

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

ÁLEX APARECIDO ROSINI SILVA

**COMPARAÇÃO DE ASSINATURAS LIPÍDICAS EM PLASMA
E TECIDO DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA
INVESTIGADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Bragança Paulista

2020

ÁLEX APARECIDO ROSINI SILVA – R.A. 001201810971

**COMPARAÇÃO DE ASSINATURAS LIPÍDICAS EM PLASMA
E TECIDO DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA
INVESTIGADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

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

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof.(a) Dr.(a) Andréia de Melo Porcari.

Bragança Paulista

2020

WP 870
S578c

Silva, Álex Aparecido Rosini

Comparação de assinaturas lipídicas em plasma e tecido de pacientes com câncer de mama investigadas por espectrometria de massas / Álex Aparecido Rosini Silva. -- Bragança Paulista, 2020.

60 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Andréia de Melo Porcari.

1. Neoplasias da mama. 2. Imageamento. 3. Plasma. 4. Espectrometria de massas. 5. Metabolômica. I. Porcari, Andréia de Melo. II. Título.



SILVA, Álex Aparecido Rosini. “Comparação de Assinaturas Lipídicas em Plasma e Tecido de Pacientes com Câncer de Mama Investigadas por Espectrometria de Massas” Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 27 de julho de 2020 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Andréia de Melo Porcari - Orientadora e Presidente
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Alessandra Sussulini
Universidade Estadual de Campinas

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

Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho
Universidade São Francisco

Câmpus Bragança Paulista
Câmpus Campinas – Swift
Câmpus Campinas – Unidade Cambuí
Câmpus Itatiba

Av. São Francisco de Assis, 218 – Cidade Universitária – CEP 12916-900 – (11) 2454-8000
R. Waldemar César da Silveira, 105 – Jd. Cura D’Ars – CEP 13045-510 – (19) 3779-3300
R. Cel. Silva Teles, 700, prédio C – Cambuí – CEP 13024-001 – (19) 3344-6900
Av. Sen. Lacerda Franco, 360 – Centro – CEP 13250-400 – (11) 4534-8000

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por nos dar o milagre da vida, poder me proporcionar esta experiência e ter me conduzido até aqui, além de promover a entrada na minha vida de pessoas muito especiais.

Agradeço aos meus pais, Elsa e João que, apesar da distância, sempre me apoiaram todos os dias, em todas as loucuras e por estarem sempre me esperando. Sem eles não seria o que estou me tornando hoje. Ao meu irmão, João Eduardo, por todos os momentos de alegria. A minha namorada Stephanie, por ser o meu apoio, inspiração e minha companhia.

A professora Andréia de Melo Porcari, pela orientação, ensinamentos, conversas e amizade. E por me tornar uma pessoa melhor do que eu era, além de servir como inspiração pessoal e profissional.

Aos amigos e companheiros de trabalho, Pedro Henrique e Lamartine, pelas risadas, momentos de distração, debates e principalmente a amizade, que espero levar pelo resto da vida.

A Dra. Sophie Derchain e sua equipe pelo apoio na parte clínica, e a nova amizade.

E principalmente a todas as mulheres que doaram seu plasma e tecidos, bem como aos profissionais da área médica que lhes prestaram o atendimento e permitiram a coleta das amostras.

A todos os alunos do CAM e amigos da UNIFAG, pela amizade e companhia diária.

A Universidade São Francisco e aos professores do PPGCS por todo o ensinamento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e FAPESP (2019/04314-6).

EPÍGRAFE

*“O insucesso é apenas uma oportunidade para
recomeçar com mais inteligência”*

Henry Ford

RESUMO

Devido a elevada incidência e mortalidade, o câncer de mama é considerado um problema de saúde pública, tanto em países em desenvolvimento como desenvolvidos. O câncer de mama é uma doença heterogênea, classificada em diversos subtipos moleculares e histológicos que, devido à desregulação de vias celulares, conferem uma variabilidade de prognóstico e de respostas à quimioterapia. O câncer altera o metabolismo celular devido aos processos relacionados ao seu desenvolvimento, remodelação do tecido, processo metastático e estes garantem a sobrevivência celular. A detecção das alterações de metabólitos, com objetivo de diagnóstico ou prognóstico empregado em diversas matrizes biológicas. Este trabalho teve por objetivo comparar a abundância de metabólitos diagnósticos no câncer de mama em duas matrizes: plasma e tecido tumoral. Para determinar o perfil lipídico, foram utilizadas diferentes plataformas de espectrometria de massas (MS): (i) análise do plasma por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS, do inglês *Liquid chromatography-MS*) e (ii) análise do tecido tumoral por *desorption electrospray ionization – mass spectrometry imaging* (DESI-MSI). Foram investigadas amostras de 24 mulheres com diagnóstico de câncer de mama, que tiveram seu plasma e/ou fragmentos de biópsia por agulhamento e/ou espécime cirúrgico coletados, resultando em 20 amostras de plasma, 16 amostras de biópsia e 12 espécimes cirúrgicos, obtidos em parceria com o Hospital da Mulher (CAISM – Universidade de Campinas). Além disso, 22 mulheres saudáveis sem histórico familiar de câncer de mama conhecido foram voluntárias ao projeto, das quais também foi coletado plasma para compor um grupo controle. As amostras de tecido analisadas por DESI-MSI foram classificadas com base em um modelo preditivo estabelecido por nosso grupo. As 31 moléculas encontradas como diferenciais no modelo prévio foram avaliadas entre os lipídios detectados no plasma, sendo que apenas 17 delas puderam ser detectadas no plasma por LC-MS. Embora tenham sido comuns entre as duas matrizes, tais moléculas não apresentaram poder classificatório ou preditivo para avaliação do plasma. A comparação das diferentes matrizes revelou, portanto, que cada uma delas parece possuir a sua assinatura molecular específica em relação a presença de neoplasias, embora haja moléculas semelhantes, o que implicaria na necessidade de um conjunto próprio de moléculas diferenciais para cada matriz. Possivelmente, três fatores estão associados com nossos achados: (i) a diluição no sangue periférico de biomarcadores específicos de tecidos, (ii) os diferentes métodos de extração e análise aplicados às amostras de plasma e tecido, e (iii) a heterogeneidade dos tumores, em relação ao grau e volume tumoral, para os participantes do estudo. O estudo possibilitou verificar que a técnica de DESI-MSI é capaz de classificar com êxito os carcinomas de tipo especial, em abordagem interlaboratorial e multicêntrica. Embora em escala piloto, esse trabalho reforça a viabilidade do uso de múltiplas técnicas de MS para diagnóstico de câncer de mama, utilizando diferentes matrizes como o tecido e o plasma.

Descritores: Espectrometria de Massas. Imageamento. Metabolômica. Neoplasias da Mama. Plasma.

ABSTRACT

Due to the high incidence and mortality, breast cancer is considered a public health problem, both in developing and developed countries. Breast cancer is a heterogeneous disease, classified into several molecular and histological subtypes that, due to the deregulation of cellular pathways, provide a variability in prognosis and responses to chemotherapy. Cancer alters cellular metabolism due to processes related to its development, tissue remodeling, metastatic process and these guarantee cell survival. The detection of alterations of metabolites, with the objective of diagnosis or prognosis used in several biological matrices. This study aimed to compare the abundance of diagnostic metabolites in breast cancer in two matrices: plasma and tumor tissue. To determine the lipid profile, different mass spectrometry (MS) platforms were used: (i) a plasma analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS, from Liquid chromatography-MS) and (ii) tumor tissue analysis by electrospray ionization desorption - mass spectrometry imaging (DESI-MSI). Were used samples of 24 women diagnosed with breast cancer, who had their plasma and / or biopsy fragments by needle and / or surgical specimen collected, resulting in 20 plasma samples, 16 biopsy samples and 12 surgical specimens, obtained in partnership with the Women's Hospital (CAISM - University of Campinas). In addition, 22 healthy women with no known family history of breast cancer volunteered for the project, from which plasma was also collected to form a control group. The tissue samples analyzed by DESI-MSI were classified based on a predictive model established by our group. The 31 molecules found as differentials in the previous model were evaluated among the lipids detected in the plasma, and only 17 of them could be detected in the plasma by LC-MS. Although they were common between the two matrices, these molecules did not had a classificatory or predictive power for plasma evaluation. The comparison of the different matrices revealed, therefore, that each of them seems to have its specific molecular signature in relation to the presence of neoplasms, although there are similar molecules, which would imply the need for a specific set of differential molecules for each matrix. Possibly, three factors are associated with our findings: (i) the dilution in peripheral blood of specific tissue biomarkers, (ii) the different extraction and analysis methods applied to the plasma and tissue samples, and (iii) the heterogeneity of the tumors, in relation to tumor grade and volume, for the study participants. The study made possible to verify that the DESI-MSI technique is capable of successfully classifying special type carcinomas, in an interlaboratory and multicentric approach. Although on a pilot scale, this work reinforces the viability of using multiple MS techniques for the diagnosis of breast cancer, using different matrices such as tissue and plasma.

Keywords: Mass Spectrometry. Imaging. Metabolomics. Breast neoplasms. Plasma.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

APCI - *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
APPI - *Atmospheric Pressure Photo-Ionization*
AUC - *Area Under the Curve*
CDI - Carcinoma ductal invasivo
CID - *Collision Induced Dissociation*
Da - Daltons
DESI-MSI - *Desorption Electrospray Ionization - Mass Spectrometry Imaging*
ESI - *Electrospray Ionization*
FT-ICR - *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*
HER2 - *Human Epidermal Growth Factor Receptor - Type 2*
HMDB - *Human Metabolome Database*
IC95% - Índice de Confiança 95%
KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
LASSO - *Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*
LC-MS - *Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*
m/z - razão massa/carga
mRNA - Messenger Ribonucleic Acid
MS - *Mass Spectrometry*
MS/MS - *Tandem Mass Spectrometry*
MSI - *Mass Spectrometry Imaging*
NST - *No Special Type*
PCA - *Principal Component Analysis*
PLS-DA - *Partial Least Squares-Discriminant Analysis*
RE - Receptor de Estrógeno
RH - Receptor Hormonal
ROC - *Receiver Operating Characteristics*
RP - Receptor de Progesterona
ST - *Special Type*
SVM - *Support Vector Machine*

TOF - *Time of Flight*

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

FIGURA 1. Relação entre as ciências “ômicas” no estudo de sistemas biológicos	15
FIGURA 2. Representação estrutural de um espectrômetro de massas	17
FIGURA 3. Representação da ionização por DESI-MS.....	19

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1. Perfil imunofenotípico para a classificação molecular por imunohistoquímica dos tumores de mama	14
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Câncer de mama – incidência e caracterização	13
1.2 Metabolômica	15
1.3 Espectrometria de Massas	16
1.3.1 Técnicas de Ionização Ambiente	18
1.3.2 Imageamento por DESI-MS	20
1.3.3 Comparações entre LC-MS e DESI-MS	21
1.3.4 Análise, tratamento de dados e atribuição dos íons	22
1.4. Hipótese	23
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivos Principais	25
2.2. Objetivos Secundários	25
3. CAPÍTULO 1	26
3.1 Artigo Publicado	26
4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	50
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama – incidência e caracterização

Câncer é a denominação de um grupo de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que podem invadir outros tecidos e órgãos (INCA, 2019).

O câncer surge a partir de uma célula que adquiriu variante genética patogênica sendo que, após o processo de mitose, suas células descendentes acumulam novas variantes patogênicas. Quando há um acúmulo de variantes patogênicas suficiente para tornar essa célula diferenciada do seu tecido de origem, com fisiologia e morfologia contrastante ao tecido que pertencera, esta caracteriza-se como uma célula cancerosa. Este é um processo lento, o que provavelmente explica a maior incidência de câncer em pessoas idosas. As células tumorais têm algumas características como sua proliferação acelerada, perda da capacidade de aderência, invasão a tecidos adjacentes e capacidade de disseminação pelo organismo, em um processo chamado metástase, que lhe permite se estabelecer em locais distantes de sua origem, nos quais produz tumores secundários (GRAHAM, SOTTORIVA, 2017; AGBARYA et al., 2014).

Dentro deste grupo de doenças, os tumores de mama são os mais incidentes entre as mulheres, sendo associado a maior mortalidade neste sexo. Estima-se que, somente no ano de 2018, aproximadamente de 2.088.849 novos casos foram diagnosticados e aproximadamente de 626.679 mulheres morreram devido a doença sendo que, aproximadamente 3% (18.442) da totalidade das mortes ocorreram no Brasil (GLOBOCAN, 2018). Por conta da elevada incidência e mortalidade, o câncer de mama é considerado um problema de saúde pública, tanto em países em desenvolvimento como desenvolvidos. Certas características como o estágio clínico tumoral ao diagnóstico, a qualidade no tratamento, presença de diversos subtipos moleculares e a resposta à terapia justificam as taxas de mortalidade apresentadas pelo câncer de mama (CARDOSO et al., 2018; BRAY et al., 2018). Outros fatores além do sexo e idade estão associados ao desenvolvimento do câncer de mama, como a exposição a estrógenos endógenos e exógenos, obesidade, histórico familiar, variantes genéticas patogênicas, exposição a radiações ionizantes e ser etilista (SUN et al., 2017).

O câncer de mama é uma doença heterogênea, classificada em diversos subtipos moleculares e histológicos que, devido à desregulação de diversas vias celulares, conferem uma variabilidade de prognóstico e resposta à quimioterapia (COATES et al., 2015; PEROU et al., 2000).

De acordo com a expressão do receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), proteína nuclear (Ki-67) e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2, do inglês *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*), o câncer de mama pode ser geneticamente classificados nos seguintes *clusters* hierárquicos: (i) Luminal A, (ii) Luminal B, (iii) Luminal B com HER2 hiperexpresso, (iv) Não Luminal com HER2 hiperexpresso e (v) Triplo Negativo, sendo que, esses subtipos estão associados às características tumorais (PEROU et al., 2000; SØRLIE et al., 2001). Um esquema mostrando a expressão desses marcadores moleculares entre os diferentes subtipos é apresentado na Tabela 1. Embora a classificação dos carcinomas de mama em subtipos moleculares tenha contribuído para a melhor estratificação das pacientes em diversos regimes terapêuticos, um grande número de mulheres com câncer de mama tem progressão ou recidiva do tumor, apesar da terapia sistêmica, de forma que a terapia não configura garantia de estabilidade ou recuperação do quadro clínico (GOBARDHAN et al., 2011).

TABELA 1. Perfil imunofenotípico para a classificação molecular por imunohistoquímica dos tumores de mama. Fonte: Tabela adaptada de Coates et al. (2015)

Subtipos moleculares	Padrão de imunomarcção
Luminal A	RE+ e RP+, HER2- e Ki-67 baixo
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 alto
Luminal B HER2+	RE+ e/ou RP+, HER2+
Não Luminal HER+	RE-, RP- e HER2+
Triplo Negativo	RE-, RP-, HER2-

HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; **RE:** receptor de estrogênio, positivo $\geq 1\%$; **RP:** receptor de progesterona, positivo $\geq 1\%$; **Ki-67:** proteína nuclear, alto $> 40\%$.

Dentre os tipos histológicos de carcinoma de mama, o carcinoma ductal invasivo (CDI), compreende aproximadamente de 75% a 85% dos casos, sendo esses, em sua maioria, classificados como tipos não especiais (NST, do inglês *no special type*). O CDI se origina de dutos e não apresenta características histológicas peculiares. Uma classe de carcinomas invasivos denominado de “tipos especiais” (ST, do inglês *special type*), com características histomorfológicas específicas, permite sua classificação em grupos, sendo os mais triviais os lobulares, metaplásicos, mucinosos, papilares e apócrinos (SINGLETARY et al., 2002; WOODWARD et al., 2003). Esses tumores são reconhecidos por sua morfologia utilizando microscopia com hematoxilina e eosina convencional, podendo ser adicionadas informações sobre marcadores moleculares específicos (HOON et al., 2020). Por exemplo, o carcinoma metaplásico é altamente agressivo, enquanto o carcinoma mucinoso tem um melhor prognóstico (SHEA, KOH, TAN, 2020).

Atualmente, os marcadores moleculares são utilizados para selecionar mulheres nas quais a terapia endócrina será eficaz (subtipos luminais), as que terão boa resposta à quimioterapia (subtipos não luminais), ou aquelas que se beneficiarão com terapia monoclonal com anti-HER2 (EROLES et al., 2012; HAMMOND et al., 2010; PRAT et al., 2015).

A presença do câncer altera o metabolismo devido aos processos envolvidos no desenvolvimento do tumor, remodelação do tecido, alterações para garantir a sobrevivência celular e a metástase. A adaptação biológica determina a evolução do câncer e atua na ação de determinado fármaco, sendo influenciada pela micro-organização tumoral (MISHRA, AMBS, 2015).

1.2 Metabolômica

No processo de compreensão do desenvolvimento tumoral, diversas áreas de estudo atuam para elucidar as alterações fisiológicas causadas pela presença de neoplasias, sendo as ciências denominadas “ômicas” uma ferramenta para este fim (SILVA et al., 2019). A cascata “ômica”, como é conhecida, engloba diversas áreas, como a genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, como observado na Figura 1, sendo que as características fenotípicas se aproximam mais do metaboloma, pois esses representam os produtos bioquímicos finais de toda a cascata (KLASSEN et al., 2017).

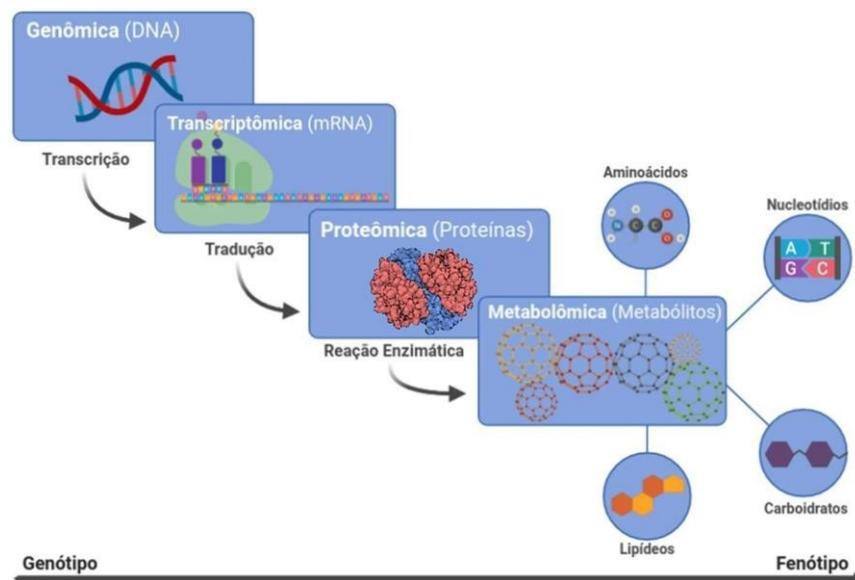


FIGURA 1. Relação entre as ciências “ômicas” no estudo de sistemas biológicos. Fonte: Figura adaptada de Klassen (2017, pág. 5)

As ciências “ômicas” acompanham toda a evolução tumoral e vêm sendo empregadas em diversas pesquisas sobre o câncer. A genômica, primeira etapa dessa cascata, é caracterizada pelo estudo das alterações genéticas e relacionada com a transcriptômica, focada nos transcritos gênicos como o conjunto de mRNA (BUJAK et al., 2015). Em seguida, a proteômica, ciência dedicada ao estudo do conjunto de proteínas (proteoma), buscando caracterizar, quantificar e identificar interações e modificações pós-traducionais (ASLAM et al., 2016). Por fim, surge a metabolômica, buscando caracterizar o conjunto de metabólitos envolvidos num dado processo biológico. A alteração de metabólitos ocasionada pela presença de células tumorais, resulta em uma assinatura característica, que pode caracterizar a presença e o comportamento do câncer. Assim, o perfil metabolômico pode ser alterado pelo estroma circundante e pela resposta imune, complementando a informação sobre o desenvolvimento do tumor e a resposta ao tratamento (RUTERING et al., 2016).

A metabolômica é o estudo do metabolismo em um nível global para um dado sistema biológico (SCALBERT et al., 2009; WANG et al., 2015), tendo como alvo metabólitos endógenos ou exógenos, compostos por moléculas pequenas, com massa molar de até 1500 Da (CLENDINEN, MONGE, FERNÁNDEZ, 2017). Ela é dividida em subgrupos como a lipidômica, análises de nucleotídeos, carboidratos e aminoácidos. A lipidômica é dedicada ao estudo do conteúdo lipídico de células, biofluidos e tecidos e, como os lipídios estão envolvidos na maioria dos processos fisiológicos, a lipidômica tem destaque na identificação de um número crescente de moléculas sugeridas como possíveis biomarcadores para câncer, inclusive de mama (HART et al., 2016).

O campo da metabolômica, de maneira geral, vem sendo explorado para caracterizar amostras, processos e respostas biológicas. A principal vantagem da metabolômica é conectar mudanças nos níveis e na natureza dos metabólitos à processos biológicos, uma vez que alterações metabólicas são decorrentes de estímulos externos, como doenças, uso de medicamentos, alimentação, entre outros. Um estudo metabolômico produz, dessa forma, *fingerprints* bioquímicos, de valor diagnóstico ou classificatório, auxiliando na descoberta e identificação de biomarcadores que estejam associados a um estado ou processo biológico (WEITZEL et al., 2011).

Por conter milhares a dezenas de milhares de moléculas, com diferentes funções químicas, um metaboloma é impossível de ser caracterizado por uma única plataforma analítica. As maiores limitações da metabolômica encontram-se nas faixas de concentração dos metabólitos, na

complexidade de dados gerados e na identificação e caracterização de tais moléculas. Assim, dada a inviabilidade de caracterizar e quantificar todos os metabólitos de um sistema, a identificação dos principais metabólitos afetados ou alterados pelo processo estudado torna-se a alternativa mais comumente empregada em estudos metabolômicos (GORROCHATEGUI et al., 2016). Um estudo metabolômico/lipidômico pode seguir dois tipos de abordagens: direcionada/alvo e não direcionada/global (CLENDINEN, MONGE, FERNÁNDEZ, 2017). Análises não direcionadas tem por objetivo a obtenção de um perfil abrangente de composição, visando a análise de todos os analitos detectáveis. (CLENDINEN, MONGE, FERNÁNDEZ, 2017; GORROCHATEGUI et al., 2016). Abordagens direcionadas, por outro lado, analisam um conjunto pré-definido de moléculas específicas, visando determinar, principalmente, alterações nas concentrações relativas das mesmas frente aos estímulos estudados nos grupos experimentais.

Entre as técnicas empregadas para a caracterização metabolômica temos a Espectrometria de Massas (MS, do inglês *mass spectrometry*), ferramenta analítica com alta sensibilidade, especificidade e que permite a elucidação estrutural das moléculas identificadas.

1.3 Espectrometria de Massas

A MS é uma técnica analítica que utiliza campos elétricos e/ou magnéticos para controlar as trajetórias de íons em fase gasosa e assim obter sua razão massa/carga (m/z). Um espectrômetro de massas é composto de quatro partes principais (Figura 2): um sistema de introdução de amostra, fonte de ionização, analisador de m/z e detector.

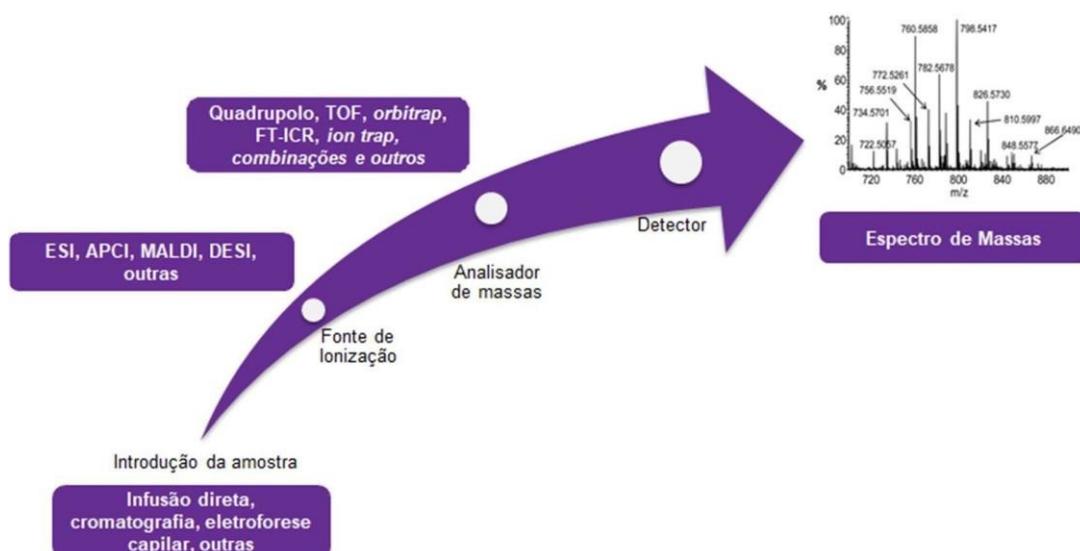


FIGURA 2. Representação estrutural de um espectrômetro de massas. Fonte: Figura adaptada de Porcari (2018, pág. 11).

A introdução das amostras pode ser realizada por diferentes métodos e processos como por infusão direta utilizando-se de alguma técnica de separação, entre as quais se destacam a cromatografia líquida, cromatografia gasosa e a eletroforese capilar.

A fonte de ionização converte moléculas neutras em íons. Algumas opções de fonte de ionização incluem a ionização por eletrospray (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*) (FENN et al., 1989), ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) (HORNING et al., 1973) e fotoionização à pressão atmosférica (APPI, do inglês *Atmospheric Pressure Photo-Ionization*) (ROBB et al., 2000), dentre outras.

A mais comumente usada em metabolômica é a fonte de ESI. ESI é um processo de ionização em aerossol, no qual cátions e ânions presentes em solução, são transferidos para a fase gasosa. Essa transferência se dá à pressão atmosférica, pela formação de um fluxo de gotículas altamente carregadas, resultantes da aplicação de uma diferença de potencial, e sua dessolvatação através do contato com um fluxo de gás inerte aquecido. Os íons são então atraídos para o analisador pela aplicação de potenciais elétricos (MURRAY et al., 2013).

A escolha dos analisadores de massas, varia de acordo com o propósito da pesquisa, pois impactam diretamente na resolução do equipamento, ou seja, na capacidade do instrumento em diferenciar dois valores de m/z próximos. Os analisadores de massas mais comuns são: quadrupolo (MARMET et al., 1971), *ion trap* (HELMUT, WOLFGANG, 1960), tempo de voo (TOF, do inglês, *Time of Flight*) (GOUDSMIT, 1948), Orbitrap (HU et al., 2005), e Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier FT-ICR (do inglês, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) (HIPPLE, SOMMER, THOMAS, 1949). Em segmentos específicos do analisador, chamados de câmara de colisão, pode ocorrer também a dissociação induzida por colisão (CID - do inglês, *Collision Induced Dissociation*). Neste processo, um ou mais íons precursores são fragmentados através da colisão com um gás inerte. Após a fragmentação, os fragmentos resultantes podem ser analisados, auxiliando na identificação correta do íon. Analisadores híbridos, como são chamados, são a combinação de dois analisadores diferentes, como o quadrupolo-TOF, muito utilizado em metabolômica para identificação de compostos (CHERNUSHEVICH; LOBODA; THOMSON, 2001). Nessa configuração, a seleção de um íon precursor pode ser realizada pelo quadrupolo, para posterior fragmentação na câmara de colisão por CID, possibilitando a análise dos fragmentos em alta resolução com o TOF.

Por fim, os detectores mensuram os sinais elétricos obtidos nos analisadores, sendo esta

resposta transformada em informações que possam ser interpretadas pelo espectro de massas – gráfico que relaciona a intensidade relativa dos íons em função das razões m/z .

Devido à complexidade das amostras para análise metabolômica, várias combinações entre fontes de ionização e analisadores são possíveis, cada uma com suas características e propósitos, o que é visto como vantagem, já que uma única combinação nunca será capaz de realizar todos os tipos de análises.

A cromatografia líquida acoplada à MS (LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) é uma técnica hifenada muito utilizada na metabolômica, na qual a amostra, antes da análise no espectrômetro de massas, é submetida a uma etapa de pré-separação dos compostos. A separação se dá pela migração diferencial, através de uma fase estacionária, de moléculas com características diferentes, solubilizadas e carregadas por uma fase móvel. Embora a técnica de LC-MS exija certo preparo da amostra, essa técnica facilita a identificação e quantificação de metabólitos, por separá-los de analitos coexistentes, permitindo assim maior detectabilidade. (IVANISEVIC; WANT, 2019). A técnica de LC-MS é apropriada para análise de amostras e extratos líquidos.

1.3.1 Técnicas de Ionização Ambiente

Um conjunto específico de técnicas de MS, chamada de MS ambiente (GERMANO et al., 2009), consiste em técnicas que se baseiam na análise direta de amostras, com pouco ou nenhum preparo das mesmas, em ambiente aberto, livre de vácuo. A principal representante deste grupo é a técnica de DESI-MS (*Desorption Electrospray Ionization – Mass Spectrometry*) (BADU- TAWIAH et al., 2013) e seu mecanismo pode ser visualizado na Figura 3.

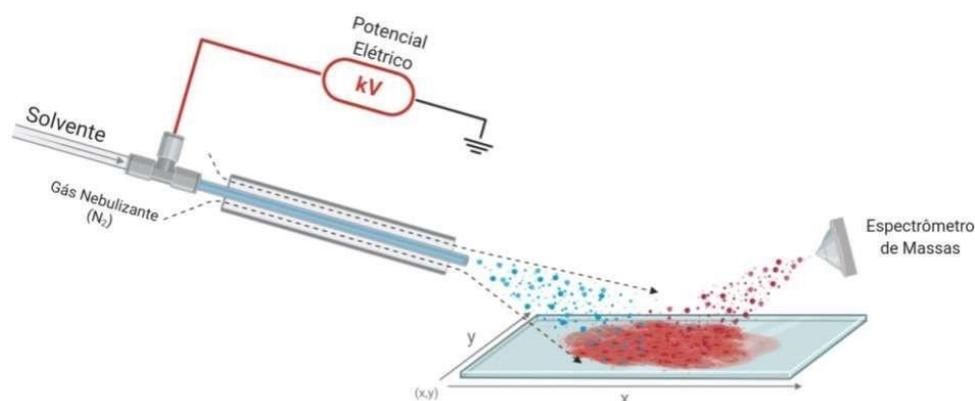


FIGURA 3. Representação da ionização por DESI-MS. Fonte: Figura adaptada de WU et al., (2013, pág. 42).

O seu mecanismo se baseia em um aerossol de solvente carregado com potencial elétrico que é direcionado à superfície da amostra intacta. Esse solvente carregado é capaz de dissolver as moléculas da superfície, bem como ionizá-las, permitindo sua detecção pelo espectrômetro de massas. DESI-MS vem sendo aplicado com sucesso em análises lipidômicas e metabolômicas. Tais análises são aplicadas em tecidos animais (DENKERT et al., 2015), colônias de bactérias (SCALBERT et al., 2009), tecidos vegetais (WANG et al., 2015), entre outros.

1.3.2 Imageamento por DESI-MS

Ao monitorar-se o perfil químico de uma superfície em conjunto com a informação espacial do mesmo (coordenadas x e y), é possível gerar imagens químicas das amostras analisadas, observando a diferente composição de íons nas diferentes regiões da amostra. Diversas técnicas de MS são capazes de gerar imagens químicas, no entanto, DESI-MS se torna atrativa por não requerer preparo de amostra e ser realizada em ambiente aberto, livre de vácuo.

Em um experimento de imagem, a área total é subdividida (conceitualmente) em *pixels* que são analisados individualmente. Para cada *pixel* adquire-se um espectro de massas, sendo o montante de espectros adquiridos nos diferentes *pixels* relacionados com suas coordenadas espaciais. Como cada *pixel* representa um espaço associado ao espectro de massas, ao exibir as intensidades de um íon específico em todos os *pixels*, é possível formar uma imagem química. A distribuição de íons específicos pode ser visualizada pela criação de imagens químicas baseadas na intensidade desses íons.

Este tipo de análise, aliada à análise histopatológica, vem sendo empregada com sucesso para determinação e classificação de gliomas, incluindo oligodendroglioma, astrocitoma, e oligoastrocitoma, de diferentes graus histológicos e contendo diferentes concentrações de células tumorais em ambiente intra-operatório (GOWDA; DJUKOVIC, 2014). Outros tipos de tecidos foram investigados utilizando a abordagem de imageamento por MS (MSI, do inglês *mass spectrometry imaging*) (WEI et al., 2013).

No câncer de mama, a diferenciação de tecido normal e tumoral pela análise de margens cirúrgicas foi avaliada com DESI-MSI (CALLIGARIS et al., 2018), por 61 amostras de tecido mamário de 14 pacientes com CDI. Em outro estudo, foram examinadas biópsias cirúrgicas (28 pacientes, 28 amostras) e margens tumorais (22 pacientes, 98 amostras) de CDI (19 pacientes) e um tipo especial de carcinoma de mama, o carcinoma invasivo lobular (9 pacientes), com foco em

modelos de diagnóstico de câncer (GUENTHER et al. 2015). A detecção e caracterização de câncer de mama metastático em tecidos de linfonodos humanos também foi investigada por DESI- MSI (ZHANG et al. 2017).

Usando as tecnologias DESI-MSI, nosso grupo realizou recentemente uma investigação multicêntrica para um conjunto populacional diversificado, compreendendo pacientes de diferentes raças e nacionalidades, obtendo um modelo estatístico classificatório capaz de discriminar tumores CDI de tipo não especial (NST) de tecido normal adjacente (PORCARI et al., 2018). O modelo foi capaz de prever o status de ER, PR e o status resultante do receptor hormonal (RH) em amostras de CDI. No geral, o DESI-MSI permitiu discriminar regiões histológicas distintas do tecido. Assinaturas moleculares específicas de células de carcinoma foram selecionadas em relação ao estroma circundante, vasos, tecido adiposo e glândulas normais, gerando um modelo estatístico preditivo robusto para o diagnóstico de câncer de mama. Neste estudo, compreendendo apenas amostras do CDI - NST, 86 pacientes foram recrutados. Foi obtida precisão interlaboratorial de 95,3%, mostrando o potencial de DESI-MSI em gerar um conjunto comum de biomarcadores, suficientemente robustos para superar pequenas diferenças no método.

1.3.3 Comparações entre LC-MS e DESI-MS

Para o desenvolvimento de exames rápidos para o diagnóstico de câncer, pela análise do sangue, é de suma importância uma comparação entre os marcadores lipídicos dos tecidos tumorais de mama e as assinaturas lipídicas no sangue de pacientes com câncer de mama. No entanto, a relação entre os perfis lipídicos do plasma circulante analisado por LC-MS e o detectado por análise direta de tecidos por DESI-MSI não havia sido investigado até o momento.

Entre os poucos trabalhos que fizeram comparações entre DESI e LC-MS, destacam-se análises alvo desenvolvidas com o objetivo de comparar as duas técnicas para investigar as concentrações teciduais e sanguíneas de um medicamento específico, e os autores compararam a farmacocinética de cetamina anestésica diretamente da superfície traseira do animal por DESI-MS às concentrações sanguíneas da mesma substância por LC-MS, encontrando resultados equivalentes (KATONA et al., 2011). Outro estudo comparou o perfil lipídico (análise global) obtido por DESI-MS do tecido com o perfil lipídico obtido por LC-MS do extrato do mesmo tecido para a investigação dos biomarcadores do câncer de esôfago (ABBASSI-GHADI et al., 2016) e os autores demonstraram que o perfil lipídico observado por DESI-MS é semelhante ao obtido pelo LC-MS, o que confirmou DESI-MS como técnica autônoma para avaliação do perfil lipídico

Os lipídios do tecido do câncer de mama foram previamente explorados para compor técnicas de triagem, baseadas ou não em imagens moleculares, conforme apresentado anteriormente na seção 1.3.2. O uso de técnicas de imagem permite uma fácil correlação com a análise imunohistoquímica, agregando valor ao mapeamento molecular de substâncias sobre a superfície do tecido. A técnica de DESI-MSI, em particular, tem a vantagem de ser uma forma não destrutiva de obtenção de uma imagem molecular, sem necessidade de deposição de matriz ou preparação extensiva de amostras, facilitando assim o uso.

DESI-MSI, como uma técnica de ionização ambiente, oferece algumas vantagens sobre a análise por LC-MS, como pré-tratamento mínimo da amostra (ou seja, sem pré-concentração, extração, dissolução ou derivatização), análise de amostras não modificadas, em seu estado nativo e em condições ambiente, além da possibilidade de somar as informações da distribuição espacial das moléculas. Além disso, o uso de uma técnica de imagem como DESI-MSI permite a diferenciação de regiões teciduais com assinaturas moleculares distintas compostas de diferentes características histológicas (por exemplo, fibrose, estroma, glândulas normais, regiões CDI, etc.) sem o uso de outras ferramentas como captura por microdissecção a laser. O uso de variações nas abundâncias relativas de lipídios mostrou-se reprodutível o suficiente para sustentar o diagnóstico tecidual usando o DESI-MSI, conforme relatado aqui e em vários estudos anteriores, apesar da incapacidade de técnicas como esta de alcançar a quantificação absoluta de compostos.

A técnica de LC-MS, além das vantagens relacionadas à possibilidade de extração exaustiva das amostras, apresenta a possibilidade de realizar análises quantitativas quando desejado, juntamente com a chance de usar padrões internos e automatizar o processo de análise, permitindo ainda a identificação de isóbaros. Esses recursos permitem obter maior reprodutibilidade na análise quando comparados aos dados obtidos por DESI-MSI.

1.3.4 Análise, tratamento de dados e atribuição dos íons

O uso da estatística multivariada é essencial para a compreensão dos resultados sem perder informações relacionadas à diversidade de moléculas detectadas. Entre os métodos de análise multivariada, existem dois grandes grupos: os supervisionados e os não-supervisionados. Entre os não-supervisionados destaca-se o uso da análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) e entre os supervisionados, a análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares-Discriminant Analysis*). Ambas as análises, têm o objetivo de diferenciar em classes um conjunto complexo de dados, reduzindo sua

dimensionalidade e maximizando a variância entre as classes (GOODACRE et al., 2004; GORROCHATEGUI et al., 2016). A máquina de vetores de suporte (SVM, do inglês *Support Vector Machine*) é um outro método estatístico supervisionado, sendo bastante adequado para metabolômica, pois permite a classificação e predição de categorias (GROMSKI et al., 2015). O LASSO (do inglês, *Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*), é um modelo de regressão logística capaz de selecionar as variáveis preponderantes para a caracterização das classes, dando a elas um peso, de acordo com sua importância.

A curva ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*) é frequentemente empregada para avaliar a capacidade de predição dos modelos multivariados. Essa curva relaciona a seletividade do método em função de sua especificidade. A mensuração da capacidade preditiva se dá pela avaliação da área sob a curva (AUC, do inglês *Area Under the curve*) para o gráfico da curva ROC, sendo que tanto maior será a capacidade preditiva do modelo quanto mais próximo de 1 o valor da AUC. Para a confiabilidade dessa predição, utiliza-se o Índice de Confiança 95% (IC95%), cujo valor varia entre 0 e 1, sendo que, quanto mais próximo de 1, mais o valor da AUC do modelo é confiável (SZYMANSKA et al., 2012).

No entanto, além de descobrir quais compostos são diferenciais, é necessário descobrir suas identidades, o que permite a elaboração de hipóteses biológicas para entender os processos estudados. A identificação dos metabólitos selecionados como discriminantes pode ser realizado através de estudos de fragmentação, utilizando técnicas de MS/MS (CLENDINEN, MONGE, FERNÁNDEZ, 2017). Entretanto, a caracterização de metabólitos a partir de seu perfil de fragmentação nem sempre é trivial, já que existem muitas moléculas desconhecidas e nem sempre o espectro para a molécula encontrada estará presente no banco de dados. A utilização da medida da massa exata das moléculas, permite utilizar esta informação para procurar a identidade da molécula em banco de dados como o Metlin (SMITH et al., 2005), LipidMaps (FAHY;SUD;COTTER, 2007) ou HMDB (WISHART et al., 2007), tornando-se mais uma ferramenta para a construção do quebra-cabeças molecular.

1.4. Hipótese

A hipótese da nulidade indica que os metabólitos diagnósticos de câncer de mama estabelecidos para as matrizes de tecido tumoral e plasma não são semelhantes, portanto, não há equivalência de marcadores entre essas duas matrizes pelas técnicas de análise aplicadas. Esta

hipótese indica ainda que o modelo previamente descrito para classificação de amostras NST não poderá classificar satisfatoriamente as amostras especiais analisadas como conjunto independente.

A hipótese contrária à nulidade sugere que metabólitos diagnósticos de câncer de mama estabelecidos para as matrizes de tecido tumoral e plasma são total ou parcialmente semelhantes, portanto, há equivalência de marcadores entre essas duas matrizes pelas técnicas de análise aplicadas. Essa hipótese sugere também que o modelo multicêntrico prévio será capaz de classificar corretamente amostras de carcinoma invasivo tipo especial, analisadas como conjunto independente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Principais

- Verificar se os metabólitos diagnósticos de câncer de mama encontrados no tecido tumoral podem ser detectados também no plasma de mulheres com câncer de mama, em comparação a voluntárias saudáveis.
- Verificar a capacidade de classificação de amostras de tecido de carcinoma de mama invasivo tipo especial, por meio do modelo estatístico multicêntrico obtido anteriormente (PORCARI et al., 2018) para o diagnóstico de tecido de carcinoma de mama ductal invasivo, pela técnica de DESI-MSI.

2.2. Objetivos Secundários

- Apontar metabólitos (lipídios) plasmáticos capazes de discriminar pacientes com câncer de mama de voluntárias saudáveis, detectados a partir da técnica de LC-MS/MS.
- Verificar entre os metabólitos detectados em plasma, quais também foram detectados no tecido tumoral pela técnica DESI-MSI, seguindo o conjunto de biomarcadores potenciais apontados no estudo multicêntrico anterior (PORCARI et al., 2018).
- Verificar se os metabólitos comuns entre as duas matrizes (plasma e tecido) poderiam ser utilizados para diferenciar o plasma de mulheres com câncer do plasma de mulheres saudáveis.

3. CAPÍTULO 1

3.1 Artigo Publicado

SILVA, A. A. R.; CARDOSO, R. C.; REZENDE, L. M.; LIN, J. Q.; GUIMARÃES, F.; SILVA, G. R. P.; MURGU, M.; PRIOLLI, D. G.; EBERLIN, M. M.; TATA, A.; EBERLIN, L. S.; DERCHAIN, S. F. M.; PORCARI, A. M. Multiplatform Investigation of Plasma and Tissue Lipid Signatures of Breast Cancer Using Mass Spectrometry Tools. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 10, n. 21, p. 3611-3628, 2020.

Este artigo versa sobre a associação de assinaturas lipídicas encontradas no plasma de mulheres com câncer de mama com aqueles encontrados no tecido tumoral. Foi desenvolvido pela parceria estabelecida com o Hospital Prof. Dr. Aristodemo Pinotti – CAISM, da Universidade Estadual de Campinas, representado pela pesquisadora Dra. Sophie F. M. Derchain. Neste trabalho, amostras de tecido tumoral de CDI de tipo especial e não especial foram avaliadas pela técnica de DESI-MSI e classificadas em função de seu diagnóstico de acordo com o modelo estatístico previamente estabelecido por nosso grupo (PORCARI et al., 2018). Plasma das mesmas mulheres foi comparado ao plasma de voluntárias saudáveis (grupo controle), permitindo encontrar assinaturas lipídicas para diferenciação entre os grupos controle e com câncer. Com os resultados de ambas as análises, os 31 biomarcadores apontados pelo modelo de classificação do tecido foram confrontados com compostos encontrados no plasma. Nessa comparação, 17 compostos presentes no plasma também compõem o modelo estatístico usado para o tecido. No entanto, ao avaliar a capacidade preditiva desses compostos comuns entre as duas matrizes para classificação do plasma, nenhum poder discriminatório foi observado. Acredita-se que isso poderia estar relacionado a dois fatores diferentes: (i) a diluição de biomarcadores de tecidos específicos no sangue periférico e (ii) os diferentes métodos de extração aplicados às amostras de plasma e tecido. A detecção em plasma de compostos relacionados ao tecido reflete como a lesão tecidual pode afetar a composição sanguínea periférica. De forma geral, este artigo demonstra a complementaridade das técnicas estudadas e dos resultados obtidos para as diferentes matrizes na caracterização do processo neoplásico.



Article

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

† These authors contributed equally to this work.

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



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

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

2. Results

2.1. Molecular Imaging of Breast Tissues by DESI-MSI

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

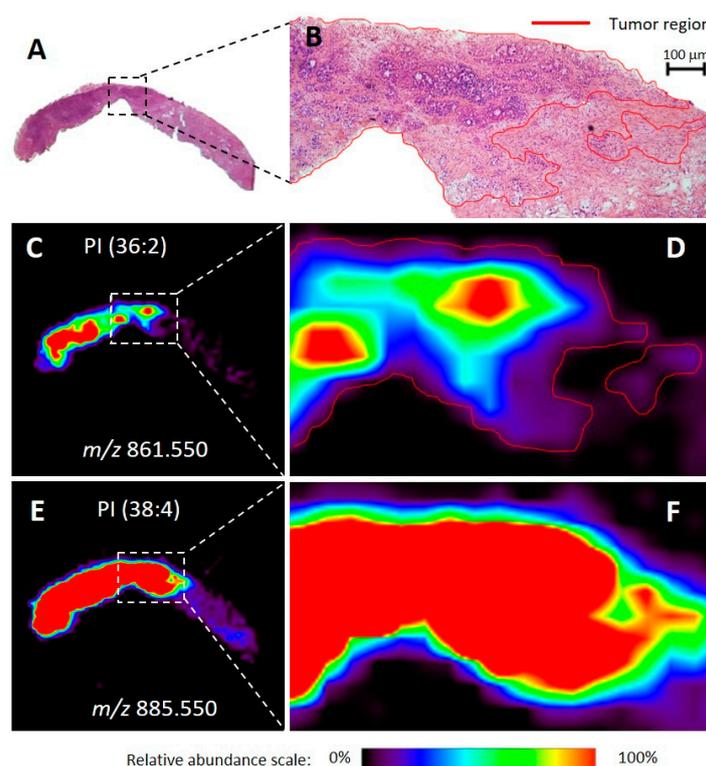


Figure 1. Optical images of hematoxylin & eosin (H&E) stained slides and representative ion images for a biopsied tissue sample diagnosed as invasive apocrine carcinoma of the breast with a signet ring. The entire tissue section is shown in (A) and the optical magnification (40×) of a region is shown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

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

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

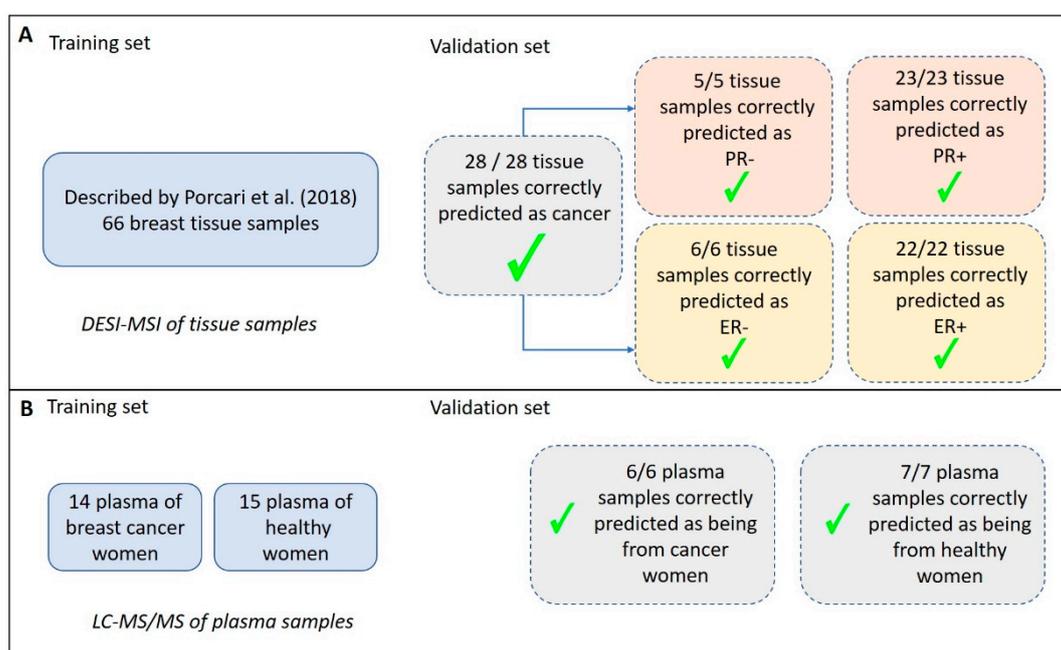


Figure 2. Summary of the classification predictions of breast carcinoma tissue and plasma samples. (A) Results obtained for tissue analysis using DESI-MSI (Desorption-Electrospray-Ionization—Mass Spectrometry Imaging). A previously validated model for classification of samples was described by Porcari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

2.2. Analysis of Plasma by LC-MS/MS

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

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

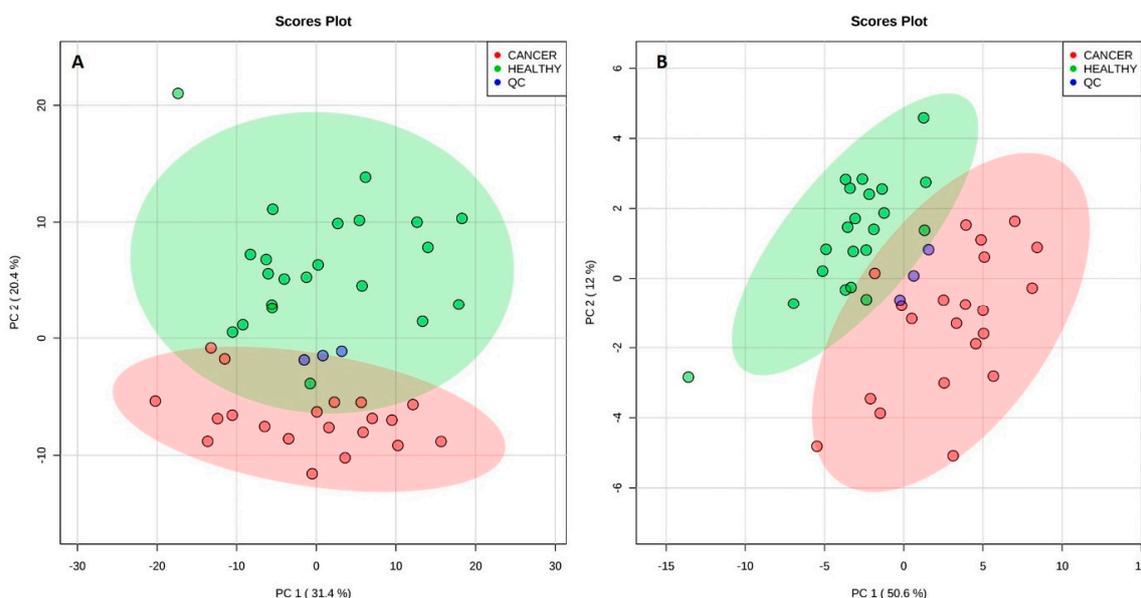


Figure 3. Principal component analysis (PCA) scores plot for plasma analysis in positive ion mode (A) and in negative ion mode (B). Segregation was observed for both modes between cancer and healthy individuals. Quality control (QC) samples (pool of all the samples) are also plotted. The explained amount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

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

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

Measured <i>m/z</i>	Ion Mode	Species	Lipid Assignment	Proposed Formula	Exact <i>m/z</i>	Mass Error (ppm)
Characteristic of healthy plasma samples						
496.340	+	[M + H] ⁺	LysoPC(16:0)	C ₂₄ H ₅₁ NO ₇ P	496.340	0.0
524.371	+	[M + H] ⁺	LysoPC(18:0)	C ₂₆ H ₅₅ NO ₇ P	524.372	1.9
782.569	+	[M + H] ⁺	PC(40:4)	C ₄₄ H ₈₁ NO ₈ P	782.570	1.3
810.600	+	[M + H] ⁺	PC(38:4)	C ₄₆ H ₈₅ NO ₈ P	810.601	1.2
540.330	−	[M + FA − H] [−]	LysoPC(16:0)	C ₂₅ H ₅₁ NO ₉ P	540.330	0.0
568.361	−	[M + FA − H] [−]	LysoPC(18:0)	C ₂₇ H ₅₅ NO ₉ P	568.361	0.0
588.330	−	[M + FA − H] [−]	LysoPC (20:4)	C ₂₉ H ₅₁ NO ₉ P	588.330	0.0
566.346	−	[M + FA − H] [−]	LysoPC(18:1)	C ₂₇ H ₅₃ NO ₉ P	566.346	0.0
Characteristic of cancer plasma samples						
786.600	+	[M + H] ⁺	PC(36:2)	C ₄₄ H ₈₅ NO ₈ P	786.601	1.3
796.738	+	[M + NH ₄] ⁺	TG (46:0)	C ₄₉ H ₉₈ NO ₆	796.739	1.3
758.570	+	[M + H] ⁺	PC(34:2)	C ₄₂ H ₈₁ NO ₈ P	758.570	0.0
824.770	+	[M + NH ₄] ⁺	TG(48:0)	C ₅₁ H ₁₀₂ NO ₆	824.771	1.2
407.294	−	[M − H ₂ O − H] [−]	13'-Hydroxy-gamma-tocotrienol	C ₂₈ H ₃₉ O ₂	407.295	2.5
409.310	−	[M − H] [−]	gamma-tocotrienol	C ₂₈ H ₄₁ O ₂	409.311	2.4
802.559	−	[M + FA − H] [−]	PC(34:2)/PE-Nme(36:2)	C ₄₃ H ₈₁ NO ₁₀ P	802.560	1.2
830.590	−	[M + FA − H] [−]	PC(36:2)	C ₄₅ H ₈₅ NO ₁₀ P	830.591	1.2
776.544	−	[M + FA − H] [−]	PC(32:1)	C ₄₁ H ₇₉ NO ₁₀ P	776.544	0.0

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

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

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

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

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

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

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

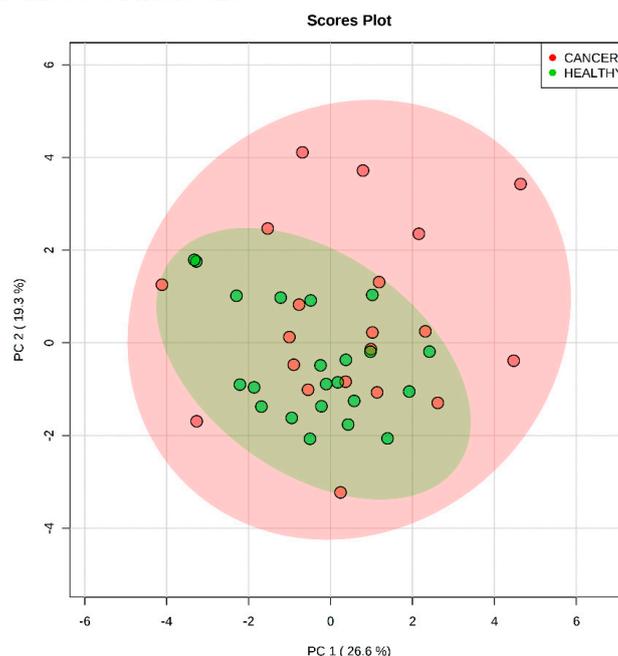


Figure 4. Principal component analysis scores-plot of the differentiation of plasma samples analyzed by LC-MS/MS (Liquid Chromatography—tandem mass spectrometry) using the molecules found in both plasma and tissue by DESI-MSI (Desorption-Electrospray-Ionization—Mass Spectrometry Imaging) [28]. The set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

3. Discussion

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

3.1. Molecular Imaging of Breast Tissues by DESI-MSI

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

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

3.2. Analysis of Plasma by LC-MS/MS

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

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

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

3.3. Correspondence of Biomarkers Between Tissue and Plasma

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

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

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

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

4. Materials and Methods

4.1. Subjects and Ethical Consent

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

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

Table 3. Clinicopathologic characteristics of women with breast cancer.

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

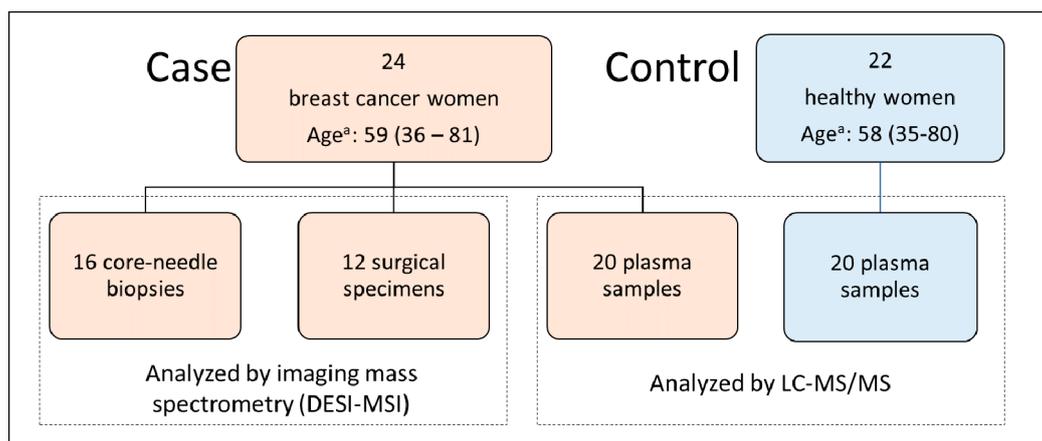


Figure 5. Distribution of samples over case and control groups and the technique of choice employed in each subset: Desorption-Electrospray-Ionization—Mass Spectrometry Imaging (DESI-MSI) for tissue samples and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) for plasma samples. ^a Age is expressed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

4.2. Tissue Samples Analyzed by DESI-MSI

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

4.3. DESI-MSI Experiments

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

4.4. Plasma Samples Analyzed by LC-MS

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

4.4.1. Lipid Extraction

Plasma samples (150 μL) were extracted with the addition of 600 μL of a CHCl_3 :MeOH solution (2:1, *v/v*). Afterward, vortex (30 s) and centrifugation (12,000 RPM, 5 min, 4 $^\circ\text{C}$) were carried out and 450 μL of the bottom organic layer were collected and dried under nitrogen flow. Dried samples were stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until the analysis. For analysis, samples were reconstituted in 1 mL of a solution of isopropanol (IPA)/ACN/water (2:1:1, *v/v/v*).

4.4.2. LC-MS Analysis

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

4.4.3. Data Extraction

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

4.5. Statistical Analysis

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Abbreviations

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

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

References

1. Gogiashvili, M.; Nowacki, J.; Hergenröder, R.; Hengstler, J.G.; Lambert, J.; Edlund, K. HR-MAS NMR Based Quantitative Metabolomics in Breast Cancer. *Metabolites* **2019**, *9*, 19. [[CrossRef](#)]
2. Hart, C.D.; Tenori, L.; Luchinat, C.; Di Leo, A. Metabolomics in Breast Cancer: Current Status and Perspectives. In *Novel Biomarkers in the Continuum of Breast Cancer*; Stearns, V., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; pp. 217–234.
3. Wishart, D.S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 473. [[CrossRef](#)]
4. Jasbi, P.; Wang, D.; Cheng, S.L.; Fei, Q.; Cui, J.Y.; Liu, L. Breast cancer detection using targeted plasma metabolomics. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2019**, *1105*, 26–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Huang, M.; Li, H.-Y.; Liao, H.-W.; Lin, C.-H.; Wang, C.-Y.; Kuo, W.-H.; Kuo, C.-H. Using post-column infused internal standard assisted quantitative metabolomics for establishing prediction models for breast cancer detection. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2019**, *34*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Lecuyer, L.; Dalle, C.; Lyan, B.; Demidem, A.; Rossary, A.; Vasson, M.P.; Petera, M.; Lagree, M.; Ferreira, T.; Centeno, D.; et al. Plasma Metabolomic Signatures Associated with Long-term Breast Cancer Risk in the SU.VI.MAX Prospective Cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2019**, *28*, 300–1307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Zhang, Q.; Xu, H.; Liu, R.; Gao, P.; Yang, X.; Jin, W. A Novel Strategy for Targeted Lipidomics Based on LC-Tandem-MS Parameters Prediction, Quantification, and Multiple Statistical Data Mining: Evaluation of Lysophosphatidylcholines as Potential Cancer Biomarkers. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 3389–3396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Cala, M.P.; Aldana, J.; Medina, J.; Sanchez, J.; Guio, J.; Wist, J. Multiplatform plasma metabolic and lipid fingerprinting of breast cancer: A pilot control-case study in Colombian Hispanic women. *PLoS ONE* **2018**, *13*. [[CrossRef](#)]
9. Zhang, Q.; Liu, R.; Xu, H.; Yang, X.; Zhang, Y.; Wang, Q.; Gao, P.; Bi, K.; Han, T.; Li, Q. Multifunctional isotopic standards based steroidomics strategy: Exploration of cancer screening model. *J. Chromatogr. A* **2020**, *1614*, 460723. [[CrossRef](#)]
10. Luo, X.; Yu, H.; Song, Y.; Sun, T. Integration of metabolomic and transcriptomic data reveals metabolic pathway alteration in breast cancer and impact of related signature on survival. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234*, 13021–13031. [[CrossRef](#)]
11. Park, J.; Shin, Y.; Kim, T.H.; Kim, D.H.; Lee, A. Plasma metabolites as possible biomarkers for diagnosis of breast cancer. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0225129. [[CrossRef](#)]
12. Chen, X.; Chen, H.; Dai, M.; Ai, J.; Li, Y.; Mahon, B.; Dai, S.; Deng, Y. Plasma lipidomics profiling identified lipid biomarkers in distinguishing early-stage breast cancer from benign lesions. *Oncotarget* **2016**, *7*, 36622–36631. [[CrossRef](#)]

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

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

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



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[†] These authors contributed equally to this work

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

Supplementary information contains:

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

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

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

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

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

Supplementary Figures

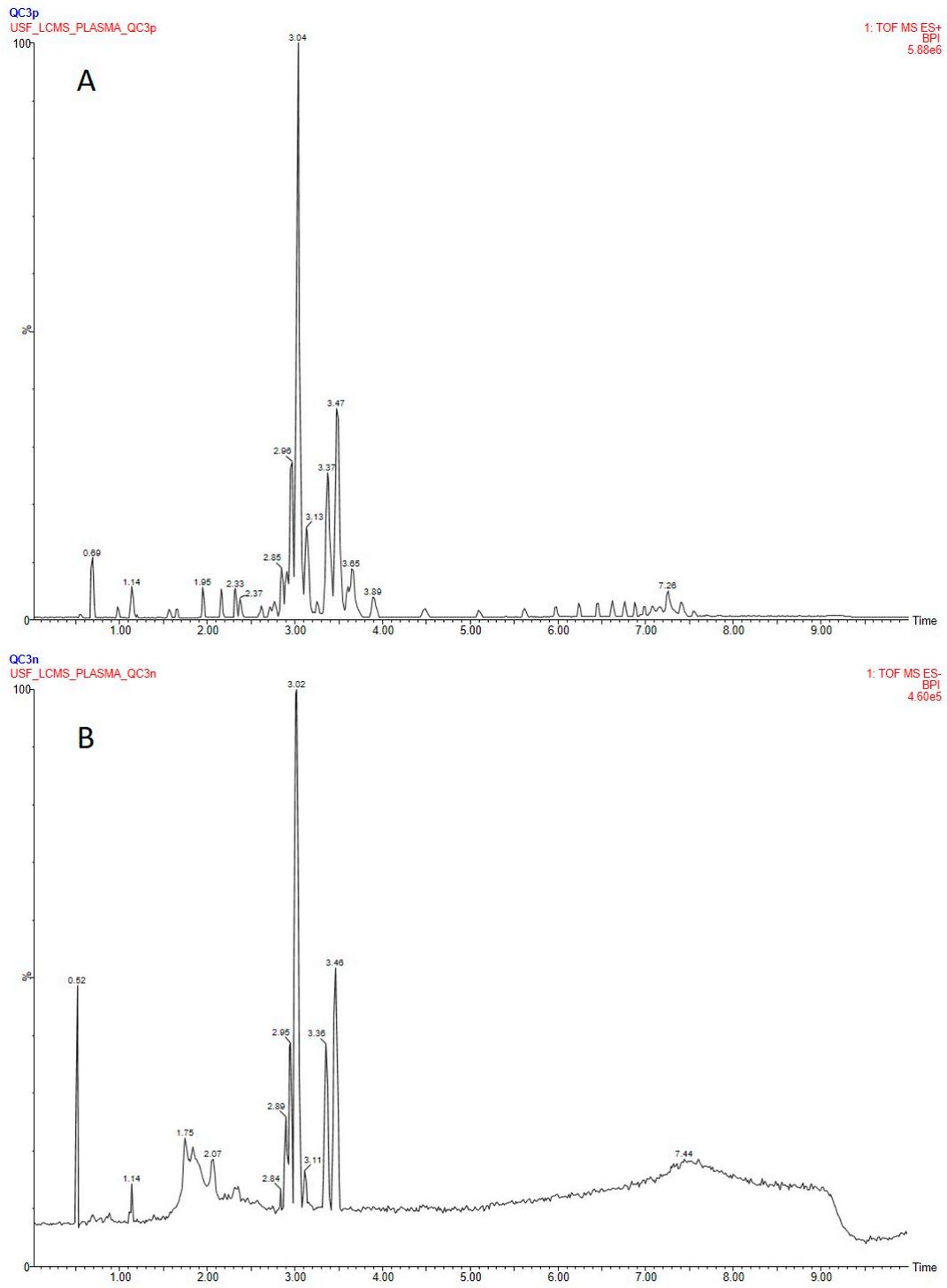


Figure S1: Base peak ion (BPI) chromatograms for a representative quality control (QC) sample acquired in (A) the positive ion mode and (B) the negative ion mode.

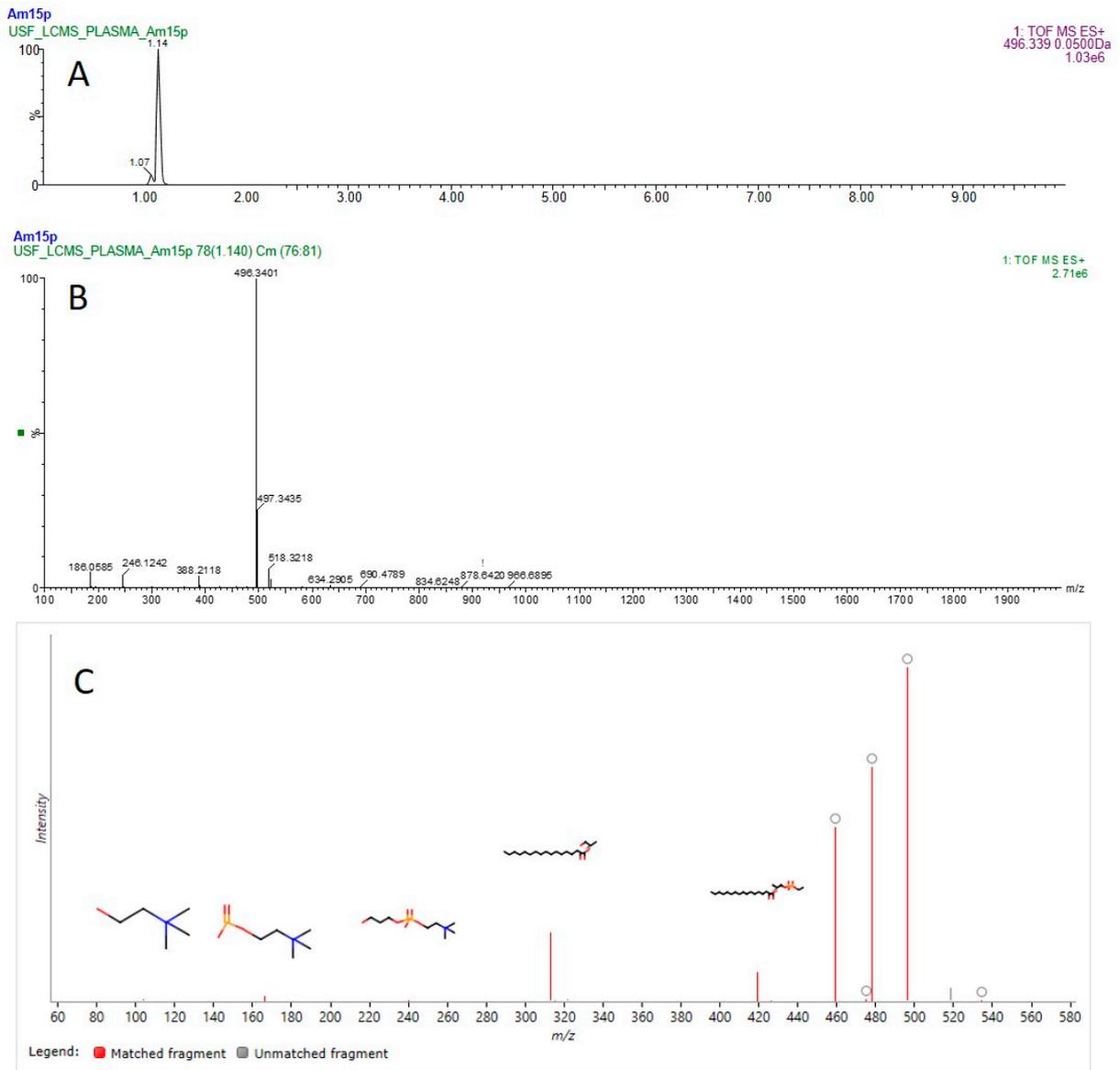


Figure S2: Data for one characteristic ion of healthy plasma samples observed in the positive ion mode. The LysoPC (16:0), observed as the $[M + H]^+$ adduct at m/z 496.3399. The extracted ion chromatogram (EIC) is shown in (A). The low-energy mass spectrum is shown in (B). The deconvoluted fragmentation spectrum obtained by Progenesis Q1 (Waters), showing the identifying fragments is shown in (C), where red signalizes the matched fragments, according to theoretical fragmentation.

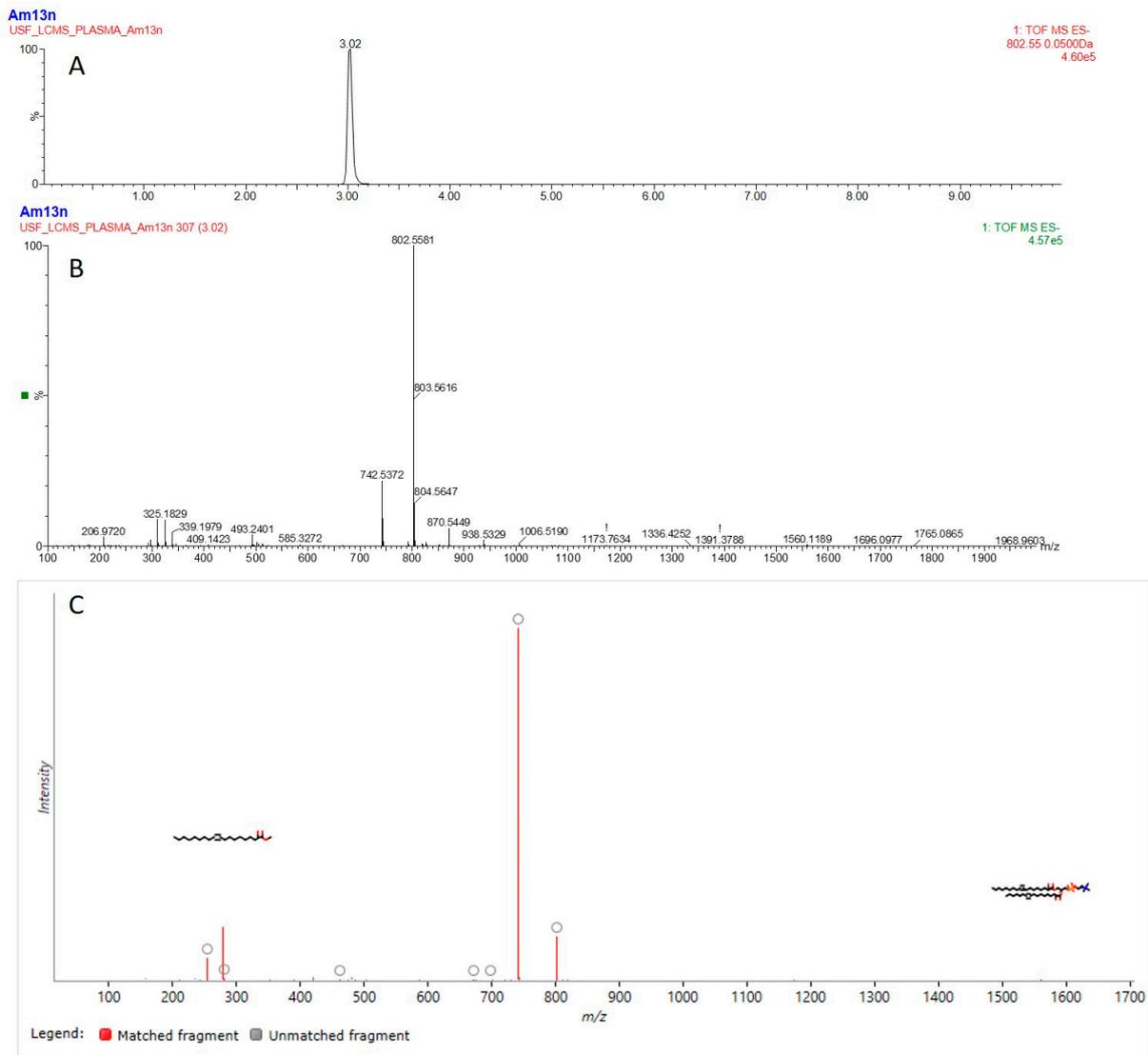


Figure S3: Data for one characteristic ion of cancer plasma samples observed in the negative ion mode. The PC(34:2)/PE-Nme(36:2), observed as the $[M + FA - H]^-$ adduct at m/z 802.5593. The extracted ion chromatogram (EIC) is shown in (A). The low-energy mass spectrum is shown in (B). The deconvoluted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

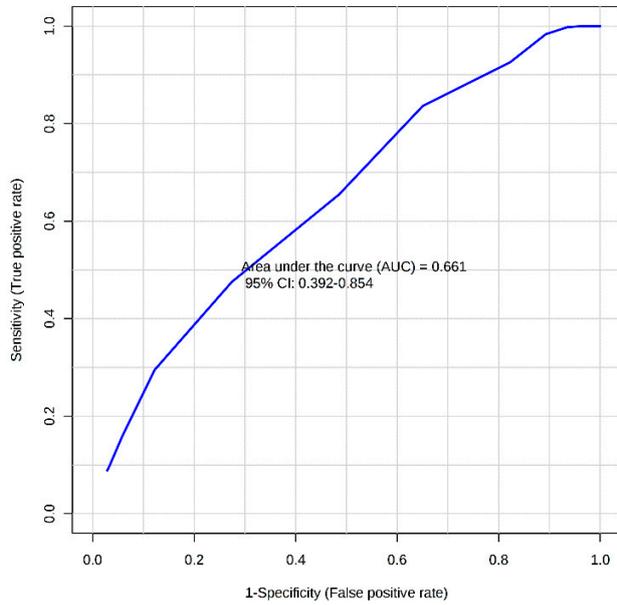


Figure S4: Receiver operator characteristics (ROC) curve for the support vector machine (SVM) model for differentiation among cancer and health status based on plasma lipids listed as molecular signatures for tissue differentiation using imaging mass spectrometry. A near to diagonal ROC curve represents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

4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O estudo trouxe uma comparação das assinaturas moleculares do câncer de mama encontradas sobre o tecido tumoral com aquelas encontradas no plasma das mesmas pacientes. Neste contexto, tanto o perfil lipídico obtido para os tecidos tumorais quanto aquele obtido para o plasma se confirmaram com potencial de utilização para fins de diagnóstico de câncer de mama, como já apontado previamente⁴e pela literatura (CALA et al., 2018; CALLIGARIS et al. 2014; GUENTHER et al., 2020; HUANG et al., 2019; JASBI et al., 2019; LECUYER et al., 2019; PORCARI et al., 2018; TATA et al., 2016; WOOLMAN et al., 2017; ZHANG, Q. et al., 2019; ZHANG, Q. et al., 2020).

A comparação da composição lipídica de plasma e tecido tumoral de pacientes com câncer de mama, revelou que há metabólitos comuns entre as duas matrizes. No entanto, as moléculas em comum não são capazes de promover a diferenciação em ambas as matrizes concomitantemente, sendo que plasma e tecido apresentaram marcadores diferentes em modelos classificatórios e preditivos. Este fato evidencia o papel de complementariedade entre as matrizes, dado que um conjunto específico de marcadores lipídicos para cada matriz mostrou-se necessário na avaliação deste conjunto de amostras. Embora os indicadores de lesão tecidual não predominem como biomarcadores no sangue periférico, alguns desses marcadores foram encontrados em amostras de plasma, demonstrando sensibilidade e precisão relevantes do método LC-MS. Aspectos como a diluição de marcadores de tecido no sangue periférico e as diferenças metodológicas entre as técnicas de DESI-MSI e LC-MS podem ter causado a divergência entre os conjuntos de marcadores propostos para as duas matrizes. Outra possibilidade, que se mostra como perspectiva de continuidade do estudo, é a segmentação do grupo amostral de acordo com estadiamento da doença e outras características clínicas relevantes. Tumores em estágios mais avançados e que já tenham atingido a metástase poderiam liberar maior quantidade de marcadores teciduais, o que possibilitaria sua detecção em plasma. Ainda, admite-se que este estudo foi realizado em escala piloto e que a avaliação de um maior número de sujeitos poderia reforçar os achados aqui reportados.

Nosso estudo também possibilitou o teste do modelo de classificação descrito em nossos achados anteriores para diagnóstico de tecido tumoral por DESI-MSI para a análise de um conjunto de amostras independente, compreendendo carcinomas de tipo especial, em um experimento interlaboratorial (PORCARI et al., 2018). Os carcinomas de tipo especial não haviam sido

utilizados anteriormente para a construção desse modelo de classificação e a obtenção de 100% de especificidade / sensibilidade demonstra o poder discriminatório da metodologia proposta. Esses resultados reforçam o DESI-MSI como uma técnica robusta a ser usada para o diagnóstico de câncer de mama, incluindo a classificação correta de carcinomas de tipo especial de acordo com seu status de câncer e o status de ER / PR com notável especificidade, sensibilidade e precisão.

Neste trabalho foram apresentadas duas plataformas de MS, com abordagens de análise lipidômica diferentes, utilizadas para matrizes que mostraram possuir composições diferentes, porém complementares. Assim, estudos multiplataforma envolvendo diferentes matrizes biológicas no estudo de neoplasias, podem ser a chave para compreender as alterações fisiológicas proveniente da presença de neoplasias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASSI-GHADI, N.; JONES, E. A.; GOMEZ-ROMERO, M.; GOLF, O; KUMAR, S; HUANG, J; KUDO, H; GOLDIN, R. D.; HANNA, G. B.; TAKATS, Z. A Comparison of DESI-MS and LC-MS for the Lipidomic Profiling of Human Cancer Tissue. **J. Am. Soc. Mass. Spectrom.**, v. 27, n. 2, p. 255-264, 2016.

AGBARYA, A.; RUIMI, N.; EPELBAUM, R.; BEN-ARYE, E.; MAHAJNA, J. Natural products as potential cancer therapy enhancers: A preclinical update. **SAGE Open Medicine**, v. 2, 2014.

ASLAM, B.; BASIT, M.; NISAR, M. A.; KHURSHID, M.; RASOOL, M. H. Proteomics: Technologies and Their Applications. **J. Chromat. Sci.**, v. 55, n. 2, p. 182-196, 2016.

BADU-TAWIAH, A. K.; EBERLIN, L. S.; OUYANG Z.; COOKS, R. G. Chemical Aspects of the Extractive Methods of Ambient Ionization Mass Spectrometry. **Annu. Rev. Phys. Chem.**, v. 64, n. 1, p. 481-505, 2013.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: **Cancer J. Clin.**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BUJAK, R.; STRUCK-LEWICKA, W.; KARKUSZEWSKI, M. J.; KALISZAN, R. Metabolomics for laboratory diagnostics. **J. Pharml. Bioml. Anal.**, v. 113, p. 108-120, 2015.

CALA, M.P.; ALDANA, J.; MEDINA, J.; SANCHEZ, J.; GUIO, J.; WIST, J. Multiplatform plasma metabolic and lipid fingerprinting of breast cancer: A pilot control-case study in Colombian Hispanic women. **PLoS ONE**, v.13, n.2, 2018.

CALLIGARIS, D.; CARAGACIANU, D.; LIU, X.; NORTON, I.; THOMPSON, C.J.; RICHARDSON, A.L.; Application of desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging in breast cancer margin analysis. **PNAS**, v. 42, n. 111, p. 15184-15189, 2014.

CARDOSO, M. R.; SANTOS, J. C.; RIBEIRO, M. L.; TALARICO, M.; VIANA, L. R.; DERCHAIN, S. A metabolomic approach to predict breast cancer behavior and chemotherapy

response. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, n. 2, p. 617, 2018.

CHERNUSHEVICH, I.V.; LOBODA, A.V.; THOMSON B. A. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v. 8, n. 36, p. 849-865, 2001.

CLENDINEN, C. S.; MONGE, M. E.; FERNÁNDEZ, F. M. Ambient mass spectrometry in metabolomics. **Analyst**, v. 142, n. 17, p. 3101–3117, 2017.

CIRQUEIRA, M. B.; MOREIRA, M. A. R.; SOARES, L. R.; FREITAS-JÚNIOR, R. Subtipos moleculares do câncer de mama. **FEMINA**, v. 39, n. 10, p. 499-503, 2011.

COATES, A. S.; WINER, E. P.; GOLDBIRSCHE, A.; GELBER, R. D.; GNANT, M.; PICCART-GEBHART, M.; THURLIMANN, B.; SENN, H. J. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. **Ann. Oncology.**, v. 26, n.8, p. 1533–1546, 2015.

DENKERT, C.;BUCHER, E.; HILVO, M.; SALEK, R.; ORESIC, M.; GRIFFIN, J.; BROCKMOLLER, S.; F. KLAUSCHEN, F.; LOIBL, S.; BARUPAL, D. K.;BUDCZIES, J.; ILJIN, K.; NEKLJUDOVA, V.; FIEHN, O. Metabolomics of human breast cancer: new approaches for tumor typing and biomarker discovery. **Genome Med.**, v. 4, n. 4, p. 37-49, 2015.

EROLE, P.; BOSCH, A.; ALEJANDRO PÉREZ-FIDALGO, J. LLUCH A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treat. Rev.**, v. 6, n. 38, p. 698-707, 2012.

ESSERMAN, L. J.; BERRY, D. A.; DEMICHELE, A.; CAREY, L.; DAVIS, S. E.; BUXTON, M.; HUDIS, C.; GRAY, J. W.; PEROU, C.; YAU, C.; LIVASY, C.; KRONTRAS, H.; MONTGOMERY, L.; TRIPATHY, D.; LEHMAN, C.; LIU, M. C.; OLOPADE, O. I.; RUGO, H. S.; CARPENTER, J. T.; DRESSLER, L. Pathologic complete response predicts recurrence-free survival more effectively by cancer subset: Results from the I-SPY 1 TRIAL - CALGB 150007/150012, ACRIN 6657. **J. Clin. Oncol.**, v. 30, n. 26, p. 3242–3249, 2012.

FAHY, E.; SUD, M.; COTTER D.; SUBRAMANIAM S. LIPID MAPS online tools for lipid research. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, p. 606-612, 2007.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 4926, n. 246, p. 64-71, 1989.

GERMANO, S.; O'DRISCOLL, L. Breast Cancer: Understanding Sensitivity and Resistance to Chemotherapy and Targeted Therapies to Aid in Personalised Medicine. **Current Cancer Drug Targets**, v. 9, n. 3, 2009.

GLOBOCAN. **CÂNCER HOJE**, <encurtador.com.br/gC789> . Acesso em: 25 de maio de 2020.

GOBARDHAN, P. D.; ELIAS, S. G.; MADSEN, E. V.; VAN WELY, B.; VAN DEN WILDENBERG, F.; THEUNISSEN, E. B.; ERNST, M. F.; KOKKE, M. C.; VAN DER POL, C.; BOREL RINKES, I. H.; WIJSMAN, J. H.; BONGERS, V.; VAN GORP, J.; VAN DALEN, T. Prognostic value of lymph node micrometastases in breast cancer: A multicenter cohort study. **Ann. Surg. Oncol.**, v. 18, n. 6, p. 1657–1664, 2011.

GOODACRE, R.; VAIDYANATHAN, S.; DUNN, W. B.; HARRIGAN, G. G.; KELL, D. B. Metabolomics by numbers: Acquiring and understanding global metabolite data. **Trends in Biotechnol.**, v. 22, n. 5, p. 245–252, 2004.

GORROCHATEGUI, E.; JAUMOT, J.; LACORTE, S.; TAULER, R. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. **Tr. A. C.**, v. 82, p. 425–442, 2016.

GOUDSMIT, S. A. A Time-of-Flight Mass Spectrometer. **Phys. Rev.**, v. 5, n. 74, p. 622-623, 1948.

GOWDA, G. N.; DJUKOVIC, D. Overview of Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Opportunities and Challenges. **Methods Mol. Biol.**, v. 1198, n. 1, p. 3-12, 2014.

GRAHAM, T. A.; SOTTORIVA, A. Measuring cancer evolution from the genome. **J. Pathol.**, v. 241, n. 2, p. 183–191, 2017.

GROMSKI, P. S.; MUHAMADALI, H.; ELLIS, D. I.; XU, Y.; CORREA, E.; TURNER, M. L.; GOODACRE, R. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. **Anal. Chim. Acta**, v. 879, p. 10–23, 2015.

GUENTHER, S.; MUIRHEAD, L. J.; SPELLER, A. V.; GOLF, O.; STRITTMATTER, N.; RAMAKRISHNAN, R.; GOLDIN, R. D.; JONES, E.; VESELKOV, K.; NICHOLSON, J.; DARZI, A.; TAKATS, Z. Spatially resolved metabolic phenotyping of breast cancer by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Cancer Res.**, v. 9, n, 75, p. 1828-1837, 2015.

HAMMOND, M. E.; HAYES, D. F.; DOWSETT, M.; ALLRED, D. C.; HAGERTY, K. L.; BADVE, S.; FITZGIBBONS, P. L.; FRANCIS, G.; GOLDSTEIN, N. S.; HAYES, M.; HICKS, D. G.; LESTER, S.; LOVE, R.; MANGU, P. B.; MCSHANE, L.; MILLER, K.; OSBORNE, C. K.; PAIK, S.; PERLMUTTER, J.; RHODES, A. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 7, n. 134, p. 48-72, 2010.

HART C. D.; TENORI L.; LUCHINAT C.; DI LEO A. **Novel Biomarkers in the Continuum of Breast Cancer**, Springer International Publishing: Cham, 2016, 279 p..

HART, C. D.; VIGNOLI, A.; TENORI, L.; UY, G. L.; VAN TO, T.; ADEBAMOWO, C.; HOSSAIN, S. M.; BIGANZOLI, L.; RISI, E.; LOVE, R. R.; LUCHINAT, C.; DI LEO, A. Serum Metabolomic Profiles Identify ER-Positive Early Breast Cancer Patients at Increased Risk of Disease Recurrence in a Multicenter Population. **Clin. Cancer. Res.**, v. 6, n. 23, p. 1422-1431, 2017.

HELMUT, S.; WOLFGANG, P. Apparatus for separating charged particles of different specific charges, 1960, **US Patent**, 2939952.

HIPPLE, J. A.; SOMMER, H.; THOMAS H. A. A Precise Method of Determining the Faraday by Magnetic Resonance. **Phys. Rev.**, v. 12, n. 76, p. 1877-1878, 1949.

HOON TAN, P.; ELLIS, I.; ALLISON, K.; BROGI, E.; FOX, S. B.; LAKHANI, S.; LAZAR, A. J.; MORRIS, E. A.; SAHIN, A.; SALGADO, R.; SAPINO, A.; SASANO, H.; SCHNITT, S.; SOTIRIOU, C.; VAN DIEST, P.; WHITE, V. A.; LOKUHETTY, D.; CREE, I. A.; WHO. The 2019 WHO classification of tumours of the breast. **Histopathology**, 2020.

HUANG, M.; LI, H.-Y.; LIAO, H.-W.; LIN, C.-H.; WANG, C.-Y.; KUO, W.-H.; KUO, C.-H. Using post-column infused internal standard assisted quantitative metabolomics for establishing prediction models for breast cancer detection. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v.34, 2019.

HORNING, E. C.; HORNING, M. G.; CARROLL, D.I.; DZIDIC, I.; STILLWELL R.N. New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure. **Anal. Chem.**, v. 6, n. 45, p. 936-943, 1973.

HU, Q.; NOLL, R. J.; LI, H.; MAKAROV, A.; HARDMAN, M.; COOKS, R. G. The Orbitrap: a new mass spectrometer. **J. Mass Spectrom.**, v. 4, n. 40, p. 430-443, 2005.

INCA. **Câncer**. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>> . Acesso em: 22 de maio de 2020.

IVANISEVIC, J.; WANT E.J. From Samples to Insights into Metabolism: Uncovering Biologically Relevant Information in LC-HRMS Metabolomics Data. **Metabolites**, v. 12, n. 9, p. 308, 2019.

JASBI, P.; WANG, D.; CHENG, S.L.; FEI, Q.; CUI, J.Y.; LIU, L. Breast cancer detection using targeted plasma metabolomics. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v.1105, p. 26–37, 2019.

KATONA, M.; DENES, J.; SKOUMAL, R.; TOTH, M.; TAKÁTS, Z. Intact skin analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Analyst**, v. 136, n. 4, p. 835-840, 2011.

KLASSEN, A.; FACCIO, A. T.; CANUTO, G. A. B.; CRUZ, P. L. R.; RIBEIRO, H. C.; TAVARES, M. F. M.; SUSSULINI, A. Metabolomics: Definitions and Significance in Systems Biology. In: SUSSULINI, A. (Ed.). **Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 3-17.

LECUYER, L.; DALLE, C.; LYAN, B.; DEMIDEM, A.; ROSSARY, A.; VASSON, M.P.; PETERA, M.; LAGREE, M.; FERREIRA, T.; CENTENO, D. Plasma Metabolomic Signatures Associated with Long-term Breast Cancer Risk in the SU.VI.MAX Prospective Cohort. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 28, n. 8, p. 1300–1307, 2019

MARMET, P., Quadrupole Mass Analyzers. *J. Vac. Sci. Tech.*, v. 1, n. 8, p. 262, 1971.

MISHRA, P.; AMBS, S. Metabolic signatures of human breast cancer. **Mol. Cell. Oncol.**, v. 2, n. 3, p. 1–10, 2015.

MURRAY, K. K.; BOYD, R. K.; EBERLIN, M. N.; LANGLEY, G.; LI, L.; NAITO, Y. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013), **Pure Appl. Chem.**, v. 85, n.7, p.1515-1609, 2013.

OGATA H.; GOTO S.; SATO K.; FUJIBUCHI W.; BONO H, KANEHISA M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 27, n. 1, p. 29-34, 1999.

PEROU, C. M.; SØRLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; REES, C. A.; POLLACK, J. R.; ROSS, D. T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L. A.; FLUGE, O.; PERGAMENSHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S. X.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, A. L.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Molecular Portraits of Breast Cancer. **Nature**, v. 6797, n. 406, p. 747–752, 2000.

PORCARI, A. M. **Novas estratégias de tipificação e diagnóstico de materiais biológicos por espectrometria de massas**. 2018. 80 f. Dissertação (Doutorado em Ciências na área de Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

PORCARI, A. M.; ZHANG, J.; GARZA, K. Y.; RODRIGUES-PERES, R. M.; LIN, J. Q.; YOUNG, J. H.; TIBSHIRANI, R.; NAGI, C.; PAIVA, G. R.; CARTER, S. A.; SARIAN, L. O.; EBERLIN, M. N.; EBERLIN, L. S. Multicenter Study Using Desorption-Electrospray-Ionization-Mass-Spectrometry Imaging for Breast-Cancer Diagnosis. **Anal Chem.**, v. 19, n. 90, p. 11324-11332, 2018.

PRAT, A.; PINEDA, E.; ADAMO, B.; GALVÁN, P.; FERNÁNDEZ, A.; GABA, L.; DÍEZ, M.; VILADOT, M.; ARANCE, A.; MUÑOZ, M. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **The Breast**, v. 24, n. 6, p. 687-774, 2015.

ROBB, D.B.; COVEY, T.R.; BRUINS, A. P. Atmospheric Pressure Photoionization: An Ionization Method for Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 15, n. 72,

p. 3653-3659, 2000.

SCALBERT, A.; BRENNAN, L.; FIEHN, O.; HANKEMEIER, T.; KRISTAL, B. S.; VAN OMMEN, B.; PUJOS-GUILLOT, E.; VERHEIJ, E.; WISHART, D.; WOPEREIS, S. Mass-spectrometry-based metabolomics: Limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. **Metabolomics**, v. 5, n. 4, p. 435–458, 2009.

SHAJAHAN-HAQ, A. N.; CHEEMA M. S.; CLARKE, R. Application of Metabolomics in Drug Resistant Breast Cancer Research. **Metabolites**, v. 5, n. 1, p. 100-118, 2015.

SHEA E. K. H.; KOH V. C. Y.; TAN P. H. Invasive breast cancer: Current perspectives and emerging views. **Pathol. Int.**, v. 5, n. 70, p. 242-252, 2020.

SILVA, C.; PERESTRELO, R.; SILVA, P.; TOMÁS, H.; C MARA J. S. Breast Câncer Metabolomics: From Analytical Platforms to Multivariate Data Analysis. A Review. **Metabolites**, v. 9, n. 102, 2019.

SINGLETARY, S. E.; ALLRED, C.; ASHLEY, P.; BASSETT, L. W.; BERRY, D.; BLAND, K. I.; BORGAN, P. I.; CLARK, G.; EDGE, S. B.; HAYES, D. F.; HUGHES, L. L.; HUTTER, R. V.; MORROW, M.; PAGE, D. L.; RECHT, A.; THERIAULT, R. L.; THOR, A.; WEAVER, D. L.; WIEAND, H. S.; GREENE, F. L. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. **J. Clin. Oncol. Off J. Am. Soc. Clin. Oncol.**, v. 17, n. 20, p. 3628-3636.

SMITH, C. A.; O'MAILLE, G.; WANT, E. J.; QIN, C.; TRAUGER, S. A.; BRANDON, T. R.; CUSTODIO, D. E.; ABAGYAN, R.; SIUZDAK, G. METLIN: a metabolite mass spectral database. **Ther Drug Monit.**, v. 6, n. 27, p. 747-751, 2005.

SØRLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, A. L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001.

SILVA, A. A. R.; CARDOSO, R. C.; REZENDE, L. M.; LIN, J. Q.; GUIMARÃES, F.; SILVA, G. R. P.; MURGU, M.; PRIOLLI, D. G.; EBERLIN, M. M.; TATA, A.; EBERLIN, L. S.; DERCHAIN, S. F. M.; PORCARI, A. M. Multiplatform Investigation of Plasma and Tissue Lipid Signatures of Breast Cancer Using Mass Spectrometry Tools. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 10, n. 21, p. 3611-3628, 2020.

SUN, Y. S.; ZHAO, Z.; YANG, Z. N.; XU, F.; LU, H. J.; ZHU, Z. Y.; SHI, W.; JIANG, J.; YAO, P. P.; ZHU, H. P. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 11, n. 13, p. 1387-1397, 2017.

SZYMAŃSKA, E.; SACCENT, E.; SMILDE, A. K.; WESTERHUIS, J.A. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. **Metabolomics**, v. 8, p. 3-16, 2012.

TATA, A.; GRIBBLE, A.; VENTURA, M.; GANGULY, M.; BLUEMKE, E.; GINSBERG, H.J.; JAFFRAY, D.A.; IFA, D.R.; VITKIN, A.; ZARRINE-AFSAR, A. Wide-field tissue polarimetry allows efficient localized mass spectrometry imaging of biological tissues. **Chem. Sci.**, v. 7, p.2162–2169, 2016.

WANG, Y.; LIU, S.; HU, Y.; LI, P.; WAN, J. Current state of the art of mass spectrometry-based metabolomics studies - a review focusing on wide coverage, high throughput and easy identification. **RSC Advances**, v. 5, n. 96, p. 78728–78737, 2015.

WEI, S.; LIU, L.; ZHANG, J.; BOWERS, J.; GOWDA, G.A.; SEEGER, H.; FEHM, T.; NEUBAUER, H. J.; VOGEL, U.; CLARE, S. E.; RAFTERY, D. Metabolomics Approach for Predicting Response to Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. **Mol. Oncol.**, v. 7, n. 3, p. 297-307, 2013.

WEITZEL, K. Bond-Dissociation Energies of Cations — Pushing the Limits to Quantum State Resolution. **Mass Spectrom. Rev.**, v. 2, n. 30, p. 221–235, 2011.

WISHART, D. S.; TZUR, D.; KNOX, C.; EISNER, R.; GUO, A. C.; YOUNG, N.; CHENG, D.; JEWELL, K.; ARNDT, D.; SAWHNEY, S.; FUNG, C.; NIKOLAI, L.; LEWIS, M.; COUTOULY, M. A.; FORSYTHE, I.; TANG, P.; SHRIVASTAVA, S.; JERONCIC, K.;

STOTHARD, P.; AMEGBEY, G. HMDB: the Human Metabolome Database. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, p. 521-526, 2007.

WOODWARD, W. A.; STROM, E. A.; TUCKER, S. L.; MCNEESE, M. D.; PERKINS, G. H.; SCHECHTER, N. R.; SINGLETARY, S. E.; THERIAULT, R. L.; HORTOBAGYI, G. N.; HUNT, K. K.; BUCHHOLZ, T. A. Changes in the 2003 American Joint Committee on Cancer staging for breast cancer dramatically affect stage-specific survival. **J. Clin. Oncol.**, v. 17, n. 21, p. 3244-3248, 2003.

WOOLMAN, M.; TATA, A.; BLUEMKE, E.; DARA, D.; GINSBERG, H.J.; ZARRINE-AFSAR, A. An Assessment of the Utility of Tissue Smears in Rapid Cancer Profiling with Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry (DESI-MS). **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 28, n.1, p.145–153, 2017.

WU, C.; DILL, A. D.; EBERLIN, L. S.; COOKS, R. G.; IFA, D. R. Mass Spectrometry Imaging under Ambient Conditions. **Mass Spectrom. Rev.**, v. 3, n. 32, p. 218-243, 2013.

ZHANG, J.; FEIDER, C. L.; NAGI, C.; YU, W.; CARTER, S. A.; SULIBURK, J.; CAO, H.; EBERLIN, L. S. Detection of Metastatic Breast and Thyroid Cancer in Lymph Nodes by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 6, n. 28, p.1166-1174, 2017.

ZHANG, Q.; XU, H.; LIU, R.; GAO, P.; YANG, X.; JIN, W. A Novel Strategy for Targeted Lipidomics Based on LC-Tandem-MS Parameters Prediction, Quantification, and Multiple Statistical Data Mining: Evaluation of Lysophosphatidylcholines as Potential Cancer Biomarkers. **Anal. Chem.**, v. 91, n. 5, p. 3389–3396, 2019.

ZHANG, Q.; LIU, R.; XU, H.; YANG, X.; ZHANG, Y.; WANG, Q.; GAO, P.; BI, K.; HAN, T.; LI, Q. Multifunctional isotopic standards based steroidomics strategy: Exploration of cancer screening model. **J. Chromatogr. A**, v.1614, n. 19, 2020.