta clínica completa após a QRT sem tratamento cirúrgico inicial (FERNANDEZ et al., 2021) apresentou as características e benefícios desta abordagem.

O conhecimento prévio de uma eventual resistência tumoral à terapia neoadjuvante poderia evitar uma morbidade desnecessária adicional e a prolongação do tempo de tratamento antes do tratamento cirúrgico. Uma melhor definição sobre o prognóstico da responsividade

tumoral à terapia neoadjuvante permitirá estabelecer uma estratégia individual de terapia do câncer retal (KONG et al., 2018). Por este motivo, métodos de diagnóstico e estadiamento, como o imageamento, são considerados importantes para a definição do tratamento, embora apenas apresentam níveis adequados de correlação com os laudos histológicos e os índices de recidiva, mas sem identificação das características biológicas tumorais e de responsividade tumoral (LI et al., 2016). Dentre estes métodos, a ressonância magnética é usada na predição da resposta tumoral ao tratamento neoadjuvante já que permite quantificar o grau de regressão do tumor (TRG do inglês “*tumor regression grade*”). Este critério de resposta é classificado em cinco categorias, conforme mostrado no QUADRO 3. Existe uma discussão na literatura sobre o critério de resposta ao tratamento radioterápico que selecione os respondedores a QRT, com uma maioria dos autores considerando que a regressão tumoral com menor risco de recidiva seria a dos pacientes com TRG 1-2 (SIDDIQUI et al., 2016).

QUADRO 3. Grau de regressão tumoral usando a patologia e imageamento por ressonância magnética.

Grau de regressão tumoral (TRG)	
1	Somente sinal de fibrose
2	Predomínio de sinal de fibrose
3	50% de sinal de fibrose; 50% de sinal de tumor
4	Predomínio de sinal de tumor
5	Somente sinal de tumor

Para o reestadiamento, é avaliado o grau de concordância da regressão tumoral pela ressonância magnética com os resultados do relatório anatomopatológico utilizando os critérios de Ryan (KIM et al., 2016). Pelos critérios de Ryan, TRG1 e 2 são bons respondedores e TRG3-5 são tumores com baixa resposta.

Muitos estudos evidenciaram a variação individual da resposta a QRT relacionada à composição molecular de cada tumor, uma vez que seus efeitos estão relacionados a sua interação com diversos componentes e mecanismos celulares (DEL GOBBO; FERRERO, 2017; GHADIMI et al., 2005; KIM et al., 2007; REDALEN et al., 2016; WATANABE et al., 2006; ZHOU et al., 2021). O estudo de marcadores moleculares que possam ser usados para a predição da eficácia e

toxicidade da QRT neoadjuvante em câncer retal localmente avançado ainda é intensamente e atual (KONCINA et al., 2020).

As ciências “ômicas” (como genômica, transcriptômica, metabolômica, proteômica e lipidômica) representam uma importante área de estudo de uma grande quantidade de biomoléculas, permitindo uma abrangência de elementos envolvidos nos fenômenos biológicos estudados e possibilitando predições com elevados índices de acerto (p.e. a ocorrência ou não de uma regressão tumoral em resposta à QRT neoadjuvante, diagnóstico), além de fornecer informações para entender melhor o fenômeno estudado (BOCCIO et al., 2017; STRYBEL et al., 2022).

Diante do acima exposto, a proposta do presente trabalho é identificar moléculas endógenas diferenciais que possam ser utilizadas como possíveis candidatos a biomarcadores da resistência à terapia neoadjuvante e moléculas que ajudem no entendimento do câncer de reto para definir a melhor abordagem no tratamento.

1.3. Lipidômica aplicada ao estudo de câncer de reto

A lipidômica surgiu como um segmento intimamente relacionado à metabolômica e é dedicada ao estudo global do lipidoma, incluindo sua composição bioquímica, vias e redes lipídicas nos sistemas biológicos (HAN; GROSS, 2022). Diante das limitações nos estudos de outras ômicas, como genômica que não se mostrou inteiramente confiável no estudo do câncer, a lipidômica se apresenta como uma opção com comprovada relação com funções envolvidas na carcinogênese. Essa importante ferramenta tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico, prognóstico e no estudo do mecanismo de ação envolvendo a patogênese do câncer colorretal (CHAN et al., 2009; ECKER et al., 2021; FERNANDES MESSIAS et al., 2018; KITAMURA et al., 2019; LI et al., 2013; OKUNO et al., 2013; QIU et al., 2009; YANG et al., 2022, 2015). Por outro lado, estudos adicionais relacionados a associação da lipidômica com os mecanismos de resistência a QRT neoadjuvante de tumores de reto são escassos (BOCCIO et al., 2017; STRYBEL et al., 2022). É conhecido que a presença do câncer altera profundamente o metabolismo celular, em especial dos lipídios, devido a processos envolvidos no desenvolvimento do tumor, remodelação do tecido, alterações para garantir a sobrevivência celular e a metástase. A adaptação metabólica determina a evolução do câncer e atua também na ação de determinado quimioterápico, sendo influenciada pela micro-organização tumoral (RÖHRIG; SCHULZE, 2016).

A compreensão de um lipidoma necessita do conhecimento das várias classes de lipídeos presentes na matriz biológica, os quais apresentam as mais variadas funções, como: armazenamento de energia, membrana, sinalização celular, mensageiros intracelulares, energético, entre outros (MURO; ATILLA-GOKCUMEN; EGGERT, 2014). Estes processos estão intimamente conectados às vias de carcinogênese (transformação, progressão e metástases).

As principais classes de lipídios que podem constituir um lipidoma estão representadas na FIGURA 2.

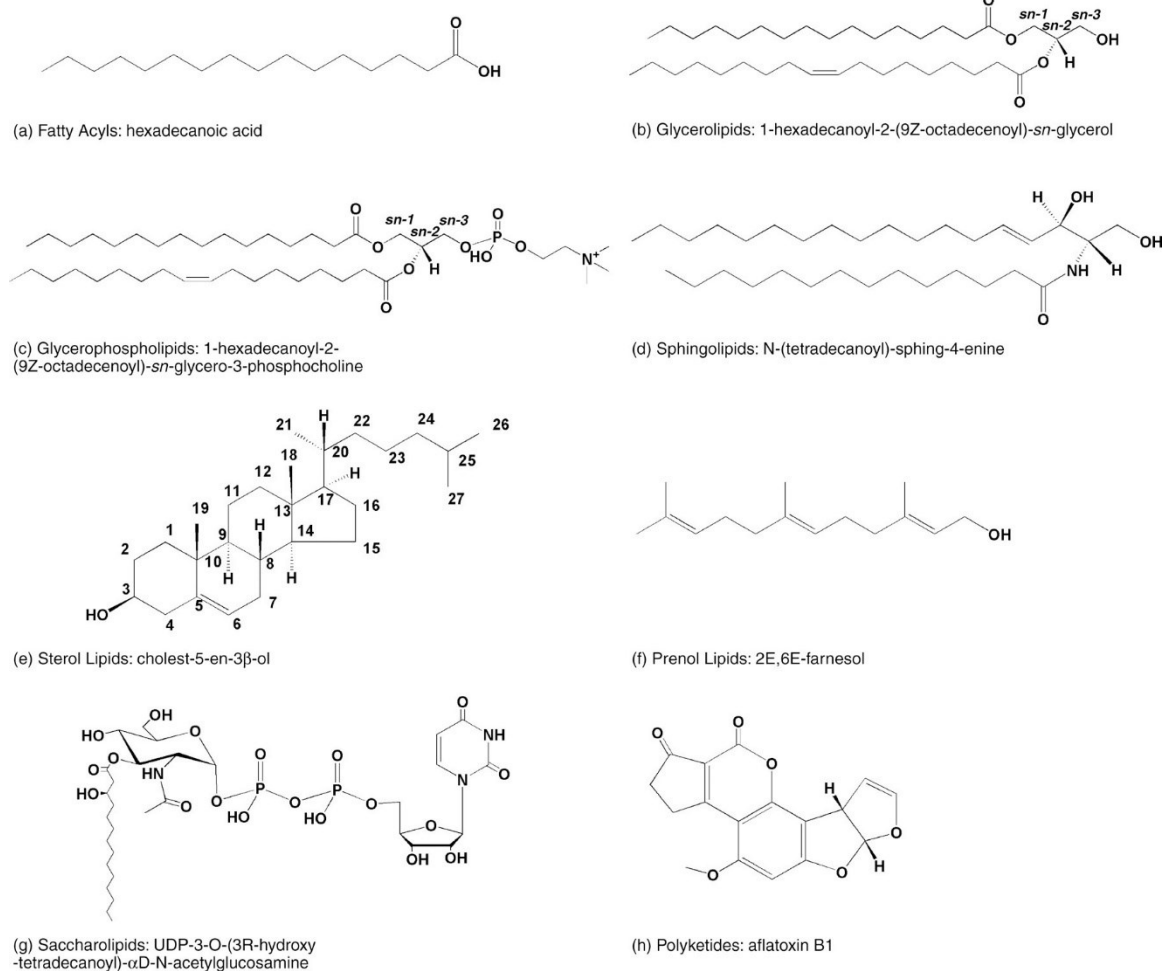


FIGURA 2. Estruturas representativas das classes lipídicas que conformam um lipidoma. Fonte: figura retirada de (FAHY *et al.*, 2005).

Os glicerofosfolipídios (GPLs) constituem como um dos principais componentes das membranas biológicas, responsável por funções de mensageiros ou precursores de outros mensageiros, envolvidos também em sinalização celular. O álcool esterificado ao grupo fosfato dos GPL é usado para a classificação deste tipo de lipídio: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) e fosfatidilglicerol (PG) (LIEBISCH *et al.*, 2020). Nos GPLs frequentemente são encontrados ácidos graxos com 16 e 20 átomos de carbono e geralmente de número par. Os ácidos graxos saturados ocorrem geralmente no C1 do glicerol enquanto a posição C2 do glicerol é frequentemente ocupada por ácidos graxos insaturados (uma ou mais ligações duplas na cadeia).

Os triacilgliceróis (TAGs), outra classe abundante em amostras biológicas, são formados basicamente por três ácidos graxos, cada um em ligação éster com um carbono da molécula de glicerol e estão envolvidos principalmente nos processos de reserva energética. São pertencentes a classe dos triacilgliceróis conforme discriminado no LipidMaps (LIEBISCH et al., 2020).

Os esfingolipídeos (SLs) são um complexo conjunto de compostos que apresentam uma base esfingóide no seu esqueleto, o qual é sintetizado a partir de uma serina e um ácido graxo de cadeia longa Acil-CoA e então convertidos em ceramidas (Cer), fosfoesfingolipídeos (PSL), glicosfingolipídeos (GSL). As ceramidas são as moléculas mais simples desse grupo e resultam de ácidos graxos ligados ao grupo amino (-NH₂) no C2 da esfingosina. As ceramidas são precursoras das esfingomielinas (SM) e glicosfingolipídeos (GSL). Estes lipídeos desempenham papel estrutural em membranas celulares, além de atuar como moléculas sinalizadoras de crescimento, diferenciação e apoptose (BARTKE; HANNUN, 2009).

Os ácidos graxos (FA) estão formados por uma cadeia carbônica alifática com uma terminação de ácido carboxílico de comprimento, ramificação e saturação variada da cadeia. Podem ser saturados, monoinsaturados quando contém uma ligação dupla ou poliinsaturados quando contém duas ou mais ligações duplas. Os ácidos graxos essenciais, ácido linoleico (C:18:2 ω6) e o ácido linolênico (C18:2 ω3), são precursores de outros ácidos graxos e de vários metabólitos importantes, como os eicosanóides, importantes no sistema imune e na resposta inflamatória.

Li et al. (2013) reportaram que entre os diferentes metabólitos diferenciais no soro de voluntários com CCR, destaca-se o aumento sérico de LPC (16:0), LPC (18:2), LPC (20:4) e LPC (22:6) nos estágios iniciais da doença e a redução dos ácidos graxos: 16:2, 18:0 e 20:3. Da mesma maneira, o aumento de PC e PE foi relatado em tecidos de CCR (CHAN et al., 2009). Por outro lado, foi evidenciado que o plasmalogênio de colina (P-16:1) estava reduzido em plasma de pacientes com câncer de reto em comparação aos voluntários saudáveis, dado que aponta este metabólito como um importante mediador na patogênese da doença (FERNANDES MESSIAS et al., 2018; MESSIAS et al., 2018). Os autores mostraram ainda que os níveis plasmáticos de malondialdeído, produto da lipoperoxidação lipídica, nos pacientes com câncer de reto no estadió III e IV foram superiores aos valores observados no grupo saudável e no grupo estadió 0. Alterações no perfil lipídico de fibroblastos parecem estar associadas a migração de células no

CCR, com aumento de alguns metabólitos lipídicos, quando comparados a fibroblastos normais (ácidos graxos, DAG, FA, PI, LPC e PE). Além desse achado, foi relatado que a sintetase de ácidos graxos, uma enzima crucial na síntese de ácidos graxos, está significativamente elevada nos fibroblastos (GONG et al., 2020).

O QUADRO 4 descreve os principais artigos publicados relacionando os biomarcadores lipídicos identificados em câncer de reto e cólon assim como as amostras e as técnicas de análise utilizadas.

QUADRO 4. Principais lipídios alterados em pacientes com câncer de reto e cólon em relação às amostras controle.

Amostra	Tipo de amostra	Classe de lipídeos	Nome dos lipídeos alterados	Técnica	Referências
Câncer colorretal	Soro (n=64 câncer e n=65 saudáveis)	Oleamida; Ácidos graxos	↓cis-9, 10-octadecenoamide; ↓ 14:0 e 16:0	GC-TOFMS; UPLC-QTOFMS	Qiu <i>et al</i> , 2009
Câncer colorretal	Tecido (n=31 câncer)	Glicerofosfolipídeos	↑PC; ↑ PE; ↑ 20:2, 18:1 e 20:1	HR-MAS NMR; GC-MS	Chan <i>et al</i> , 2009
Câncer colorretal	Plasma, eritrócitos e tecido adiposo (n=61 câncer e n=42 saudáveis)	Ácidos graxos	Plasma: ↑ AGS e; ↓AGPI ω3 (20:5 n-3); Eritrócitos: ↓18:2 n-6 e 20:5 ω3; Tecido adiposo: ↑ 20:4 ω6	CG-FID	Okuno <i>et al</i> , 2013
Câncer colorretal	Soro (n=26 estadio I e II, n=26 estadio III e IV e n=52 saudáveis)	Glicerofosfolipídeos; Ácidos graxos	↑ LPC(16:0); LPC(18:2); LPC(20:4); LPC(22:6); ↓ AG: 16:2, 18:0 e 20:3	DI-ESI(±)-FTICR MS	Li <i>et al</i> , 2013
Câncer colorretal	Tecido (n=82 câncer e normal)	Ácidos graxos	↑ AGPI ω6; ↓ AGPI ω3	CG-FID	Yang <i>et al</i> , 2015
Câncer retal avançado	Soro (n=18) coletados nos tempos 0, 14 e 28 dias de QRT pré operatória	Glicerofosfolipídeos; Esfingolipídeos	↓ SM(d18:2/18:1), LPC (16:0/0:0), LPC (15:1(9z)/0:0), LPE (22:5/0:0) em não respondedores antes da QRT neoadjuvante	LC-MS/MS	DEL BOCCIO <i>et al.</i> , 2017

Adenocar cinoma de reto	Plasma (n=23 câncer e n=18 saudáveis)	Glicerofosfolídeos; Ácidos graxos	↓ LPC (P-16:1); ↓ AGPI ω3	GC-FID; ESI-q-TOF	Messias et al., 2018a
Câncer colorretal	Tecido (n=11 câncer e normal)	Glicerofosfolídeos	↑ LPI (18:0) e LPS (18:0); ↓ PLA	LC-MS/MS	Kitamura et al, 2019
Câncer colorretal	Tecido (n=106 câncer e normal)	Glicerofosfolídeos; Esfingolídeos	↑TAG 56:4, 56:5, e 56:6 contendo AGPI (18:2, 20:2, 20:3, 20:4, 20:5, 22:4, 22:5, 22:6); ↑ SM	ESI-MS/MS	Ecker et al, 2021
Câncer colorretal	Exossomas do plasma (n=8 câncer e n=4 normal)	Glicerofosfolídeos; Esfingolídeos	↑ PC (34:1), PE (36:2), SM (d18:1/16:0, HexCer (d18:1/24:0) HexCer (d18:1/24:1): Câncer não metastático; ↑ Cer (d18:1/24:1): Câncer metastático	LC-MS/MS	Elmallah et al., 2022
Câncer colorretal	Plasma (n=24 câncer e n=12 saudáveis)	Esfingolídeos, Triacilgliceróis, Glicerofosfolídeos	Dignóstico: ↑ CerP(d15:0_22:0 + O); Prognóstico: ↑ TAG(11:0/18:0/18:0), TAG(18:0/18:0/18:1), PC(22:1/12:3), LPC(17:0)	LC-MS	Yang et al., 2022

HR-MAS NMR: high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance; GC-MS: Gas chromatography mass spectrometry; GC-TOFMS: gas chromatography time-of-flight mass spectrometry; UPLC-QTOFMS: ultraperformance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry; DI-ESI(±)-FTICR MS: Direct-infusion positive and negative ion electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry; LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; ESI-MS/MS: direct infusion electrospray ionization coupled with tandem mass spectrometry; ESI-q-TOF: high resolution mass spectrometry

A lipidômica também envolve o estudo de uma série de enzimas e compostos resultantes do metabolismo dos lipídios, com o aumento de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e eicosanóides pró-inflamatórios, enquanto há uma diminuição nos antioxidantes celulares, citocinas anti-inflamatórias e de alguns PUFAs (ácidos graxos poliinsaturados) e seus derivados anti-inflamatórios (DAS; MARTINEZ; RAY, 2014).

A aciltransferase é uma enzima importante na reação de remodelação. Por exemplo, a lisofosfatidilcolina aciltransferase 1 (LPCAT1), que transacila a LPC em PC apresenta uma correlação direta entre a reação de transacilação e a tumorigênese, já que é superexpressa em alguns tipos de câncer (DAS; MARTINEZ; RAY, 2014). Recentemente foi demonstrado que o aumento da expressão da LPCAT2 exerce importante ação na quimioresistência do câncer colorretal tratado com 5-fluorouracil e oxaliplatina (COTTE et al., 2018). Outras enzimas específicas, como as fosfolipases, formam mediadores lipídicos reguladores de múltiplos processos celulares que podem promover a tumorigênese, incluindo a proliferação, migração, invasão e angiogênese (PARK et al., 2012). A Fosfolipase A2 (PLA₂) representa uma família de enzimas que hidrolisam a ligação éster sn-2 de fosfolípidos e desempenham papéis importantes em doenças cardiovasculares, inflamatórias e câncer (SCOTT et al., 2010). Em outros estudos foram evidenciadas reduções na abundância de alguns lipídios de pacientes que não responderam ao tratamento, como SM(d18:2/18:1), LPC (16:0/0:0), LPC 15:1(9z)/0:0) e LPE (22:5/0:0) (BOCCIO et al., 2017). Alguns metabólitos regulados no plasma de bons respondedores foram associados ao metabolismo GPLs, SLs e PEs, enquanto metabólitos regulados no plasma de maus respondedores foram associados ao metabolismo da glutatona (STRYBEL et al., 2022).

Os dados na literatura parecem não trazer uma conclusão clara em relação ao uso da lipidômica como uma ferramenta útil na predição da resposta da QRT neoadjuvante, uma vez que há poucos dados disponíveis.

1.4. Técnicas analíticas usadas no estudo do lipidoma

A diversidade estrutural dos lipídeos exige várias abordagens que envolvem diferentes técnicas de separação de classes, o que impossibilita o uso de solução única adequada para a determinação de todas as classes de lipídeos. No presente trabalho daremos destaques as técnicas usadas, cromatografia e espectrometria de massas.

A cromatografia líquida (LC) e a cromatografia de fluidos supercríticos são técnicas amplamente utilizadas que preservam as informações dos lipídeos, uma vez que não exigem derivatização e são também comumente usadas acopladas a espectrômetros de massas (PITT, 2009). Esta associação tem possibilitado a análise e compreensão de pequenas moléculas no contexto biológico e de desenvolvimento do câncer. Esta técnica é capaz de fornecer resultados quantitativos e qualitativos dos lipídeos das amostras, sendo bastante eficiente para a análise de glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos, TAGs, DAGs, MAGs (monoacilgliceróis) e ésteres de colesterol. A adição de padrões internos apropriados é necessária para a análise lipidômica quantitativa destas classes lipídicas (IVANOVA et al., 2009).

Na análise por espectrometria de massas, as moléculas de uma determinada amostra são transformadas em íons no estado gasoso, permitindo sua separação de acordo com sua razão massa (m) e carga (z), normalmente representado por m/z . Assim, em íons carregados ($M+1$, se protonado; $M+23$, se sodiado; $M-1$, se desprotonado, etc) a razão m/z reflete na massa molecular do íon, em Daltons (Da).

A alta resolução da espectrometria massas facilita a identificação de lipídeos, embora não seja confirmatória na ausência de padrões autênticos ou softwares específicos para identificação dessa classe de biomoléculas. Por este motivo, bancos de dados livres como LipidMaps, Metlin, HMDB e KEGG podem auxiliar na identificação putativa desses compostos.

As principais etapas da aquisição de dados lipidômicos por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas são: i) extração de lipídios da amostra biológica; ii) separação por cromatografia e introdução de lipídios no espectrômetro de massas; iii) ionização dos lipídios; iv) separação destes íons; e v) detecção de íons. (WU et al., 2020).

O método utilizado neste estudo é baseado em uma tecnologia MS^E (varredura de baixa e alta energia), um método de aquisição independente de dados, onde é obtida informação sobre a molécula precursora ionizada e seus fragmentos ionizados gerados, o que simplifica a análise e facilita a identificação de compostos. Foi utilizado a cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC) acoplada a espectrometria de massas em alta resolução no equipamento da marca WATERS, modelo Acquity UPLC H-Class System Xevo G2-XS Q-TOF MS^E. Esse modo consiste na aquisição simultânea de dados de baixa e alta energia utilizando uma rampa entre 15 eV a 30 eV aplicada. Durante uma mesma varredura cromatográfica é obtido informações de íons precursores, com baixa energia de colisão e fragmentos, com alta energia, permitindo a detecção de uma grande variedade de classes de lipídeos (VORKAS, 2018).

1.5. Ferramentas de bioinformática para o tratamento de dados

Os dados gerados pelas análises “ômicas” são abundantes e complexos e, por isso, ferramentas adequadas de tratamento de dados devem ser empregadas no processamento destes, para evitar erros e manter a integridade das variações biológicas inspecionadas. Os dados gerados no presente trabalho foram recebidos e processados pelo software MassLynx, (Waters Corporation). Este software controla o sistema acoplado de cromatografia e espectrometria de massas da Waters Corporation, desde o gerenciamento do solvente e amostras até as configurações do espectrômetro de massas. O processamento de sinais espectrométricos (valores de m/z , tempo de retenção e intensidades) e anotação de características foi realizado no ProgenesisTM QI software v2.4.69.11 (Nonlinear Dynamics - Newcastle, UK) usando um fluxo de análises de co-detecção: seleção de adutos esperados nas amostras analisadas; alinhamento de rodadas (*runs*) para fazer os dados comparáveis e compensar a variação entre rodadas de leitura; seleção de picos para discernir entre íons de compostos sobrepostos a partir de um mapa único de íons gerado na combinação dos dados alinhados de todas as amostras; deconvolução de íons semelhantes mas que podem ser agrupados segundo a sua massa-carga e os adutos declarados; e identificação de compostos usando os dados dos íons definidos nos passos anteriores e comparando com banco de dados de referência.

Os dados de abundância relativa dos íons detectados são corrigidos usando um método baseado na consistência de amostras de QC (Random Forest QC Signal Correction - RF-QCSC)

implementado no pacote *statTarget* (LUAN et al., 2018). A abundância derivada da intensidade de sinal pode ser alterada por fatores não relacionados às condições biológicas definidas no desenho experimental. Por exemplo, algumas amostras podem ter as suas concentrações de lipídios alterados por degradação e síntese artificial devido ao efeito da temperatura, reações de oxidação ou outros fatores, assim como uma variação na detecção do equipamento de quantificação (LI et al., 2014). O método de correção de sinal visa ajustar os valores dos íons quantificados para aproximá-los à janela de valores possíveis presentes nos controles de qualidade. Este ajuste pode ser calculado de diferentes formas, desde ajuste a modelos lineares (por exemplo o *locally estimated scatterplot smoothing – loess* ou sua versão ponderada *lowess*) até métodos de predição de valores, como o *Random Forest* (DUNN et al., 2012).

Em seguida, são realizadas diferentes transformações nos dados para cumprir com requisitos dos métodos estatísticos ou para facilitar sua apresentação e plotagem. Métodos como filtragem e normalização são necessários para diminuir a influência de valores não relevantes e para adaptar a distribuição de valores a ser operados, respectivamente. Existe uma enorme variedade de métodos de transformação e filtragem muito bem descritos na literatura (GONZÁLEZ-RIANO et al., 2020).

A modelagem preditiva ou a análise estatística é uma etapa importante nos estudos “ômicos”. Nesta etapa são obtidos os resultados que baseiam as inferências biológicas para responder o proposto no desenho experimental. Modelos de análises de dados brindam confiança estatística em um entorno de cálculos complexos. Existe uma grande quantidade de modelos apropriados para implementação nesta etapa, mas os mais usados são os modelos estatísticos clássicos univariados e os modelos multivariados baseados em aprendizagem de máquinas (ANWARDEEN et al., 2023). Os modelos univariados permitem realizar uma análise diferencial comparando apenas variáveis individuais entre os grupos ou condições experimentais estudadas. Esta comparação permite calcular um valor de *p* para cada resultado que, posteriormente, pode ser corrigido pela quantidade de variáveis consideradas no desenho inicial. O valor de *p* está relacionado à probabilidade de uma variável não cumprir uma hipótese pré definida (hipótese nula) pelo teste estatístico usado. Esta abordagem, embora ofereça resultados úteis nos estudos “ômicos”, tem limitações quando a amostra é representada por um número de variáveis muito maior do que o número de amostras,

além de não conseguir capturar a relação existente entre variáveis para caracterizar a diferenciação de grupos. Já os métodos multivariados permitem estabelecer um modelo de classificação que por sua vez pode fornecer uma lista de variáveis que conferem a capacidade preditora. Outros métodos multivariados que não usam informação sobre o rótulo das amostras são conhecidos como não supervisionados e possibilitam calcular a relação não enviesada entre amostras, como os métodos de clusterização e de distância/similaridade. Métodos como *Random Forest* (classificação de variáveis por árvores de decisão), *Support vector machines* (separação de amostras por hiperplanos), *partial least squares – discriminant analysis* (classificação usando projeção em componentes principais) e modelos lineares são os métodos mais usados tanto para predição quanto para seleção de variáveis relevantes.

Neste estudo foram realizadas análises univariadas usando o pacote *limma* (RITCHIE et al., 2015) implementado na linguagem de programação R (R CORE TEAM, 2022) usando o IDE (ambiente de desenvolvimento integrado) Rstudio (RSTUDIO TEAM, 2020). O método *limma* é um algoritmo muito usado nas análises de expressão gênica tanto de dados obtidos por microarranjos quanto dos obtidos por sequenciamento. Este método incrementa a confiança do valor de p das variáveis comparadas usando a estatística t moderada do *empirical Bayes*.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente têm sido propostas para o tratamento do câncer de reto, diferentes técnicas minimamente invasivas ou até mesmo abordagens não cirúrgicas que visam a preservação não somente da função esfíncteriana, mas também do órgão e de suas condições funcionais. Para se adotar tais práticas é de extrema importância que estejam disponíveis dados prévios capazes de demonstrar, com segurança, não somente a resposta clínica, mas também a possível resposta patológica após a terapia neoadjuvante.

No presente estudo, foi avaliada a capacidade dos dados obtidos pelo estudo do lipidoma em prever a resposta tumoral ao tratamento neoadjuvante em pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de reto localmente avançado. A investigação foi realizada através de uma avaliação sistemática e ampla da composição lipídica (ácidos graxos e outras classes de lipídeos) visando subsidiar a informação sobre o desenvolvimento do tumor e a resposta ao tratamento. Métodos modernos de alta sensibilidade e alta resolução permitem identificar moléculas diferenciais no tecido destes pacientes e assim abrir novos caminhos para contribuir no diagnóstico da doença e na escolha de terapia adequada.

A contribuição da lipidômica em prever a resposta a QRT neoadjuvante poderá auxiliar, junto com outros métodos de imagem já usados, como a ressonância magnética, na identificação prévia dos pacientes com boa resposta ao tratamento, que em teoria, poderiam ser candidatos ao tratamento poupador de órgão. Aproximadamente 1/4 dos pacientes poderão apresentar resposta patológica completa ao tratamento neoadjuvante e não apresentarão células tumorais viáveis no espécime cirúrgico. Pacientes que manifestam regressão tumoral satisfatória após RQT apresentam melhor prognóstico (WEISER, BEETS-TAN et al. 2014)

De maneira semelhante, os pacientes com resposta desfavorável à terapia, considerados maus respondedores, ou seja, aqueles que não apresentam regressão tumoral satisfatória e são candidatos naturais à ressecção cirúrgica radical convencional, se beneficiarão por evitar um tratamento desnecessária adicional e prolongar o tempo para a realização do procedimento cirúrgico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho propõe avaliar as alterações do lipidoma no tecido tumoral de pacientes com adenocarcinoma de reto localmente avançado como efeito da QRT neoadjuvante a partir de uma assinatura molecular capaz de fornecer informação sobre a resposta tumoral ao tratamento.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as alterações no perfil lipidômico no tecido tumoral de pacientes antes e após sua exposição à QRT neoadjuvante,
- Identificar moléculas diferenciais que possam ser utilizados como possíveis candidatos a biomarcadores de resistência a QRT neoadjuvante, comparando o perfil lipidômico de pacientes que responderam com os que não responderam à QRT neoadjuvante.

4. CAPÍTULO 1: publicado

Rectal Cancer Tissue Lipidome Differs According to Response to Neoadjuvant Therapy



Article

Rectal Cancer Tissue Lipidome Differs According to Response to Neoadjuvant Therapy

Salvador Sánchez-Vinces ¹, Gustavo Henrique Bueno Duarte ¹, Marcia Cristina Fernandes Messias ¹,
Caroline Fernanda Alves Gatinoni ¹, Alex Ap. Rosini Silva ², Pedro Henrique Godoy Sanches ²,
Carlos Augusto Real Martinez ³, Andreia M. Porcari ² and Patricia de Oliveira Carvalho ^{1,*}

¹ Health Sciences Postgraduate Program, São Francisco University—USF, Bragança Paulista, São Paulo 12916-900, Brazil; salvador.vinces@mail.usf.edu.br (S.S.-V.); gustavo_duarte95@hotmail.com (G.H.B.D.); marcia.cfmessias@gmail.com (M.C.F.M.); carolgatinoni@gmail.com (C.F.A.G.)

² MS4Life Laboratory of Mass Spectrometry, Health Sciences Postgraduate Program, São Francisco University—USF, Bragança Paulista, São Paulo 12916-900, Brazil; alex.rosini@mail.usf.edu.br (A.A.R.S.); pedrohgodoy@gmail.com (P.H.G.S.); andreia.porcari@usf.edu.br (A.M.P.)

³ Department of Colorectal Surgery, São Francisco University—USF, Bragança Paulista, São Paulo 12916-900, Brazil; carlos.martinez@usf.edu.br

* Correspondence: patricia.carvalho@usf.edu.br

Abstract: Rectal cancer (RC) is a gastrointestinal cancer with a poor prognosis. While some studies have shown metabolic reprogramming to be linked to RC development, it is difficult to define biomolecules, like lipids, that help to understand cancer progression and response to therapy. The present study investigated the relative lipid abundance in tumoral tissue associated with neoadjuvant therapy response using untargeted liquid chromatography–mass spectrometry lipidomics. Locally advanced rectal cancer (LARC) patients (n = 13), clinically staged as T3–4 were biopsied before neoadjuvant chemoradiotherapy (nCRT). Tissue samples collected before nCRT (staging) and afterwards (restaging) were analyzed to discover lipidomic differences in RC cancerous tissue from Responders (n = 7) and Non-responders (n = 6) to nCRT. The limma method was used to test differences between groups and to select relevant feature lipids from tissue samples. Simple glycosphingolipids and differences in some residues of glycerophospholipids were more abundant in the Non-responder group before and after nCRT. Oxidized glycerophospholipids were more abundant in samples of Non-responders, especially those collected after nCRT. This work identified potential lipids in tissue samples that take part in, or may explain, nCRT failure. These results could potentially provide a lipid-based explanation for nCRT response and also help in understanding the molecular basis of RC and nCRT effects on the tissue matrix.

Keywords: rectal cancer; lipidomics; response to neoadjuvant therapy



Citation: Sánchez-Vinces, S.; Duarte, G.H.B.; Messias, M.C.F.; Gatinoni, C.F.A.; Silva, A.A.R.; Sanches, P.H.G.; Martinez, C.A.R.; Porcari, A.M.; Carvalho, P.d.O. Rectal Cancer Tissue Lipidome Differs According to Response to Neoadjuvant Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 11479. <https://doi.org/10.3390/ijms241411479>

Academic Editors: Tiago Rodrigues and Roger Chammas

Received: 28 May 2023

Revised: 30 June 2023

Accepted: 5 July 2023

Published: 14 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Rectal cancer (RC) is one of the top four most deadly cancers worldwide [1]. In the last three decades, there has been a reduction in the incidence of RC and a decrease in its mortality, possibly due to both diagnostic/therapeutic improvements and secondary prevention in high-income countries. However, a constantly increasing incidence in middle- and low-income countries has been observed, underscoring the current importance of this pathology. Clinical characteristics of RC include a change in gastrointestinal habits (i.e., diarrhea, constipation), presence of hematochezia, rectal tenesmus, abdominal pain and systemic symptoms such as iron-deficiency anemia, weight loss, and weakness. Effective coordination among healthcare professionals is required for RC management due to the interdisciplinary nature of its treatment. A multidisciplinary team of oncologists, surgeons, radiotherapists, radiologists, pathologists, and endoscopists is necessary for an optimal

oncological outcome [2,3], as shown by a study analyzing unsuccessful multidisciplinary discussions as predictive factors for positive resection margins, as well as the absence of radiotherapy [4]. In medical research, one of the most important aspects is the establishment and development of better therapeutic options for patients. Precise and personalized medical strategies based on the specific metabolite or molecular signatures and cellular context are important to take account of individual variability in cancer metabolism [5]. The characteristics of the mass spectrometry (MS) analytical technique has become the standardized basis of oncological approaches, identifying therapeutically significant components in clinical laboratories, such as endogenous or exogenous molecules and their metabolites, proteins profiling, etc. [6].

When rectal cancer is diagnosed as locally advanced (LARC) (cT3–T4, with perirectal fat or adjacent structure invasion, respectively), or with metastatic perirectal lymph nodes (N+), multimodal strategies with preoperative chemoradiotherapy become crucial for optimizing results. The combination of neoadjuvant chemoradiotherapy (nCRT) and total mesorectal excision (TME) has become the standard option for LARC, highlighting the importance of a multidisciplinary evaluation [4]. Currently, there are no molecular markers in rectal cancer available that can evaluate specific situations or treatments such as when a patient needs preoperative treatment for a localized or locally advanced rectal cancer, indicating that the surgery will not be radical. Similarly, there are no clinically relevant markers that can predict the response to radiotherapy (RT) or CRT [7].

5-Fluorouracil (5-FU) is currently used as the standard chemotherapeutic agent for locally advanced rectal cancer nCRT, while additional chemotherapeutic agents, including capecitabine and oxaliplatin, have shown promise in increasing the complete pathologic response (pCR) compared to the regimen using 5-FU [8] alone. However, the response to nCRT in locally advanced rectal cancer varies among patients. A partial response is present in ~40% of patients and 8–20% of patients reach a pCR at the time of surgery, while some tumors (~20%) exhibit resistance to nCRT (progression or minimal regression to stable disease) [8]. Moreover, given the observation of pCR in a significant proportion of patients undergoing nCRT and to avoid the adverse effects of surgery, alternative approaches such as “watch and wait” or local transanal excision have been suggested [8]. Therefore, there is a critical need to understand the response to nCRT thereby enabling early selection of patients who would or would not benefit from nCRT. Some pathological characteristics have been studied as predictors of the response to nCRT: tumoral differentiation, circumferential tumor, mucosal histology and macroscopic ulceration are associated with poor response to nCRT [9]. Moreover, imaging methods, like positron emission computed tomography, magnetic resonance imaging and endoscopic ultrasound are used for pretreatment staging, evaluation of nCRT response and recovery after nCRT. The tumor regression rates and circumferential resection margin, defined by imaging techniques, can potentially predict the response to nCRT in rectal cancer [9]. However, the usefulness of these clinicopathological and radiological characteristics is currently limited due to the low sensitivity and specificity of rectal cancer [7].

The present work proposed to evaluate the changes in the lipidome of tissue from patients with adenocarcinoma before and after the treatment with neoadjuvant CRT, looking for changes in molecular signatures that can help in understanding the tumor response to treatment.

2. Results

2.1. Baseline Characteristics of Patients

Table 1 shows the baseline characteristics of participant patients. Values are presented by groups. All patients were staged as T3–4 before nCRT.

Table 1. Baseline characteristics of patients grouped by the response to nCRT.

	Non-Responders	Responders	<i>p</i> -Value ²
Subjects	6	7	-
Sex			
F	1	3	0.31
M	5	4	
Age ¹ (years)	65.3	68.2	0.90
BMI ¹	26.5	28.8	0.49
cTNM staging			
T3–4	6	7	-
N0	1	1	-
N1–2	5	6	-
M0	6	7	-
M1	0	0	-
ypTNM			
T1–2	0	2	-
T3–4	6	5	-
N0	0	4	-
N1–2	6	3	-
M0	5	7	-
M1	1	0	-

¹ Mean value by group. ² *p*-value of *t*-test for quantitative values, and Chi-squared test for categorical data, when comparing by response group. BMI: body mass index. F: female. M: male.

2.2. Feature Selection

After data preprocessing, statistical analyses were performed. First, an exploratory analysis using PCA plotting shows the fitted cluster formed by the QC samples and the dispersion of the experimental samples (Figure 1a for negative mode and Figure 1b for positive mode). Preprocessed data can be found in Table S1 for abundance in positive ionization mode and in Table S2 for negative ionization mode.

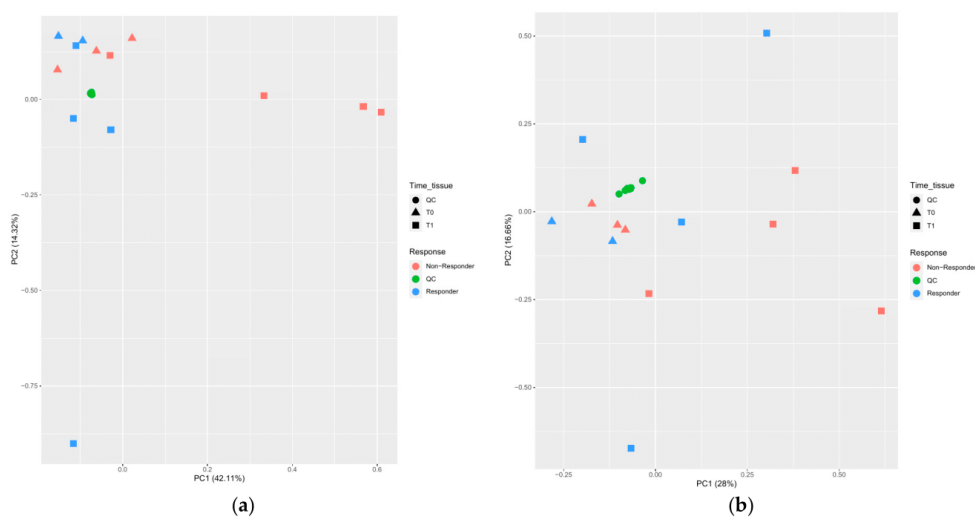


Figure 1. PCA plots for samples after preprocessing data. Features obtained from (a) negative ionization mode and (b) positive ionization mode for tissue samples. The shape of the data points represents the moment of the analysis (T0 for pre-nCRT and T1 for post-nCRT). Colors represent the response of patients. The quality control (QC) samples are represented by a specific color and shape.

After exploratory analysis, the groups were evaluated using the difference in abundance expressed by their fold-change and the *p*-value obtained by applying the limma model. In the Responders vs. Non-responders comparison before nCRT, 20 features were selected from the negative mode and 47 from the positive mode. In the Responders vs. Non-responders comparison after nCRT, 43 features were selected from the negative mode and 537 from the positive mode.

Annotations were then proposed for those features with enough evidence according to the confidence level mentioned in the methods. Thirty-two features were annotated for the comparison before nCRT and 424 features for the comparison after nCRT.

Additionally, the study used the Lipid Ontology tool (Lion/web) [10] to facilitate the interpretation of these annotated lipid profiles. This method maps the annotated lipids by exact match or similarity defined by the tool itself and compared with databases of biological pathways, functions, or structures. The result is a list of suggestions in which the lipids in question may be participating and then ranked according to the FDR *q*-value and the sign of the effect.

Tables 2 and 3 show the list of features selected and annotated for each comparison, mass error and the statistical results.

Table 2. Relevant annotated ions selected by statistical analysis (positive and negative ion mode) of the comparison of samples from Responder vs. Non-responder patients before nCRT.

Feature	Short Annotation	Mass Error (ppm)	logFC	<i>p</i> -Value
6.86_536.4819 n	FAHFA 34:1;O	2.7717	4.0269	0.0044
14.65_668.6521 <i>m/z</i>	Cer 42:0;O3	−4.5356	−3.9227	0.0055
11.53_792.5733 <i>m/z</i>	PE 36:0	−3.6046	3.5604	0.0070
8.73_747.5194 <i>m/z</i>	PG 34:1	1.6196	3.4809	0.0084
3.58_924.5146 n	CL 36:4	1.8969	−3.3525	0.0111
15.23_667.6479 n	Cer 42:0;O3	0.0813	−3.3483	0.0112
2.06_297.2431 <i>m/z</i>	FA 18:1;O	−1.4135	3.3013	0.0124
6.84_542.4942 <i>m/z</i>	WE 34:4	2.1087	3.4591	0.0144
1.15_599.3194 <i>m/z</i>	LPI 18:0	−1.2720	−3.2304	0.0144
2.10_352.3573 <i>m/z</i>	FOH 21:1	−0.3582	3.4540	0.0145
1.21_330.3361 <i>m/z</i>	Phytanic acid	−1.6217	−3.2296	0.0223
4.09_534.2232 <i>m/z</i>	LPS 16:1	0.6332	3.0313	0.0320
1.69_537.3200 <i>m/z</i>	LPG 20:1	0.3560	2.8287	0.0321
1.82_427.3894 <i>m/z</i>	CAR 18:2	−0.0624	−3.0241	0.0324
1.08_434.2429 n	LPC 18:2	−1.0527	−2.8146	0.0330
1.06_564.3305 <i>m/z</i>	LPC 18:2	−0.3987	−2.8109	0.0332
3.35_924.5148 n	CL 36:4	2.0625	−3.0082	0.0333
1.34_356.3151 <i>m/z</i>	FA 19:0;O	−2.4826	3.0061	0.0334
14.42_923.6832 <i>m/z</i>	PC 44:6;O	−1.7134	−2.9993	0.0338
1.54_532.3411 <i>m/z</i>	PE 22:0	0.4703	−2.7921	0.0344
15.03_728.6416 <i>m/z</i>	Cer 42:0;O3	0.8472	−2.7354	0.0382
1.13_504.3094 <i>m/z</i>	LPE 20:2	−0.2464	−2.7346	0.0383
4.86_578.4560 <i>m/z</i>	CAR 26:0	2.7616	−2.8895	0.0409
14.68_665.6321 n	Cer 42:1;O3	−0.1767	−2.6842	0.0420
4.93_818.5918 <i>m/z</i>	PG 36:1	1.5637	2.8517	0.0436
11.70_716.5240 <i>m/z</i>	PC 31:1	0.6475	2.6554	0.0442
9.01_560.5017 <i>m/z</i>	Arginine-betaxanthin	0.7099	2.8436	0.0442
2.94_702.3752 <i>m/z</i>	Nodulisporic acid	−1.9160	2.8164	0.0463
3.30_468.1815 <i>m/z</i>	1-tauro-dinor-PGE1	−3.0617	2.6267	0.0465
1.41_411.3572 <i>m/z</i>	Aplidiasphingosine	−2.5984	2.8115	0.0467
14.33_844.6528 <i>m/z</i>	HexCer 40:1;O3	1.1088	−2.6115	0.0478
2.59_322.2736 <i>m/z</i>	FA 18:2	−1.5321	2.7891	0.0485

ppm: parts per million; logFC: logarithm 2 of fold change.

Table 3. Relevant (adj.*p*-value < 0.05) annotated ions selected by statistical analysis (positive and negative ion mode) of the comparison of samples from Responder vs. Non-responder patients after nCRT.

Feature	Short Annotation	Mass Error (ppm)	logFC	<i>p</i> -Value	adj. <i>p</i> -Value
4.93_818.5918 <i>m/z</i>	PG 36:1	1.5637	−5.4123	3.76×10^{-7}	0.0009
4.62_793.5782 <i>m/z</i>	PG O-40:5	4.9132	−5.1380	1.41×10^{-6}	0.0013
5.77_802.5954 <i>m/z</i>	PG O-38:4	−0.3161	−4.8490	5.30×10^{-6}	0.0032
4.71_774.5655 <i>m/z</i>	DGTS 34:2	1.3446	−4.6809	1.11×10^{-5}	0.0040
5.57_776.5799 <i>m/z</i>	PG O-34:1	−0.0956	−4.5629	1.84×10^{-5}	0.0050
4.48_758.5688 <i>m/z</i>	PS O-36:1	−0.8144	−4.3578	4.29×10^{-5}	0.0075
3.25_787.5374 n	PC 34:3;O2	1.3170	−4.3056	5.29×10^{-5}	0.0081
4.16_772.5496 <i>m/z</i>	PS 36:1	1.1028	−4.2985	5.44×10^{-5}	0.0081
3.97_782.5685 <i>m/z</i>	PC 36:4	−1.1802	−4.1594	9.41×10^{-5}	0.0110
5.09_826.5937 <i>m/z</i>	PS O-38:1	0.5798	−4.1530	9.65×10^{-5}	0.0110
3.91_771.5420 n	PC 34:0;O	0.7265	−4.1264	1.07×10^{-4}	0.0112
2.08_908.5738 <i>m/z</i>	PS 42:3	−4.5221	−4.0815	1.27×10^{-4}	0.0121
3.86_790.5596 <i>m/z</i>	HexCer 38:3;O2	0.2829	−4.0124	1.65×10^{-4}	0.0132
2.26_845.5431 n	PS 38:3;O2	1.4796	−3.9826	1.84×10^{-4}	0.0132
4.16_794.5319 <i>m/z</i>	PC 34:3;O	1.6877	−3.9650	1.97×10^{-4}	0.0132
3.65_866.6132 <i>m/z</i>	PI O-36:2	1.7662	−3.9411	2.15×10^{-4}	0.0132
3.51_798.5834 <i>m/z</i>	PC 40:6	4.5004	−3.9329	2.22×10^{-4}	0.0132
3.56_802.5708 <i>m/z</i>	PE 42:5;O	−4.4821	−3.8976	2.53×10^{-4}	0.0143
3.37_842.6042 <i>m/z</i>	PC O-42:9	−1.9223	−3.7572	4.19×10^{-4}	0.0200
1.20_936.5734 n	PI 42:7	0.7129	−3.7415	4.43×10^{-4}	0.0207
4.06_796.5469 <i>m/z</i>	PS O-36:2	0.7371	−3.7077	4.99×10^{-4}	0.0217
4.09_789.5528 n	PS 36:1	0.9802	−3.6620	5.85×10^{-4}	0.0241
4.09_782.5677 <i>m/z</i>	PS 38:1	−2.1462	−3.6221	6.71×10^{-4}	0.0251
1.13_786.5164 <i>m/z</i>	MGDG 34:7	1.8204	−3.5987	7.27×10^{-4}	0.0263
1.97_844.5337 <i>m/z</i>	PS(PGE1/18:0)	0.2683	−3.5337	9.06×10^{-4}	0.0301
2.08_849.5698 n	PS 38:1;O2	−3.9149	−3.5339	9.06×10^{-4}	0.0301
2.26_853.5469 n	PS 40:5;O	0.0096	−3.4565	1.17×10^{-3}	0.0354
10.17_651.5341 <i>m/z</i>	DG 40:6	−0.8063	3.4514	1.19×10^{-3}	0.0356
4.02_778.5745 <i>m/z</i>	PE O-38:3	3.1779	−3.4113	1.36×10^{-3}	0.0386
2.59_897.6676 <i>m/z</i>	PC 40:2;O	−1.7946	−3.3641	1.58×10^{-3}	0.0411
1.97_542.2622 <i>m/z</i>	LPE 20:3	−4.3578	3.3272	1.78×10^{-3}	0.0443
1.38_498.2568 <i>m/z</i>	LPE 18:3	−4.8319	3.2864	2.03×10^{-3}	0.0478
7.61_782.7139 <i>m/z</i>	PC dO-40:0	−1.2526	3.2809	2.06×10^{-3}	0.0478
2.10_359.1645 <i>m/z</i>	Lactosamine	−4.5984	3.2805	2.07×10^{-3}	0.0478
3.09_847.5560 n	PC(16:0/TXB2)	−1.7813	−3.2521	2.26×10^{-3}	0.0494

ppm: parts per million; FC: fold change.

Table S1 contains the detailed information of the complete list of features obtained from the analysis (such as fragment matches, ion mode, adducts and annotation scores) of the tissue samples and the complete statistical report from limma analysis results.

Table 4 shows the top ten enrichments using the relevant (adj.*p*-value < 0.05) annotated lipids from the Responder vs. Non-responder comparison after nCRT. The Term ID is the ID defined by LION; the Description is the mapped/annotated lipid name; the Annotated column informs the number of lipids from the query present in the enrichments. The *p*-value is the statistical significance and FDR *q*-value is the corrected *p*-value. The column “Regulated” indicates whether the suggested term is more represented (UP) or less represented (DOWN) in the Responder than in the Non-responder group.

Table 4. LION analysis results. Lipid ontology enrichment analysis of the features with the suggested annotation.

Term ID	Description	Number of Lipids Mapped by LION	p-Value	FDR q-Value	Regulated
LION:0000014	glycerophosphoglycerols [GP04]	4	0.00024	0.00907	DOWN
LION:0012009	lipid-mediated signaling	3	0.00037	0.00907	UP
LION:0000011	glycerophosphoethanolamines [GP02]	3	0.00733	0.11972	UP
LION:0000093	headgroup with negative charge	15	0.06723	0.63618	DOWN
LION:0002966	fatty acid with less than 2 double bonds	26	0.07736	0.63618	DOWN
LION:0012080	endoplasmic reticulum (ER)	9	0.0779	0.63618	UP
LION:0000095	headgroup with positive charge/zwitter-ion	7	0.0943	0.6601	UP
LION:0012081	mitochondrion	6	0.12343	0.66542	DOWN
LION:0002949	fatty acid with 19–21 carbons	14	0.13515	0.66542	DOWN
LION:0000467	contains ether-bond	7	0.1358	0.66542	DOWN

3. Discussion

In this study, we focus on tissue lipids endeavoring to detect a discriminatory profile or specific molecules capable of identifying patients who do not respond to nCRT. Biomarkers for nCRT response in LARC could personalize treatment strategies to improve response rates and survival outcomes. Despite the small sample size analyzed, our results indicate 67 relevant annotated lipids that drive the difference between Non-responders and Responders. Figure 2 summarizes the results of the most differential lipids. The results suggest a high confidence level (adjusted p -value < 0.05) list of features that discriminate between tissue samples from patients who are Responders to nCRT when compared to Non-responder patients after nCRT (T1) with a suggested identification of 35 lipids. When comparing the same groups before nCRT (T0), a list of 32 selected features was obtained with raw p -values < 0.05 and $\log_2\text{FoldChange} > 2$ and suggested identifications.

The glycerophospholipids are the most abundant phospholipids and the major component of cell membranes. Their glycerol backbone can be esterified by fatty acids with different functional heads, such as choline, ethanolamine or glycerol. These residues can be attached to the glycerol by an O-acyl, or O-alkyl, or O-alk-1'-enyl (plasmalogen). Among these lipids, some glycerophosphoglycerols (PG) are significantly increased in the samples of the Non-responder group, with three ether PG. Plasmalogen phospholipids, also known as plasmalogens, have shown increased levels in colorectal cancer cells when compared with non-tumoral cells [11–13], and together with other ether lipids, have been related to the pathogenesis and aggressiveness of cancer [13]. These ether lipids have various biological functions. They serve as a reservoir for second messengers and other biological effects associated with their ability to regulate ion channels that control cell physiology and the reduced expression of multi-drug resistance genes (like *MDR1*, *MRP1* and *ABCG2*) when alkylglyceronephosphate synthase (AGPS) is silenced. Their products (such as lysophosphatidic acid-ether) have been found to be reduced in cancer cell lines [14]. However, it is not clear whether these lipids have a structural or a signaling role in cancer progression. There were increased levels, in Non-responder samples, of ether lipids in other glycerophospholipids, such as phosphocholine (PC O-42:9), phosphoethanolamine (PE O-38:3), phosphoinositols (PI O-36:2) and phosphoserines (PS O-36:1, PS O-38:1, PS O-36:2). The diacylglycerophospholipids are some of the lipids more identified in our results and they were more abundant in the Non-responder group. Comparing response after nCRT, it was found that four compounds were more abundant in Responders: two of these were lysophosphoethanolamines (monoacylglycerophospholipids LPE 20:3 and LPE 18:3) and the others were lactosamine and one diacylglycerol (DG 40:6). While increased levels of lysophospholipids as a group have been related to cancer progression [15,16], a previous colorectal cancer study found an increased level of LPC [17], probably due to differences in chain length or the number of unsaturations. More studies are needed to determine the role of polyunsaturated LPE, or other lysophospholipids, in cancer progression and

response to therapy. When analyzing results before nCRT, an increased level of some diacylglycerophospholipids (PE 36:0, PC 31:1, PG 34:1 and PG 36:1) was detected in the tissue samples of Responders to nCRT, and a decreased level of monoacylglycerophospholipids (a cardiolipin CL 36:4 and the LPLs LPI 18:0, LPC 18:2, LPE 22:0, LPC 17:2) in the same samples.

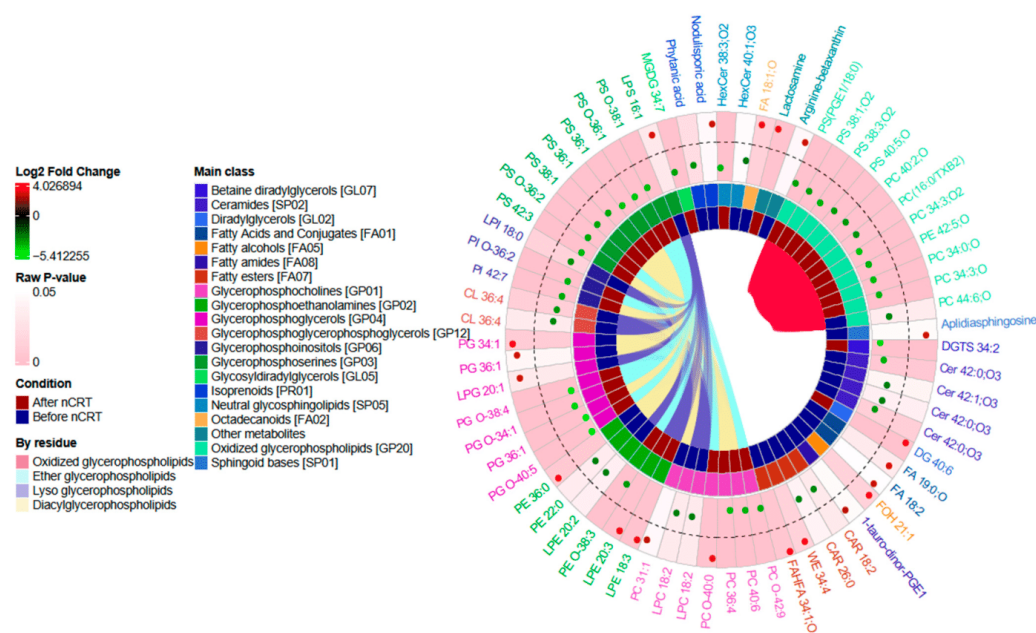


Figure 2. A circular plot of the statistically relevant lipids (cells) when comparing Responders vs. Non-responders. Each ring of the circle represents information on selected lipids: the outer area for fold change results in a green-red scale and a background color representing the p -value; the middle area represents the main class for each suggested lipid and the moment of analysis of the sample. The inner area links cells that form part of a specific subclassification by residue. Different cells with the same short annotation represent different features with the same suggested identification.

The glycosphingolipid GalCer, a HexCer from the Simple Glc series lipid subclass, is more abundant in Non-responders after nCRT. Correspondingly, GlcCer is more abundant before nCRT for Non-responders. This more abundant lipid has been related to the protection of the apoptosis attenuation of Cer-mediated signals [18,19]. These groups transactivate multidrug resistance 1/P-glycoprotein (*MDR1*) and multidrug resistance-associated protein 1 (*MRP1*) expression, stimulating drug efflux [20]. In a study of lung cancer cells, the enzyme glucosylceramide synthase was found to increase after chemotherapy suggesting that other glycolipids could be involved in drug resistance [21]. Lipids such as lysophosphatidic acid and ceramides influenced the length of telomeres and replicative immortality, therefore being involved in enabling replicative immortality [22]. Among the annotated lipids, we identified some ceramides without a unique subclass (Cer 42:0;O3, Cer 42:0;O3 or Cer 42:1;O3) as being more abundant in Non-responder patients before nCRT, but not after nCRT. The promotion of telomerase activity controls cancer replication since telomere shortening induces senescence [23]. The variability of composition, length and unsaturation of ceramides in cancer has been reported in other studies [22].

Other lipid classes highly represented in samples of the Non-responder group are the oxidized species of PC, PS and PE. Most of the annotated oxidized lipids have the oxidized PUFA residual, probably as a product of alkenyl glycerophospholipids oxidation [24]. There was only an observable difference before nCRT for one oxidized phosphatidylcholine. The presence of oxidized glycerophospholipids has been related to cellular homeostasis and disease progression. Recent studies have found the effect of an increased abundance of these lipids in the tumoral microenvironment regulating autophagy and inducing metastasis [25]. Interestingly, there are reports of the presence of oxidized PS on the surface of apoptotic cells [26], showing the necessity of acquiring more knowledge about the sources and functions of different lipid oxidation products in cancer. It is important to note that the differential oxidized lipid profile as a product of the response to nCRT differs from those reported by recent studies of colorectal cancer where tumor tissue lipidome was compared to adjacent non-tumor tissue lipidome but maintains a similarity to other classes such as sphingolipids and some of the glycerophospholipid subclasses [27,28].

Although the discussions presented here may be useful to better understand the effect of the neoadjuvant treatment on rectal cancer tissue, according to patient's clinical response, there are some limitations that should be considered. The limited amount of clinical information and the low number of patients reinforce the need for further validation of this experiment in an independent cohort. The dependence on confirmation of the suggested lipid annotation by targeted analysis, and their target quantitation would also add value to these findings. Despite these limitations, these results may help in planning and developing more comprehensive studies.

4. Materials and Methods

4.1. Study Groups and Sample Collection

Samples were obtained from 13 patients with locally advanced rectal cancer, of both sexes, aged 48 to 83, participating in an observational, analytical study with a prospective collection. The neoadjuvant treatment was performed according to the hospital protocol [29]: 5040 cGy (25 fractions for 6 weeks) and leucovorin (20/mg/m²/day) with doses of 5-fluorouracil administered intravenously at 425 mg/m²/day for three consecutive days on the first and last three days of radiation therapy. After 6 to 8 weeks, a surgical sample was collected during restaging. There was no interference with the hospital's clinical management.

Tumoral rectal tissue was collected during the diagnostic biopsy procedure before nCRT (T0) and the surgical procedure after the completion of nCRT (T1).

Sample collection was carried out at the Hospital Universitário São Francisco na Providência de Deus (Bragança Paulista, SP, Brazil). Patients were included after signing the Informed Consent Form approved by the Ethics and Research Committee (CEP) of the Universidade São Francisco (CAAE: 14958819.8.0000.5514).

To evaluate the effect of the nCRT, two unpaired comparisons were carried out in tissue samples: in the first one, lipidome from tumor tissues collected at staging (labeled as T0) of patients with some degree of TNM stage reduction (tumor downstaging) after having received nCRT, labeled as Responders, was compared with that of the group of patients with no tumor downstaging, labeled as Non-responders; in the second comparison, lipidome from tumor tissues collected at restaging (labeled as T1) of patients with some degree of TNM stage reduction (tumor downstaging) after having received nCRT, labeled as Responders, was compared with that of the group of patients with no tumor downstaging, labeled as Non-responders.

4.2. Matrix Extraction

Tissue Extraction

Liquid extraction was performed for fresh-frozen tissue collected in dry tubes. After thawing to room temperature, tissue sample metabolites were extracted using 500 µL of a cold solution of methanol-H₂O (4:1, v/v) and three liquid nitrogen freeze-thawing cycles.

Samples were submitted to ultrasound (8 min), centrifuged (9000 rpm, 10 min, 4 °C), and then dried under N₂ (g) flow. Samples were then resuspended in acetonitrile-water (1:1, v/v). Due to the tissue's weight variation, samples with ≤5 mg were resuspended in 180 µL of the resuspension solution. Samples weighing >5 mg had their resuspension volume corrected by the tissue mass to achieve a minimum concentration of 30 mg mL⁻¹. Samples used for quality control (QC) were acquired by aliquoting the resuspended samples to form a pool and then divided into 11 replicates and injected during batch acquisition after every 10 sample arrays for system suitability and instrumental variability evaluation.

4.3. LC-MS/MS Analysis

The untargeted analysis was performed using an ACQUITY UPLC H-Class (Waters, Manchester, UK) coupled to a XEVO-G2XS QToF Mass Spectrometer (Waters, Manchester, UK). Mobile phase A was composed of a solution of Acetonitrile:H₂O (60:40, v/v) with 1% ammonium formate, while mobile phase B was composed of Isopropanol:Acetonitrile (90:10, v/v) with 1% of ammonium formate. Additionally, an Acquity UPLC CSH C18 column (2.1 × 100 mm, 1.7 µm, Waters, Manchester, UK) focusing on non-polar compounds was used.

The flow rate was 0.4 mL min⁻¹. The column was initially eluted with 40% B, increasing to 43% B over 2 min and subsequently to 50% within 0.1 min. Over the next 9.9 min, the gradient was further ramped to 54% B, and then to 70% of B in 0.1 min. Over the next 5.9 min, the gradient was further ramped to 99% B, and then to 40% of B in 0.1 min. The %B was kept for 1.9 min to stabilize the chromatographic column. The total run time was 20 min.

Positive (+) and negative (−) ion modes were recorded (separately) and the instrument was operated in MS^E mode in the *m/z* range of 50–1700 *m/z*, with an acquisition time of 0.5 s/scan. The injection volume was 3 µL (+) and 5 µL (−). The source temperature was set to 140 °C (+ and −) and the desolvation temperature to 550 °C (+ and −). The desolvation gas flow was 900 L/h⁻¹ (+ and −) in a capillary tension of 3.0 kV (+) and 2 kV (−), with a cone voltage of 40 kV (+ and −). The MS^E analysis was operated at 6 V for low collision energy and a ramp of 20–50 V for high collision energy. Sample injection order was random, and QC samples were added intra-batch after each array of ten samples and were also included inter-batch (before and after each batch of analysis).

Leucine enkephalin (molecular weight of 555.62; 200 µg mL⁻¹ in an Acetonitrile:H₂O (1:1 v/v) solution) was used as a lock-mass for accurate mass measurement.

4.4. Data Analysis

Spectrometric signal processing and feature annotation were performed using the ProgenesisTM QI software v2.4.69.11 (Nonlinear Dynamics—Newcastle, UK). These processes were carried out at an in-house station configured with an Intel[®] Core[™] i9-9900K CPU processor (Santa Clara, CA, USA) running at 3.60 GHz under a Windows 10 Enterprise Operational System, equipped with 64 GB of RAM and NVIDIA Quadro[®] (Santa Clara, CA, USA).

The relative abundance data of the detected ions were processed prior to statistical analysis. A signal correction was performed using a method based on the consistency of QC samples (Random Forest QC Signal Correction—RF-QCSC) implemented in the *statTarget* package v.3.17 [30]. Then, features with low abundance variation were removed using the interquartile range (IQR). Finally, abundances were normalized using square root transformation and Pareto scaling. Filtering, normalization and statistical analysis were performed using the *MetaboAnalystR* package v.3.3 [31] and *limma* package v.3.17 [32] implemented in the R programming language v.4.3 using Rstudio IDE v.2023.06.0+421 [33].

Lipid annotation was assigned according to Annotation Confidence Level [34] level 2 of metabolite identification (exact mass, isotopic pattern, retention time, and MS/MS spectrum matched to an in-house spectral database or literature spectra). The study adopted the lipid nomenclature and classification suggested by the LipidMaps consortium [35].

4.5. Statistical Analysis

Differences between sample groups were evaluated using the limma model [32], a linear model initially developed for microarray data that enables flexible modeling and increased statistical inference using techniques such as empirical Bayes. A list of relevant features was obtained using a p -value of <0.05 and a fold-change between abundances (FC) of >2 as selection criteria. Additionally, an adjusted p -value of <0.05 was considered to increase the confidence level of the discussion for some of the results.

5. Conclusions

These findings indicated that lipidome derived from tissue could potentially be helpful in identifying patients with LARC who would not respond to nCRT and could help to understand physiological differences between responders and Non-responders to nCRT. Our results suggest that some lipid classes are involved in the resistance to nCRT (like the simple glycosphingolipids) and are in agreement with previous studies about CRT response in cancer therapy. Finally, it was evident that subclasses of lipids maintain an abundance rate between groups at different moments of nCRT, denoted in the oxidation and the type of residues of glycerophospholipids. More studies are needed to validate the identification and function of the lipids mentioned in our results.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms241411479/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, P.d.O.C. and S.S.-V.; methodology, S.S.-V., P.H.G.S., A.A.R.S. and C.F.A.G.; software, S.S.-V.; validation, S.S.-V., G.H.B.D. and M.C.F.M.; formal analysis, S.S.-V., C.A.R.M. and A.M.P.; investigation, S.S.-V. and C.F.A.G.; resources, P.d.O.C., A.M.P. and C.A.R.M.; data curation, S.S.-V.; writing—original draft preparation, S.S.-V., G.H.B.D., A.A.R.S. and P.H.G.S.; writing—review and editing, P.d.O.C. and A.M.P.; supervision, P.d.O.C.; project administration, P.d.O.C.; funding acquisition, P.d.O.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by São Paulo Research Foundation: 2018/13317-6; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior: grant number 88887.504805/2020-00.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics and Research Committee (CEP) of Universidade São Francisco (CAAE: 14958819.8.0000.5514).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in supplementary material Tables S1 and S2.

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

References

- Dekker, E.; Tanis, P.J.; Vleugels, J.L.A.; Kasi, P.M.; Wallace, M.B. Colorectal Cancer. *Lancet* **2019**, *394*, 1467–1480. [CrossRef]
- Peltrini, R.; Luglio, G.; Cassese, G.; Amendola, A.; Caruso, E.; Sacco, M.; Pagano, G.; Sollazzo, V.; Tufano, A.; Giglio, M.C.; et al. Oncological Outcomes and Quality of Life After Rectal Cancer Surgery. *Open Med.* **2019**, *14*, 653–662. [CrossRef]
- Dodaro, C.A.; Calogero, A.; Tammaro, V.; Pellegrino, T.; Lionetti, R.; Campanile, S.; Menkulazi, M.; Ciccozzi, M.; Iannicelli, A.M.; Giallauria, F.; et al. Colorectal Cancer in the Elderly Patient: The Role of Neo-Adjuvant Therapy. *Open Med.* **2019**, *14*, 607. [CrossRef]
- Al-Sukhni, E.; Attwood, K.; Gabriel, E.; Nurkin, S.J. Predictors of Circumferential Resection Margin Involvement in Surgically Resected Rectal Cancer: A Retrospective Review of 23,464 Patients in the US National Cancer Database. *Int. J. Surg.* **2016**, *28*, 112–117. [CrossRef]
- Bahcall, O. Precision Medicine. *Nature* **2015**, *526*, 335. [CrossRef] [PubMed]
- Ciocan-Cartita, C.A.; Jurj, A.; Buse, M.; Gulei, D.; Braicu, C.; Raduly, L.; Cojocneanu, R.; Pruteanu, L.L.; Iuga, C.A.; Coza, O.; et al. The Relevance of Mass Spectrometry Analysis for Personalized Medicine through Its Successful Application in Cancer “Omics”. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2576. [CrossRef] [PubMed]
- Ogunwobi, O.O.; Mahmood, F.; Akingboye, A. Biomarkers in Colorectal Cancer: Current Research and Future Prospects. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5311. [CrossRef] [PubMed]

8. Zhu, J.; Zeng, W.; Ge, L.; Yang, X.; Wang, Q.; Wang, H. Capecitabine versus 5-Fluorouracil in Neoadjuvant Chemoradiotherapy of Locally Advanced Rectal Cancer: A Meta-Analysis. *Medicine* **2019**, *98*, e15241. [CrossRef]
9. Liemburg, G.B.; Brandenburg, D.; Berger, M.Y.; Duijts, S.F.A.; Holtman, G.A.; de Bock, G.H.; Korevaar, J.C.; Berendsen, A.J. Diagnostic Accuracy of Follow-up Tests for Detecting Colorectal Cancer Recurrences in Primary Care: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur. J. Cancer Care* **2021**, *30*, e13432. [CrossRef]
10. Molenaar, M.R.; Jeucken, A.; Wassenaar, T.A.; Van De Lest, C.H.A.; Brouwers, J.F.; Helms, J.B. LION/Web: A Web-Based Ontology Enrichment Tool for Lipidomic Data Analysis. *GigaScience* **2019**, *8*, giz061. [CrossRef]
11. Messias, M.C.F.; Mecatti, G.C.; Priolli, D.G.; De Oliveira Carvalho, P. Plasmalogen Lipids: Functional Mechanism and Their Involvement in Gastrointestinal Cancer. *Lipids Health Dis.* **2018**, *17*, 41. [CrossRef]
12. Fernandes, A.M.A.P.; Messias, M.C.F.; Duarte, G.H.B.; de Santis, G.K.D.; Mecatti, G.C.; Porcari, A.M.; Murgu, M.; Simionato, A.V.C.; Rocha, T.; Martinez, C.A.R.; et al. Plasma Lipid Profile Reveals Plasmalogens as Potential Biomarkers for Colon Cancer Screening. *Metabolites* **2020**, *10*, 262. [CrossRef]
13. Dean, J.M.; Lodhi, I.J. Structural and Functional Roles of Ether Lipids. *Protein Cell* **2018**, *9*, 196–206. [CrossRef] [PubMed]
14. Zhu, Y.; Liu, X.-J.; Yang, P.; Zhao, M.; Lv, L.-X.; Zhang, G.-D.; Wang, Q.; Zhang, L. Alkylglyceronephosphate Synthase (AGPS) Alters Lipid Signaling Pathways and Supports Chemotherapy Resistance of Glioma and Hepatic Carcinoma Cell Lines. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 3219–3226. [CrossRef] [PubMed]
15. Park, K.S.; Lee, H.Y.; Lee, S.Y.; Kim, M.-K.; Kim, S.D.; Kim, J.M.; Yun, J.; Im, D.-S.; Bae, Y.-S. Lysophosphatidylethanolamine Stimulates Chemotactic Migration and Cellular Invasion in SK-OV3 Human Ovarian Cancer Cells: Involvement of Pertussis Toxin-Sensitive G-Protein Coupled Receptor. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 4411–4416. [CrossRef] [PubMed]
16. Tan, S.T.; Ramesh, T.; Toh, X.R.; Nguyen, L.N. Emerging Roles of Lysophospholipids in Health and Disease. *Prog. Lipid Res.* **2020**, *80*, 101068. [CrossRef]
17. Zhao, Z.; Xiao, Y.; Elson, P.; Tan, H.; Plummer, S.J.; Berk, M.; Aung, P.P.; Lavery, I.C.; Achkar, J.P.; Li, L.; et al. Plasma Lysophosphatidylcholine Levels: Potential Biomarkers for Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 2696–2701. [CrossRef]
18. Graziade, S.; Terrisse, A.-D.; Lerouge, S.; Laurent, G.; Jaffrézou, J.-P. Cytoprotective Effect of Glucosylceramide Synthase Inhibition against Daunorubicin-Induced Apoptosis in Human Leukemic Cell Lines. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 18256–18261. [CrossRef]
19. Aerts, J.M.F.G.; Artola, M.; van Eijk, M.; Ferraz, M.J.; Boot, R.G. Glycosphingolipids and Infection. Potential New Therapeutic Avenues. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 324. [CrossRef]
20. Tyler, A.; Johansson, A.; Karlsson, T.; Gudey, S.K.; Brännström, T.; Grankvist, K.; Behnam-Motlagh, P. Targeting Glucosylceramide Synthase Induction of Cell Surface Globotriaosylceramide (Gb3) in Acquired Cisplatin-Resistance of Lung Cancer and Malignant Pleural Mesothelioma Cells. *Exp. Cell Res.* **2015**, *336*, 23–32. [CrossRef]
21. Huang, H.; Tong, T.-T.; Yau, L.-F.; Chen, C.-Y.; Mi, J.-N.; Wang, J.-R.; Jiang, Z.-H. LC-MS Based Sphingolipidomic Study on A549 Human Lung Adenocarcinoma Cell Line and Its Taxol-Resistant Strain. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 799. [CrossRef]
22. Molendijk, J.; Robinson, H.; Djuric, Z.; Hill, M.M. Lipid Mechanisms in Hallmarks of Cancer. *Mol. Omics* **2020**, *16*, 6–18. [CrossRef]
23. Eitsuka, T.; Nakagawa, K.; Kato, S.; Ito, J.; Otoki, Y.; Takasu, S.; Shimizu, N.; Takahashi, T.; Miyazawa, T. Modulation of Telomerase Activity in Cancer Cells by Dietary Compounds: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 478. [CrossRef]
24. McIntyre, T.M.; Zimmerman, G.A.; Prescott, S.M. Biologically Active Oxidized Phospholipids. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 25189–25192. [CrossRef]
25. Seok, J.K.; Hong, E.-H.; Yang, G.; Lee, H.E.; Kim, S.-E.; Liu, K.-H.; Kang, H.C.; Cho, Y.-Y.; Lee, H.S.; Lee, J.Y. Oxidized Phospholipids in Tumor Microenvironment Stimulate Tumor Metastasis via Regulation of Autophagy. *Cells* **2021**, *10*, 558. [CrossRef]
26. Matura, T.; Togawa, A.; Kai, M.; Nishida, T.; Nakada, J.; Ishibe, Y.; Kojo, S.; Yamamoto, Y.; Yamada, K. The Presence of Oxidized Phosphatidylserine on Fas-Mediated Apoptotic Cell Surface. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1736*, 181–188. [CrossRef] [PubMed]
27. Rächieru, C.; Eniu, D.T.; Moiş, E.; Graur, F.; Socaciu, C.; Socaciu, M.A.; Hajjar, N.A. Lipidomic Signatures for Colorectal Cancer Diagnosis and Progression Using UPLC-QTOF-ESI+MS. *Biomolecules* **2021**, *11*, 417. [CrossRef] [PubMed]
28. Ecker, J.; Benedetti, E.; Kindt, A.S.D.; Höring, M.; Perl, M.; Machmüller, A.C.; Sichler, A.; Plagge, J.; Wang, Y.; Zeissig, S.; et al. The Colorectal Cancer Lipidome: Identification of a Robust Tumor-Specific Lipid Species Signature. *Gastroenterology* **2021**, *161*, 910–923.e19. [CrossRef]
29. Habr-Gama, A.; De Souza, P.M.S.B.; Ribeiro, U.; Nadalin, W.; Gansl, R.; e Sousa, A.H.S.; Campos, F.G.; Gama-Rodrigues, J. Low Rectal Cancer Impact of Radiation and Chemotherapy on Surgical Treatment. *Dis. Colon Rectum* **1998**, *41*, 1087–1096. [CrossRef]
30. Luan, H.; Ji, F.; Chen, Y.; Cai, Z. StatTarget: A Streamlined Tool for Signal Drift Correction and Interpretations of Quantitative Mass Spectrometry-Based Omics Data. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1036*, 66–72. [CrossRef] [PubMed]
31. Pang, Z.; Chong, J.; Li, S.; Xia, J. MetaboAnalystR 3.0: Toward an Optimized Workflow for Global Metabolomics. *Metabolites* **2020**, *10*, 186. [CrossRef] [PubMed]
32. Ritchie, M.E.; Phipson, B.; Wu, D.; Hu, Y.; Law, C.W.; Shi, W.; Smyth, G.K. Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-Sequencing and Microarray Studies. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, e47. [CrossRef] [PubMed]
33. RStudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R. 2020. Available online: <https://posit.co/download/rstudio-desktop/> (accessed on 15 January 2023).

34. Sumner, L.W.; Amberg, A.; Barrett, D.; Beale, M.H.; Beger, R.; Daykin, C.A.; Fan, T.W.M.; Fiehn, O.; Goodacre, R.; Griffin, J.L.; et al. Proposed Minimum Reporting Standards for Chemical Analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* **2007**, *3*, 211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Liebisch, G.; Fahy, E.; Aoki, J.; Dennis, E.A.; Durand, T.; Ejsing, C.S.; Fedorova, M.; Feussner, I.; Griffiths, W.J.; Köfeler, H.; et al. Update on LIPID MAPS Classification, Nomenclature, and Shorthand Notation for MS-Derived Lipid Structures. *J. Lipid Res.* **2020**, *61*, 1539–1555. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

5. CONCLUSÃO

As descobertas indicam que o perfil lipidômico identificado em tecidos tumorais, analisados após a QRT neoadjuvante e que não apresentaram regressão tumoral difere do perfil identificado nos pacientes que responderam em algum grau ao tratamento. Estas diferenças podem ser usadas para compreender as alterações metabólicas entre respondedores e não-respondedores. Estes dados sugerem que algumas classes de lipídios estão envolvidas na resistência a QRT neoadjuvante (em especial fosfolipídios oxidados), corroborando com as pesquisas anteriores relacionadas a resposta à QRT no câncer retal, assim como a outros tipos de câncer.

A contribuição da lipidômica no entendimento da resposta a QRT neoadjuvante poderá auxiliar, junto com outros métodos diagnósticos já usados, como a ressonância magnética, na avaliação prévia dos pacientes que não respondem ao tratamento.

Foi possível identificar perfis lipidômicos que poderiam facilitar a classificação precoce entre pacientes que terão alguma ou nenhuma resposta ao tratamento neoadjuvante. As alterações achadas após a terapia ajudam no entendimento da resposta à neoadjuvância e, com a devida validação, poderiam sugerir alvos terapêuticos.

Serão necessários estudos mais aprofundados envolvendo validações bioquímicas dos lipídeos sugeridos, ampliação do número amostral para testar a capacidade classificadora ou preditora destes lipídeos e ainda a avaliação de diferentes características clínicas capazes de influenciar o perfil lipidômico.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, V. A. DE et al. NEOADJUVANT THERAPY AND SURGERY FOR RECTAL CANCER. Comparative study between partial and complete pathological response. **Arquivos De Gastroenterologia**, v. 53, n. 3, p. 163–168, 2016.
- ANWARDEEN, N. R. et al. Statistical methods and resources for biomarker discovery using metabolomics. **BMC Bioinformatics**, v. 24, n. 1, p. 250, 15 jun. 2023.
- BARTKE, N.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. **Journal of Lipid Research**, v. 50 Suppl, n. Suppl, p. S91-96, abr. 2009.
- BOCCIO, P. D. et al. Serum lipidomic study reveals potential early biomarkers for predicting response to chemoradiation therapy in advanced rectal cancer: A pilot study. **Advances in Radiation Oncology**, v. 2, n. 2, p. 118–124, 1 abr. 2017.
- BRIERLEY, J. D.; GOSPODAROWICZ, M. K.; WITTEKIND, C. **TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition**. 8. ed. [s.l.] Wiley, 2016.
- CHAN, E. C. Y. et al. Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 1, p. 352–361, jan. 2009.
- COTTE, A. K. et al. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2-mediated lipid droplet production supports colorectal cancer chemoresistance. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 322, 22 jan. 2018.
- DAS, S.; MARTINEZ, L. R.; RAY, S. Phospholipid remodeling and eicosanoid signaling in colon cancer cells. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 51, n. 6, p. 512–519, dez. 2014.
- DEL GOBBO, A.; FERRERO, S. Immunohistochemical Markers as Predictors of Histopathologic Response and Prognosis in Rectal Cancer Treated with Preoperative Adjuvant Therapy: State of the Art. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2017, p. 2808235, 2017.
- DUKES, C. E.; BUSSEY, H. J. The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. **British Journal of Cancer**, v. 12, n. 3, p. 309–320, set. 1958.
- DUNN, W. B. et al. The importance of experimental design and QC samples in large-scale and MS-driven untargeted metabolomic studies of humans. **Bioanalysis**, v. 4, n. 18, p. 2249–2264, set. 2012.
- ECKER, J. et al. The Colorectal Cancer Lipidome: Identification of a Robust Tumor-Specific Lipid Species Signature. **Gastroenterology**, v. 161, n. 3, p. 910- 923.e19, set. 2021.
- FAHY, E. et al. A comprehensive classification system for lipids1. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 5, p. 839–861, 1 maio 2005.
- FEENEY, G. et al. Neoadjuvant radiotherapy for rectal cancer management. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 33, p. 4850–4869, 7 set. 2019.
- FERNANDES MESSIAS, M. C. et al. Plasma Lipidomic Signature of Rectal Adenocarcinoma Reveals Potential Biomarkers. **Frontiers in Oncology**, v. 7, p. 8, 8 jan. 2018.
- FERNANDEZ, L. M. et al. Conditional recurrence-free survival of clinical complete responders managed by watch and wait after neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer in the International Watch & Wait Database: a retrospective, international, multicentre registry study. **The Lancet. Oncology**, v. 22, n. 1, p. 43–50, jan. 2021.
- GHADIMI, B. M. et al. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of**

- the **American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 9, p. 1826–1838, 20 mar. 2005.
- GLYNNE-JONES, R. et al. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 28, n. Supplement 4, p. iv22–iv40, jul. 2017.
- GONG, J. et al. Reprogramming of lipid metabolism in cancer-associated fibroblasts potentiates migration of colorectal cancer cells. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 4, p. 267, 23 abr. 2020.
- GONZÁLEZ-RIANO, C. et al. Recent Developments along the Analytical Process for Metabolomics Workflows. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 1, p. 203–226, 7 jan. 2020.
- GORDON, P. H. Malignant Neoplasms of the Rectum. Em: **Principles and Practice of Surgery for the Colon, Rectum, and Anus**. 3. ed. [s.l.] CRC Press, 2007.
- HABR-GAMA, A. et al. Low rectal cancer: impact of radiation and chemotherapy on surgical treatment. **Diseases of the Colon and Rectum**, v. 41, n. 9, p. 1087–1096, set. 1998.
- HABR-GAMA, A. et al. Operative versus nonoperative treatment for stage 0 distal rectal cancer following chemoradiation therapy: long-term results. **Annals of Surgery**, v. 240, n. 4, p. 711–717; discussion 717–718, out. 2004.
- HABR-GAMA, A. Assessment and management of the complete clinical response of rectal cancer to chemoradiotherapy. **Colorectal Disease: The Official Journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland**, v. 8 Suppl 3, p. 21–24, set. 2006.
- HAN, X.; GROSS, R. W. The foundations and development of lipidomics. **Journal of Lipid Research**, v. 63, n. 2, p. 100164, fev. 2022.
- INCA. **Estatísticas de câncer**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estatisticas-de-cancer>>. Acesso em: 31 jul. 2023.
- IVANOVA, P. T. et al. Lipidomics: a mass spectrometry based, systems level analysis of cellular lipids. **Current opinion in chemical biology**, v. 13, n. 5–6, p. 526–531, dez. 2009.
- JANG, J. Y. et al. The efficacy of capecitabine as a salvage treatment in metastatic colorectal cancer after prior 5-fluorouracil-included chemotherapies. **Journal of Clinical Oncology**, v. 41, n. 4_suppl, p. 54–54, fev. 2023.
- KELLER, D. S. et al. The multidisciplinary management of rectal cancer. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 7, p. 414–429, jul. 2020.
- KIM, I.-J. et al. Microarray gene expression profiling for predicting complete response to preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced rectal cancer. **Diseases of the Colon and Rectum**, v. 50, n. 9, p. 1342–1353, set. 2007.
- KIM, S. H. et al. What Is the Ideal Tumor Regression Grading System in Rectal Cancer Patients after Preoperative Chemoradiotherapy? **Cancer Research and Treatment**, v. 48, n. 3, p. 998–1009, 15 jul. 2016.
- KITAMURA, C. et al. The component changes of lysophospholipid mediators in colorectal cancer. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 41, n. 5, p. 1010428319848616, maio 2019.
- KONCINA, E. et al. Prognostic and Predictive Molecular Biomarkers for Colorectal Cancer: Updates and Challenges. **Cancers**, v. 12, n. 2, p. 319, 30 jan. 2020.
- KONG, J. C. et al. Prognostic value of tumour regression grade in locally advanced rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **Colorectal Disease**, v. 20, n. 7, p. 574–585, 2018.
- LI, F. et al. Lipid profiling for early diagnosis and progression of colorectal cancer using direct-infusion electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry: RCM**, v. 27, n. 1, p. 24–34, 15 jan. 2013.

- LI, L. et al. Mass Spectrometry Methodology in Lipid Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 6, p. 10492–10507, 11 jun. 2014.
- LI, Y. et al. A review of neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 8, p. 1022–1031, 2016.
- LIEBISCH, G. et al. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. **Journal of Lipid Research**, v. 61, n. 12, p. 1539–1555, 1 dez. 2020.
- LUAN, H. et al. statTarget: A streamlined tool for signal drift correction and interpretations of quantitative mass spectrometry-based omics data. **Analytica Chimica Acta**, v. 1036, p. 66–72, 7 dez. 2018.
- MENDONÇA, P. DA S.; CARIOCA, A. A. F.; MAIA, F. M. M. Interações entre Estresse Oxidativo, Terapia Utilizada e Estadiamento em Pacientes com Câncer Colorretal. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 60, n. 2, p. 129–134, 30 jun. 2014.
- MESSIAS, M. C. F. et al. Plasmalogen lipids: functional mechanism and their involvement in gastrointestinal cancer. **Lipids in health and disease**, v. 17, n. 1, 7 mar. 2018.
- MURO, E.; ATILLA-GOKCUMEN, G. E.; EGGERT, U. S. Lipids in cell biology: how can we understand them better? **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 12, p. 1819–1823, 15 jun. 2014.
- NEAGU, M. et al. Inflammation and Metabolism in Cancer Cell—Mitochondria Key Player. **Frontiers in Oncology**, v. 9, 2019.
- NGUYEN, A. et al. Using lipidomics analysis to determine signalling and metabolic changes in cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 43, p. 96–103, fev. 2017.
- OKUNO, M. et al. Abnormalities in fatty acids in plasma, erythrocytes and adipose tissue in Japanese patients with colorectal cancer. **In Vivo (Athens, Greece)**, v. 27, n. 2, p. 203–210, 2013.
- PARK, J. B. et al. Phospholipase signalling networks in cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 12, n. 11, p. 782–792, nov. 2012.
- PASZT, A. et al. Clinical benefits of oral capecitabine over intravenous 5-fluorouracyl regimen in case of neoadjuvant chemoradiotherapy followed by surgery for locally advanced rectal cancer. **Pathology and Oncology Research**, v. 28, p. 1610722, 2022.
- PITT, J. J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 30, n. 1, p. 19–34, fev. 2009.
- QIU, Y. et al. Serum metabolite profiling of human colorectal cancer using GC-TOFMS and UPLC-QTOFMS. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 10, p. 4844–4850, out. 2009.
- R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, , 2022. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>
- REDALEN, K. R. et al. High tumor glycine concentration is an adverse prognostic factor in locally advanced rectal cancer. **Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology**, v. 118, n. 2, p. 393–398, fev. 2016.
- RITCHIE, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 7, p. e47–e47, 20 abr. 2015.
- RÖHRIG, F.; SCHULZE, A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 11, p. 732–749, nov. 2016.
- ROSEN, R. D.; SAPRA, A. TNM Classification. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
- RSTUDIO TEAM. **RStudio: Integrated Development Environment for R**. Boston, MARStudio, PBC., , 2020. Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>

- SAUER, R. et al. Preoperative versus Postoperative Chemoradiotherapy for Rectal Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 17, p. 1731–1740, 21 out. 2004.
- SAWICKI, T. et al. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 2025, jan. 2021.
- SCOTT, K. F. et al. Emerging roles for phospholipase A2 enzymes in cancer. **Biochimie**, v. 92, n. 6, p. 601–610, jun. 2010.
- SIDDIQUI, M. R. S. et al. Defining response to radiotherapy in rectal cancer using magnetic resonance imaging and histopathological scales. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 37, p. 8414–8434, 7 out. 2016.
- STRYBEL, U. et al. Molecular Composition of Serum Exosomes Could Discriminate Rectal Cancer Patients with Different Responses to Neoadjuvant Radiotherapy. **Cancers**, v. 14, n. 4, 1 fev. 2022.
- SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.
- TAYLOR, F. G. M. et al. Preoperative high-resolution magnetic resonance imaging can identify good prognosis stage I, II, and III rectal cancer best managed by surgery alone: a prospective, multicenter, European study. **Annals of Surgery**, v. 253, n. 4, p. 711–719, abr. 2011.
- VODENKOVA, S. et al. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 206, p. 107447, fev. 2020.
- VORKAS, P. A. Expanding lipidome coverage using MS/MS-aided untargeted data-independent RP–UPLC–TOF–MSE acquisition. **Bioanalysis**, v. 10, n. 5, p. 307–319, mar. 2018.
- WALKO, C. M.; LINDLEY, C. Capecitabine: a review. **Clinical Therapeutics**, v. 27, n. 1, p. 23–44, jan. 2005.
- WATANABE, T. et al. Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles. **Cancer Research**, v. 66, n. 7, p. 3370–3374, 1 abr. 2006.
- WU, Z. et al. “Lipidomics”: Mass spectrometric and chemometric analyses of lipids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Lipids in disease pathology, diagnosis & therapy. v. 159, p. 294–307, 1 jan. 2020.
- YANG, C. et al. Plasma lipid-based machine learning models provides a potential diagnostic tool for colorectal cancer patients. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 536, p. 191–199, 1 nov. 2022.
- YANG, K. et al. Expression profile of polyunsaturated fatty acids in colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 21, n. 8, p. 2405–2412, 28 fev. 2015.
- ZAIDI, N. et al. Lipogenesis and lipolysis: The pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 4, p. 585–589, 1 out. 2013.
- ZHOU, J. et al. Serial Circulating Tumor DNA in Predicting and Monitoring the Effect of Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Patients with Rectal Cancer: A Prospective Multicenter Study. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 27, n. 1, p. 301–310, 1 jan. 2021.