

**Evaluación del metaboloma sanguíneo como
herramienta para el manejo de pacientes de cáncer
de mama en el contexto neoadyuvante**

TESIS DOCTORAL

Andrea Zapater Moros

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2021

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**Evaluación del metaboloma sanguíneo como
herramienta para el manejo de pacientes de cáncer
de mama en el contexto neoadyuvante**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la graduada en
Biología

ANDREA ZAPATER MOROS

Dirigida por:

Dr. Juan Ángel Fresno Vara

Dr. Angelo Gámez Pozo

*Realizada en el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital
Universitario La Paz-IdiPAZ y Biomedica Molecular Medicine S.L*

*"If I had to do a doctorate right now,
I would do it in metabolomics"*

James Watson

Agradecimientos

A mis directores de tesis, Juanan y Angelo. El camino que en su última etapa ha dado lugar a esta tesis doctoral empezó siete años atrás, y desde entonces, no podría agradeceros más la inestimable guía, ayuda y confianza brindada por parte de ambos. Por todo lo que lucháis por hacer un poco mejor la ciencia.

A Rocío, por enseñarme desde el primer día, por cuidarnos a todos siempre tanto.

A Lucía y Guille, por su inagotable paciencia resolviendo mis dudas y su valiosa ayuda.

A Elena, por hacer agradable estar ahí, por intentar ayudar siempre.

A Marisa, por su imprescindible aportación en forma de código a este proyecto.

A Pilar y el servicio de Oncología del Hospital de La Paz, cuya participación ha sido imprescindible.

A Pedro y su equipo de Jaén, sin cuyo esfuerzo en investigación clínica no podría haberse llevado a cabo este proyecto.

A mis amigas, a todas, por su apoyo, por sus risas, porque están, aunque sea lejos.

A Javi, por ser un ejemplo de esfuerzo constante, por empujar hacia delante.

A mis padres, Gema y José Luis, y a mi hermano, José a quienes dedico esta tesis, por darme siempre más de lo que podían. A Lidia y Malena, por animarlo todo.

A ti lector, porque vas a dar vida durante un tiempo a esta tesis.

Gracias

RESUMEN

Resumen

La posibilidad de acceder al análisis molecular de la sangre de las pacientes de cáncer de mama durante el manejo clínico rutinario abre unas enormes posibilidades para la búsqueda de nuevos marcadores con valor diagnóstico, predictivo y pronóstico en escenarios donde el análisis de la muestra tumoral no es posible, o no está indicado.

El objetivo de esta tesis doctoral ha sido evaluar el potencial de la metabolómica para arrojar información sobre la evolución de las pacientes de cáncer de mama en un contexto de neoadyuvancia. Para ello, se analizaron muestras de plasma recogidas en distintos momentos (al diagnóstico, post-tratamiento y postcirugía), que fueron analizadas mediante metabolómica y análisis computacionales.

Las diferencias en las rutas metabolómicas relacionadas con la respuesta al tratamiento son específicas de subtipo y podrían llegar a establecerse como biomarcadores de respuesta. Se observó además que los cambios en el nivel de ciertos metabolitos a lo largo del tiempo son provocados por el tratamiento, y que estos cambios no son dependientes de la respuesta alcanzada por las pacientes. Finalmente se identificaron dos metabolitos con capacidad de separar a las pacientes con tumores triple negativo en dos grupos, de alto y bajo riesgo, con diferente probabilidad de recaída a distancia a los tres años de la cirugía.

Dichos resultados pueden suponer un pequeño avance en el establecimiento de biomarcadores predictivos de respuesta y pronósticos, tanto para evitar terapias ineficaces que retrasen una cirugía potencialmente curatoria, como para predecir la recaída de estas pacientes años antes de que suceda.

SUMMARY

Summary

Molecular analysis of breast cancer patients' blood during routine clinical management opens enormous possibilities for the search for new markers with diagnostic, predictive, and prognostic value.

This doctoral thesis aimed to evaluate metabolomics potential to provide information on patients' clinical evolution in a neoadjuvant setting. To this end, plasma samples collected at different times (diagnosis, post-treatment, and post-surgery) were analysed using metabolomics and computational analysis.

Some of changes in basal metabolome pathways that can be related with response to treatment are subtype-specific and could become established as predictive biomarkers of treatment response. On the other hand, we found that some changes in metabolite levels over time are treatment-induced and are not dependent on the response achieved by the patients. Finally, two metabolites showed the potential to separate patients with triple-negative breast tumors into two groups with different relapse risk at three years.

These insights may represent a small step forward in the establishment of response predictive and prognosis biomarkers to avoid ineffective therapies, and foreseeing patients' relapse years before it happens.

ÍNDICE

Índice

RESUMEN	1
SUMMARY	5
ÍNDICE	9
ÍNDICE DE TABLAS	12
ÍNDICE DE FIGURAS	13
CLAVE DE ABREVIATURAS.....	19
INTRODUCCIÓN.....	25
CÁNCER DE MAMA	25
INCIDENCIA Y MORTALIDAD.....	25
FACTORES DE RIESGO.....	26
DETECCIÓN Y ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA	29
PATOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA	31
SUBTIPOS MOLECULARES DE CÁNCER DE MAMA	32
FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS DE RESPUESTA A TRATAMIENTO	34
TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA EN NEOADYUVANCIA.....	34
METABOLÓMICA	39
ESTUDIOS PREVIOS DE METABOLÓMICA EN CÁNCER DE MAMA	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
COHORTE.....	53
RECOGIDA DE MUESTRAS.....	54

Índice

EXPERIMENTO METABOLÓMICO.....	54
ANÁLISIS DE LOS DATOS METABOLÓMICOS	57
MODELOS GRÁFICOS PROBABILÍSTICOS (MGP)	57
ANÁLISIS METABO-ONTOLÓGICO	59
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL (SAM)	59
PREDICTORES DE CLASE	60
PREDICTOR DE SUPERVIVENCIA	60
MODELOS LINEALES GENERALIZADOS MIXTOS	61
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	61
RESULTADOS.....	67
COHORTE.....	67
EXPERIMENTO DE METABOLÓMICA	68
ESQUEMA DE UTILIZACIÓN DE MUESTRAS	69
DIFERENCIAS ENTRE SUBTIPOS MOLECULARES.....	70
PREDICCIÓN DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LA COHORTE COMPLETA	73
PREDICCIÓN DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO POR SUBTIPO.....	77
PACIENTES CON TUMORES TNBC.....	77
PACIENTES CON TUMORES HER2+	81
PACIENTES CON TUMORES LUMINALES B.....	85
CONCLUSIONES.....	88
PREDICCIÓN DE RECAÍDA TRAS LA CIRUGÍA	89
MODELOS MIXTOS TEMPORALES.....	91
HEMOGLOBINA, PENTOSAS Y NUCLEÓTIDOS	92
HORMONAS ESTEROIDES, CORTICOSTEROIDES Y ÁCIDOS BILIARES PRIMARIOS.....	92
DISCUSIÓN.....	99
DIFERENCIAS EN EL METABOLOMA ENTRE SUBTIPOS TUMORALES.....	100
PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LA COHORTE COMPLETA	101
PREDICCIÓN DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO POR SUBTIPO.....	102
PACIENTES CON TUMORES TNBC.....	102
PACIENTES CON TUMORES HER2+	103

PACIENTES CON TUMORES LUMINALES B.....	105
PREDICCIÓN DE RECAÍDA TRAS LA CIRUGÍA	107
ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LOS NIVELES DE LOS METABOLITOS	109
RESUMEN DE LOS RESULTADOS MÁS RELEVANTES	110
LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS FUTURAS	111
CONCLUSIÓN GENERAL	113
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	123
ANEXO I. METABOLITOS IDENTIFICADOS	149
ANEXO II. COHORTE COMPLETA.....	165
ANEXO III. PACIENTES CON TUMORES TNBC	169
ANEXO IV. PACIENTES CON TUMORES HER2+	171
ANEXO V. PACIENTES CON TUMORES LUMINALES B.....	172
ANEXO VI. ARTÍCULOS RELACIONADOS	173
ANEXO VI. OTROS ARTÍCULOS.....	175

Índice de tablas

Tabla 1. Sistema de estadificación de los carcinomas de mama	30
Tabla 2. Clasificación por estadios del cáncer de mama teniendo en cuenta el sistema TNM ..	30
Tabla 3. Subtipos moleculares de cáncer de mama y su tratamiento asociado.....	38
Tabla 4. Datos clínicos de las pacientes.....	67
Tabla 5. Desempeño del predictor de clase de la cohorte completa.....	75
Tabla 6. Desempeño del predictor de clase de las pacientes con tumores TNBC.	80
Tabla 7. Desempeño del predictor de clase de las pacientes con tumores HER2+.....	84
Tabla 8. Desempeño del predictor de clase de las pacientes con tumores luminales B.....	87
Tabla 9. Metabolitos que conforman el predictor de recaída.....	90

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de utilización de las muestras recogidas en los distintos puntos temporales en el estudio.....	69
Figura 2. Modelo gráfico probabilístico de la cohorte completa.....	70
Figura 3. Representación del promedio de la cuantificación de los metabolitos según el subtipo molecular de las pacientes	71
Figura 4. Gráfico de los nodos funcionales con actividad diferencial entre subtipos tumorales en la cohorte completa.	71
Figura 5. Detalle de los nodos con una actividad diferencial entre los grupos de respuesta en la cohorte completa.....	73
Figura 6. Gráfico de los nodos funcionales con actividad diferencial entre los grupos de respuesta en la cohorte completa.....	74
Figura 7. Agrupamiento jerárquico de los metabolitos diferenciales identificados mediante SAM en la cohorte completa	74
Figura 8. Gráficos de los metabolitos con una cuantificación diferencial entre los grupos de respuesta identificados mediante SAM en la cohorte completa.....	75
Figura 9. Modelo gráfico probabilístico de las pacientes con tumores TNBC.....	77
Figura 10. Detalle del nodo con una actividad funcional diferencial entre los grupos de respuesta de las pacientes con tumores TNBC.....	78
Figura 11. Gráfico del nodo con actividad diferencial entre los grupos de respuesta de las pacientes con tumores TNBC.....	78
Figura 12. Agrupamiento jerárquico de los metabolitos diferenciales identificados mediante el análisis SAM en las pacientes con tumores TNBC.....	79
Figura 13. Gráficos de los metabolitos diferenciales identificados mediante el análisis SAM en las pacientes con tumores TNBC.....	79
Figura 14. Modelo gráfico probabilístico de las pacientes con tumores HER2+.....	81
Figura 15. Detalle de los nodos con actividad diferencial entre los grupos de respuesta de las pacientes con tumores HER2+.....	82
Figura 16. Gráfico de los nodos funcionales con actividad diferencial entre los grupos de respuesta de las pacientes con tumores HER2+.....	82
Figura 17. Agrupamiento jerárquico de los metabolitos diferenciales identificados mediante SAM en las pacientes con tumores HER2+.....	83

Índice de figuras

Figura 19. Modelo gráfico probabilístico de las pacientes con tumores luminales B.....	85
Figura 20. Detalle de los nodos con actividad diferencial entre los grupos de respuesta de las pacientes con tumores con luminales B.....	86
Figura 21. Gráfico del nodo con actividad diferencial y de los dos grupos de metabolitos diferenciales entre los grupos de respuesta de las pacientes con tumores luminales B	86
Figura 22. Agrupamiento jerárquico de los metabolitos diferenciales identificados mediante SAM en las pacientes con tumores luminales B.	87
Figura 25. Gráfico <i>Kaplan Meier</i> de las pacientes con tumores TNBC en base los grupos de riesgo de recaída.....	90
Figura 26. Interpretación gráfica de la tendencia temporal de los metabolitos relacionados con el metabolismo de aminoácidos y poliaminas	92
Figura 27. Interpretación gráfica de la tendencia temporal de los metabolitos relacionados con el metabolismo de hemoglobina, pentosas y nucleótidos.....	92
Figura 28. Interpretación gráfica de la tendencia temporal de los metabolitos relacionados con el metabolismo de hormonas esteroides, corticosteroides y ácidos biliares primarios.	93
Figura 29. Interpretación gráfica de la tendencia temporal de los metabolitos relacionados con el metabolismo de carnitinas y acilcarnitinas.....	93
Figura 30. Interpretación gráfica de la tendencia temporal de los metabolitos relacionados con el metabolismo de ácidos grasos.....	94
Figura 31. Interpretación gráfica de la tendencia temporal de los metabolitos relacionados con el metabolismo de fosfolípidos	94

CLAVE DE ABREVIATURAS

Clave de abreviaturas

(RP)/UPLC-MS/MS: cromatografía líquida de ultra alta resolución en fase reversa acoplada a espectrometría de masas en tándem, del inglés *Reverse Phase / Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass spectrometry*.

ACGL: ácidos grasos de cadena larga.

AJCC: del inglés American Joint Committee on Cancer.

AUC: área bajo la curva, del inglés *Area Under Curve*.

BCAAs: aminoácidos de cadena ramificada, del inglés *Branched Chain Aminoacids*.

BIC: criterio de información bayesiana, del inglés *Bayesian Information Criterion*.

BI-RADS: del inglés The Breast Imaging Reporting and Data System.

CPT1: Carnitina palmitoyltransferasa I, del inglés *Carnitine palmitoyltransferase I*.

DAG: diacilglicerol.

DCIS: carcinoma ductal in situ, del inglés Ductal Carcinoma in situ.

DMFS: supervivencia libre de metástasis, del inglés *distant metastasis-free survival*.

EC: Epirubicina + ciclofosfamida.

EMM: medias marginales estimadas, del inglés *Estimated Marginal Means*.

ER: receptor de estrógenos, del inglés *Estrogen Receptor*.

ESI: ionización por electrospray, del inglés *Electrospray Ionization*.

FA: ácido fórmico, del inglés *Formic acid*.

FDR: tasa de falsos descubrimientos, del inglés *False Discovery Rate*.

GC: cromatografía de gases, del inglés *Gas Chromatography*.

HCL: agrupamiento jerárquico, del inglés *Hierarchical Cluster*.

Clave de abreviaturas

HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, del inglés *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*.

HILIC/UPLC-MS/MS: cromatografía de interacción hidrofílica/cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem, del inglés *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography / Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass spectrometry*.

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*.

HRMS: espectrometría de masas de alta resolución, del inglés *High-Resolution Mass Spectrometry*.

IHQ: inmunohistoquímica.

IMC: índice de masa corporal.

LC: cromatografía líquida, del inglés *Liquid Chromatography*.

LCIS: carcinoma lobular *in situ*.

LC-MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, del inglés *Liquid Chromatography - Mass spectrometry*.

LIMS: del inglés *Laboratory Information Management System*.

LOOCV: validación cruzada dejando uno fuera, del inglés, *Leave-One Out Cross-Validation*.

m/z: Relación masa / carga.

MGP: modelos gráficos probabilísticos.

MS: espectrometría de masas, del inglés *Mass Spectrometry*.

MTRX: replicados técnicos creados desde una larga reserva de plasma humano ampliamente caracterizado.

NET: terapia endocrina neoadyuvante, del inglés *Neoadjuvant endocrine therapy*.

NMR: resonancia magnética nuclear, del inglés *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*.

PD-L1: ligando 1 de muerte programada, del inglés *Programmed death-ligand 1*.

PFFA: ácido perfluoropentanoico, del inglés *perfluoropentanoic acid*.

PGC1- α : coactivador del receptor activado por proliferadores peroxisomales, del inglés *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator*.

PR: receptor de progesterona, del inglés *Progesterone receptor*.

QC: control de calidad, del inglés *Quality Control*.

RC: respuesta completa patológica.

RP: respuesta parcial.

RH +: receptores hormonales positivos.

RH -: receptores hormonales negativos.

RSD: desviación estándar relativa, del inglés *Relative Standard Deviation*.

SAM: análisis de expresión diferencial, del inglés *Significant Analysis of Microarray*.

SRM: monitorización de reacciones únicas, del inglés *Single reaction monitoring*.

TILs: linfocitos infiltrantes de tumor, del inglés *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*.

TNBC: cáncer de mama triple negativo, del inglés *Triple Negative Breast Cancer*.

UICC: Unión Internacional Contra Cáncer.

UPCL: cromatografía líquida de ultra alta resolución, del inglés *Ultra Performance Liquid Chromatography*.

INTRODUCCIÓN

Introducción

Cáncer de mama

Actualmente, el cáncer mama supone 1 de cada 4 nuevos casos diagnosticados y 1 de cada 6 muertes asociadas al cáncer a nivel mundial¹. No es una única enfermedad, sino que comprende varias entidades con distintas características patológicas e implicaciones clínicas. La evidencia acumulada sugiere que tumores de mama con diferentes características histopatológicas y biológicas exhiben diferente comportamiento y diferente respuesta al tratamiento, por lo que se deben abordar distintas estrategias terapéuticas. Por tanto, una correcta y precisa agrupación de los tumores en subtipos clínicamente relevantes tiene una gran importancia para la toma de decisiones clínicas².

Incidencia y mortalidad

El cáncer de mama es ya el más diagnosticado y la principal causa de muerte asociada en mujeres. En 2020 alcanzó las cifras de 2,3 millones de nuevos casos (11,7 %) y supuso la quinta causa de muerte asociada al cáncer, contando con 685.000 (6,9 %) nuevas muertes a nivel mundial. En Europa en 2020 se detectaron 531.086 nuevos casos diagnosticados y 141.765 muertes asociadas y en España, las cifras alcanzan los 34.088 nuevos casos y las 6.606 muertes asociadas¹.

Las altas tasas de incidencia en los países más desarrollados reflejan una mayor y duradera prevalencia de factores de riesgo reproductivos y hormonales (edad temprana de menarquia, edad tardía de menopausia, edad avanzada en el primer embarazo, menor número de hijos, menor amamantamiento, terapia hormonal en la menopausia y anticonceptivos orales) y factores de riesgo asociados al estilo de vida (ingesta de alcohol, sobrepeso, inactividad física), así como una mayor detección por mamografías³. El cribado mamográfico, sin embargo, tiene ciertas limitaciones, tales como el sobrediagnóstico y el sobretratamiento^{4,5}. Hoy en día, existe la oportunidad de mejorar el coste-beneficio y la relación beneficio-daño mediante la adopción de estrategias de cribado basadas en la estratificación del riesgo de las pacientes y mediante los mo-

Introducción

delos de predicción de riesgos en evolución^{6,7}, existiendo ya ensayos clínicos en curso enfocados a evaluar la aceptabilidad y utilidad clínica de los programas de detección basados en la estratificación del riesgo en la población en general⁸. El ligero aumento en las tasas de incidencia (aproximadamente un 0,3 % por año) desde 2004 han sido atribuidas, al menos en parte, a la disminución de la tasa de fertilidad, así como a un aumento de la obesidad⁹.

Las tasas de incidencia son un 88 % superiores en países con economías de libre mercado que en países que están en proceso de transición de economías planificadas a economías de libre mercado (55,9 y 29,7 por 100.000 respectivamente). Las mayores tasas de incidencia (más del 80 por 100.000) se encuentran en Australia/Nueva Zelanda, Europa oriental (Bélgica tiene la mayor tasa de incidencia a nivel global), Norte América y el norte de Europa. Las menores tasas (menos de 40 por 100.000) se encuentran en Centro América, África oriental y media y Asia central meridional. Sin embargo, las mujeres que viven en países en proceso de transición tienen tasas de mortalidad un 17 % superiores a las mujeres en países de economía de libre mercado (15 y 12,8 por 100.000 respectivamente) encontrándose las mayores tasas de mortalidad en Melanesia, África oriental, Micronesia, Polinesia y el Caribe, donde Barbados presenta la mayor tasa de mortalidad a nivel mundial¹.

Factores de riesgo

Se han establecido una gran serie de factores de riesgo para el cáncer de mama en base a los estudios epidemiológicos realizados hasta la fecha. Dichos factores de riesgo incluyen factores no modificables como la raza, la etnia, la edad y la genética, así como factores modificables como son la dieta, la inactividad física, las hormonas exógenas y ciertos factores reproductivos femeninos.

Factores demográficos

La edad es el factor de riesgo más importante relacionado con el cáncer de mama en las mujeres, duplicándose con cada década cumplida hasta los 80 años. La incidencia se va incrementando con la edad, siendo mayor a partir de la menopausia¹⁰. El cáncer de mama en mujeres es 100 veces más frecuente que en los hombres¹¹.

Factores genéticos

Con respecto a los factores genéticos, se han asociado mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* a una predisposición de sufrir cáncer de mama y de ovario, entre otros. Ambos genes se expresan en estos tejidos y juegan un papel clave en la reparación de las roturas de doble cadena del ADN en el núcleo celular. La mutación en *BRCA1* y *BRCA2* supone entre el 15 y el 20 % de los tumores de mama hereditarios¹² que representan el 5-10 % del total. Mutaciones en otros genes como *TP53*, *PTEN*, *STK11* y *CDH1* también han sido asociadas con un incremento del riesgo de padecer la enfermedad. Además, se han identificado más de trescientas variantes genéticas comunes asociadas con una ligera elevación del riesgo de cáncer de mama¹³.

Historial familiar

Las mujeres (y hombres) con historial familiar de cáncer de mama, especialmente con parentesco en primer grado, tienen un riesgo 1,5 veces mayor de desarrollar cáncer si existe un caso en su familia y de 2-4 veces mayor si existe más de un caso familiar directo. El riesgo se incrementa si el familiar afectado fue diagnosticado a temprana edad, si tuvo enfermedad bilateral o si el familiar fue un hombre¹⁴.

Factores reproductivos femeninos

Entre los factores reproductivos femeninos de riesgo se encuentran: una edad temprana de menarquia, una edad tardía de menopausia, una edad avanzada en el primer embarazo, un menor número de hijos, menor amamantamiento, exposición a terapia hormonal en la menopausia y toma de anticonceptivos orales³. Estos factores aumentan la exposición de hormonas al tejido mamario durante toda la vida, aumentando el riesgo de padecer cáncer de mama. Los altos niveles de hormonas pueden aumentar el riesgo de padecer cáncer de mama debido a un incremento en la división celular y, por tanto, un incremento tanto en la probabilidad de daño en el ADN, como en el crecimiento tumoral¹⁵.

Enfermedad benigna de la mama

La enfermedad benigna de la mama (hiperplasia epitelial atípica severa, papilomas ductales, etc.) se divide en lesiones no proliferativas y lesiones proliferativas, con o sin atipia¹⁰. Las lesiones proliferativas con atipia y sin ella están asociada a un incremento significativo (de 4 y 1,5-2 veces respectivamente) del riesgo de cáncer de mama¹⁶.

Densidad mamaria

La densidad del tejido mamario es un indicador de la cantidad de tejido glandular y conectivo en relación con el tejido graso medido durante una mamografía. El sistema BI-RADS (*The Breast Imaging Reporting and Data System*) clasifica la densidad mamaria en cuatro categorías: A (predominio graso, con menos del 25 % de tejido glandular), B (densidad media con densidades parcheadas de tejido glandular: 25-50 %), C (heterogéneamente densa con predominio de tejido glandular, entre 51-75 %) y D (extremadamente denso con un tejido glandular mayor del 75 %). Las mujeres con mamas más densas (C o D) tienen un riesgo 1,5 o 2 veces mayor que aquellas con una densidad media (B)¹⁷.

Estilo de vida

El sobrepeso y la obesidad en mujeres postmenopáusicas están asociados a un incremento del riesgo de cáncer de mama de 1,5 a 2 veces superior además de conferir un peor pronóstico a las pacientes¹⁸. Incluso dentro de un rango de IMC normal, mayores niveles de grasa corporal están asociados a un mayor riesgo de padecer cáncer después de la menopausia¹⁹. Esto puede deberse a la elevación de los niveles de estrógenos, ya que el tejido graso es la mayor fuente de estrógenos en las mujeres postmenopáusicas, y a otros mecanismos, como mayores niveles de insulina. La ganancia de peso también incrementa el riesgo de cáncer de mama^{20,21}. Sin embargo, el consumo de grasa no se asocia a un incremento en el riesgo²². El efecto de la dieta sobre el riesgo de cáncer de mama es un área activa de investigación, con especial foco en el tiempo de exposición, en diferentes componentes específicos de la dieta y en las diferencias en el riesgo en base al estatus de los receptores hormonales del tumor. Numerosos estudios confirman que el consumo de alcohol incrementa el riesgo de cáncer de ma-

ma un 7-10 % por cada 10 gramos de alcohol consumido de media al día²³. El consumo de tabaco también incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama, especialmente a largo plazo²⁴. La inactividad física aumenta entre el 10 y el 20 % el riesgo de cáncer de mama²⁵, siendo el ejercicio físico un factor protector debido a los efectos que produce en la inflamación sistémica, en los niveles hormonales y en el balance energético²⁶.

Detección y estadificación del cáncer de mama

El cáncer de mama generalmente se detecta mediante mamografía o ecografía mamaria antes de que se desarrollen los síntomas o después de que una mujer note un bulto. La mayoría de los eventos suelen ser benignos (no cancerosos). Cuando se sospecha de cáncer, el tejido para el análisis microscópico generalmente se obtiene de una biopsia con aguja (con aguja fina o gruesa) y, con menos frecuencia, a partir de una biopsia quirúrgica.

El sistema TNM es el método de estadificación de neoplasias desarrollado por la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) en colaboración con la UICC (Unión Internacional Contra Cáncer), siendo actualmente el estándar recomendado por las principales comisiones de expertos y por los institutos especializados en cáncer en gran parte del mundo occidental desarrollado. La clasificación del cáncer de mama mediante el sistema TNM divide la enfermedad en varios estadios en función del tamaño del tumor primario (T), del estado ganglionar (N) y de la diseminación de la enfermedad (M)²⁷. El sistema AJCC fue actualizado para añadir grupos de estadios pronósticos incluyendo información sobre la presencia de receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP), niveles del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y/o copias adicionales del gen *HER2* (HER2+/HER2-), y el grado (que refleja lo mucho que se parece el aspecto microscópico del cáncer al tejido mamario normal)²⁸.

Tumor primario (T) (misma clasificación clínica y anatomopatológica)	
T1: hasta 2 cm	
T1microinvasivo (T1mic): < 0,1 cm	
T1a: >0,1 a 0,5 cm	
T1b: >0,5 a 1 cm	
T1c: >1 a 2 cm	
T2: >2 a 5 cm	
T3: > 5 cm	
T4: extensión a pared torácica o piel	
T4a: extensión a pared torácica	
T4b: edema (incluyendo “piel de naranja”) o ulceración de la piel, o nódulos satélites en la piel de la misma mama	
T4c: ambos (T4a + T4b)	
T4d: carcinoma inflamatorio	
Ganglios linfáticos regionales (N) (clasificación anatomopatológica)	
pN0: ausencia de metástasis ganglionares	
pN1mi: micrometástasis (< 2 mm)	
pN1: metástasis en 1-3 ganglios axilares, y/o ganglios mamarios internos con metástasis microscópicas	
pN2: metástasis en 4-9 ganglios axilares, o en ganglios mamarios internos clínicamente aparentes en ausencia de metástasis axilares	
pN3: metástasis en 10 o más ganglios axilares, o en ganglios infraclaviculares, o en ganglios mamarios internos en presencia de metástasis axilares, o en ganglios supraclaviculares	
Afectación metastática a distancia (M)	
M0: no hay evidencia de metástasis a distancia	
M1: metástasis a distancia	

Tabla 1. Sistema de estadificación de los carcinomas de mama.

Dependiendo de la valoración histopatológica obtenida mediante el sistema TNM, las lesiones mamarias malignas se pueden clasificar en distintos estadios (Tabla 2).

ESTADIO I	T1N0M0	ESTADIO IIIA	T0-2N2M0 T3N1-2M0
ESTADIO IIA	T0-1N1M0 T2N0M0	ESTADIO IIIB	T4N0-2M0
ESTADIO IIB	T2N1M0 T3N0M0	ESTADIO IIIC	T0-4N3M0
		ESTADIO IV	T0-4N0-3M1

Tabla 2. Clasificación por estadios del cáncer de mama teniendo en cuenta el sistema TNM.

Patología del cáncer de mama

La mayoría de los tumores de cáncer de mama (95 %) son carcinomas, es decir, provienen de elementos epiteliales, y se pueden dividir en 2 grupos principales: *in situ* e invasivos. Los tumores *in situ* permanecen dentro de los conductos lácteos o lobulillos de la mama, y no invaden ni se multiplican en tejidos sanos. Los dos grupos principales son el carcinoma ductal *in situ* (DCIS) y el carcinoma lobular *in situ* (LCIS). LCIS está considerado como una lesión benigna asociada al incremento del riesgo de padecer cáncer de mama, pero sin el potencial de progresión a un tumor invasivo y por lo que ha sido eliminado de la última estadificación del sistema de la AJCC²⁹. Los carcinomas DCIS son precursores de tumores invasivos, aunque no todos los DCIS progresan. Durante el periodo 2012-2016, los carcinomas ductales *in situ* representaron el 16 % de todos los tumores de mama diagnosticados³⁰. Sin embargo, la mayor parte de los carcinomas (81 %) son tumores invasivos que invaden y se multiplican en otros tejidos atravesando la membrana basal subyacente. Por otro lado, si se da la existencia de más de un tumor en la mama, los tumores pueden ser multifocales si los tumores se generan a partir de un único tumor original o multicéntricos si los tumores presentan varios orígenes¹⁰.

Subtipos histológicos

La histología se basa en el tamaño, la forma y la disposición de las células del cáncer de mama. En la actualidad, más del 75 % de los cánceres de mama invasivos se clasifican histológicamente como "sin tipo especial", históricamente denominados carcinomas "ductales". El subtipo histológico especial más común es el carcinoma lobular invasivo, que representa aproximadamente el 15 % de los cánceres de mama invasivos. El carcinoma tubular, mucinoso, cribiforme y papilar son subtipos raros de cáncer de mama que generalmente se asocian a un pronóstico favorable³¹. El cáncer de mama inflamatorio es un tipo de cáncer de mama poco frecuente pero agresivo, que se caracteriza por la hinchazón y el enrojecimiento de la piel de la mama.

Subtipos moleculares de cáncer de mama

Para el manejo clínico de las pacientes, los tumores se clasifican mediante la determinación inmunohistoquímica del estatus del receptor de estrógenos (*ESR1*), del receptor de progesterona (*PGR*) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (*ERBB2*), denominados ER, PR y HER2 respectivamente. En función de estos biomarcadores se establecen tres subtipos de los que dependen las opciones actuales de tratamiento: receptores hormonales positivos (ER+ y/o PR+), HER2+ y triples negativos (TNBC). El análisis de la expresión génica en el cáncer de mama basada en *microarrays* ha permitido la identificación de subtipos moleculares con relevancia clínica y ha proporcionado información sobre la heterogeneidad molecular de esta enfermedad. A pesar de las diversas categorizaciones existentes, los tumores de mama se clasifican en tres clases principales: luminales A y B (receptores hormonales positivos), HER2 positivos y triple negativos, donde los triple negativos son los tumores más heterogéneos y comprenden a la mayoría del subtipo basal².

Tumores triple negativo (TNBCs)

El subtipo de cáncer de mama triple negativo (TNBCs, por sus siglas en inglés *triple negative breast cancer*) es un grupo heterogéneo de tumores caracterizados por la falta de expresión de receptores ER, PR y HER2. Estas características hacen que este grupo de tumores no responda a terapias endocrinas o al tratamiento dirigido a HER2. Los tumores TNBC constituyen alrededor del 15 % de todos los tumores de mama invasivos y poseen la mayor tasa de metástasis y la peor supervivencia global de todos los subtipos^{32,33}. Estos tumores están también caracterizados por un comportamiento agresivo con tendencia a una recaída temprana y metastatizar a los pulmones, hígado y el sistema nervioso central, así como por una peor supervivencia³⁴. Las tasas de recaída son altas durante los primeros años tras la cirugía, con un pico de riesgo a los 3 años y tras el cual el riesgo decrece. Este subtipo tumoral tiene el doble de prevalencia en mujeres negras en comparación con mujeres blancas, siendo también más frecuente en mujeres premenopáusicas y en aquellas con mutaciones en el gen *BRCA1*³⁵.

Tumores TN-like

Nuestro grupo ha descrito un nuevo subtipo dentro de los ER+. Estos tumores, a los que se les denominó *TN-like*, presentan un perfil de expresión proteico y una prognosis similar a los tumores TNBC. Los tumores *TN-like* presentan claras diferencias a nivel de metabolismo con aquellos tumores que mantienen características clínicas y moleculares de ER+ (denominados *ER-true*)³⁶.

Tumores HER2+

Los tumores HER2+ se caracterizan por una sobreexpresión de *HER2*, así como de otros genes como *GRB7* y *PGAP3* y entre el 40 y el 80 % tienen una mutación en *TP53*. Suponen un 15-20 % de todos los tumores de cáncer de mama y suelen ser de grado 3, con metástasis a los nodos linfáticos³⁷. *HER2* pertenece a una familia de receptores de tirosina quinasa con cuatro miembros. Cuando se activan, las proteínas HER se homodimerizan o heterodimerizan activando cascadas de señalización celular que incluyen las vías PI3K-AKT y RAS-MAPK (ERK), que regulan la proliferación y supervivencia celular, así como la metástasis de las células tumorales^{38,39}.

Tumores Luminales

Los tumores luminales constituyen el subtipo más común, representando el 70 % de los tumores⁴⁰. Estos expresan receptores hormonales positivos (receptor de estrógenos y/o receptor de progesterona) con un perfil de expresión que recuerda al componente epitelial luminal de la mama. Esos perfiles incluyen la expresión de citoqueratinas luminales 8/18, el receptor de estrógenos (ER) y genes asociados a él, como *LIV1* y *CCD1*^{41,42}. Los tumores luminales se clasifican en tumores luminales A y luminales B, siendo los tumores luminales A la mayoría. Los tumores luminales A tienen una mayor expresión de genes relacionados con el receptor de estrógenos y una menor expresión de genes proliferativos. Los tumores luminales B tienden a ser de mayor grado que los tumores luminales A y ser de peor pronóstico^{43,44}. Más del 50 % de los tumores de mama receptores positivo recaen entre 5 y 10 años tras la cirugía, y en el largo plazo, se producen más recaídas en los tumores ER positivo de alto grado en comparación con los TNBCs.

Factores pronósticos y predictivos de respuesta a tratamiento

Los factores predictivos de respuesta pueden aportar información sobre la posibilidad de respuesta frente a un determinado tratamiento. Por el momento, los únicos marcadores predictivos bien establecidos en cáncer de mama precoz son la expresión del receptor de estrógenos (se asocia a respuesta a terapia hormonal) y la sobreexpresión de *HER2* (se asocia a beneficio de terapias anti-*HER2*). Algunos test genómicos (especialmente Oncotype®) pueden tener utilidad para evaluar el beneficio del tratamiento neoadyuvante en tumores con receptores hormonales positivos *HER2* negativos^{45,46,47,48}.

Por otra parte, los factores pronósticos tienen un importante valor a la hora de identificar a aquellas pacientes que presentan mayor riesgo de recaída tumoral y, por tanto, van a beneficiarse de un tratamiento adyuvante tras la cirugía. Son generalmente marcadores de proliferación, invasión y potencial de diseminación (afectación ganglionar, tamaño tumoral, tipo histológico, grado histológico, invasión vascular y linfática, edad, marcadores de proliferación, expresión de receptores hormonales, sobreexpresión de *HER2*). Actualmente existen ciertas firmas de expresión génica utilizadas con el fin de identificar pacientes con enfermedad localizada que presenten un bajo riesgo de recaída a distancia y en las que se podría evitar administrar quimioterapia adyuvante. Las firmas moleculares más utilizadas actualmente son MammaPrint®, OncotypeDX®, Prosigna™/PAM 50, Endopredict®, Breast Cancer Index (BCI)⁴⁵.

Tratamiento del cáncer de mama en neoadyuvancia

El tratamiento del cáncer de mama abarca tratamientos locales y tratamientos sistémicos. Dentro de los tratamientos locales se encuentra la cirugía y la radioterapia. La cirugía puede ser una tumorectomía para extirpar la tumoración mamaria o una mastectomía para extirpar toda o parte de la mama y estructuras cercanas. En la enfermedad localizada la cirugía puede ser conservadora o radical (mastectomía) asociada a la realización de una biopsia selectiva del ganglio centinela y/o linfadenectomía axilar. Esta puede realizarse antes o después de un tratamiento sistémico⁴⁹. La radioterapia está indicada tras la realización de la cirugía como tratamiento complementario si se

cumplen una serie de criterios clínico-patológicos y como tratamiento paliativo en la enfermedad metastásica⁵⁰. Los tratamientos sistémicos comprenden la quimioterapia, la hormonoterapia y las terapias biológicas. La elección de estos tratamientos se realiza dependiendo de si la enfermedad es loco-regional, es decir limitada a la mama y/o ganglios linfáticos regionales, o es una enfermedad metastásica. El tratamiento sistémico se decide teniendo en cuenta determinados factores como el riesgo individual de recaída y la sensibilidad a un tratamiento específico. Para la selección del tratamiento se tienen en cuenta las características clínicas clásicas (el estadio, la edad, el estado menstrual), la biología tumoral (expresión de los receptores hormonales y HER2), el grado y la expresión de Ki67 y el subtipo molecular. En la toma de decisión también se valoran las comorbilidades de la paciente, la toxicidad del tratamiento, la expectativa de vida y las preferencias de la paciente^{51,52}.

El tratamiento neoadyuvante hace referencia al tratamiento oncológico sistémico que se administra previo a la cirugía mamaria y que presenta varias ventajas⁵³. Permite aumentar las posibilidades de conservación de la mama (conversión de mastectomías en cirugías conservadoras) y de la axila⁵⁴. Permite cuantificar la quimio-sensibilidad del tumor midiendo la respuesta durante el tratamiento^{54,55}, abriendo la puerta a la posibilidad de individualizar el tratamiento adyuvante en base al resultado del tratamiento neoadyuvante. Por otra parte, permite tratar las posibles micrometástasis de una manera precoz.

La erradicación de la enfermedad en la mama y en los ganglios linfáticos axilares en el momento de la cirugía debido a la terapia neoadyuvante se conoce como respuesta patológica completa (RC)⁵⁶. En base a la asociación entre la respuesta completa patológica con la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global⁵⁷, y a las ventajas antes mencionadas, el tratamiento neoadyuvante es la opción terapéutica estándar para los tumores de mama operables. La neoadyuvancia ha ganado popularidad como un escenario ideal en el que investigar el pronóstico de las pacientes y diferentes biomarcadores predictivos de la respuesta a los tratamientos³⁸. La evaluación de la respuesta patológica al tratamiento neoadyuvante incluye la evaluación mediante ecografía e imagen de resonancia magnética junto los parámetros habituales

Introducción

de estadificación evaluados tras la resección quirúrgica definitiva, como el tamaño del tumor residual, la profundidad de la invasión y el estado de los ganglios. También puede incluir otros factores que no influyen en el estadio, como el estado de los márgenes, la presencia de invasión linfovascular, el volumen del tumor residual/carga tumoral y varios sistemas de puntuación para la respuesta parcial (RP) y la respuesta completa (RC)⁵⁸. La respuesta patológica completa ha sido adoptada como un marcador subrogado de buen pronóstico por su eficacia para acelerar la aprobación regulatoria de nuevos tratamientos por la FDA y la EMA^{38,55}.

La terapia endocrina neoadyuvante (NET) es todavía una herramienta poco utilizada para los tumores ER+, y es normalmente relegada al tratamiento de pacientes frágiles o de avanzada edad que no son candidatas para quimioterapia⁴⁵. Generalmente el tratamiento del cáncer de mama infiltrante luminal HER2 negativo consiste en hormonoterapia asociada o no a quimioterapia. En mujeres premenopáusicas la elección es tamoxifeno durante un período de cinco años mientras que en mujeres posmenopáusicas se emplean inhibidores de la aromatasa como el letrozol y el anastrozol^{59,60,61}. Sin embargo, existe evidencia de que la hormonoterapia es una opción segura para mujeres premenopáusicas con tumores ER+ tempranos⁶² y puede ser considerada una alternativa de tratamiento^{63,64}, que podría beneficiar a los tumores luminales A⁴⁵. Los tumores B, que son más proliferativos, se benefician de una terapia combinando la quimioterapia con el tratamiento hormonal².

Para los tumores triple negativos el tratamiento sistémico es la quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos, tanto en la enfermedad localizada (en neoadyuvancia y adyuvancia) como en la enfermedad metastásica. El tratamiento suele contener una antraciclina (adriamicina o epirubicina) en combinación o secuencialmente administrada con taxanos (paclitaxel o docetaxel). Los regímenes basados en antraciclinas también suelen incluir ciclofosfamida con o sin fluoropirimidinas, como la 5-deoxifluridina, para aumentar la citotoxicidad¹⁰. Se está explorando la posibilidad de evitar la toxicidad asociada al tratamiento con antraciclinas usando un esquema de tratamiento combinando carboplatino y docetaxel. En un ensayo clínico realizado se obtuvieron resultados prometedores (tasa de RC superior al 50 %) en 190 pacientes

con tumores triple negativo en estadios tempranos⁶⁵. La terapia con antraciclinas o antraciclinas y taxanos en TNBCs alcanzan tasas de hasta 20-45 % de respuesta patológica completa (RC) y esos pacientes tienen una mejor prognosis con respecto a las pacientes con tumores no TNBCs que alcanzan una RC⁶⁶. La molécula ligando 1 de muerte programada (PD-L1) está sobre expresada en el 20 % de los tumores triple negativo y por tanto podría llegar a ser una diana terapéutica para este tipo de tumores. Junto con la expresión de PD-L1, otras mutaciones y mayores niveles de linfocitos infiltrantes (TILs), hacen a este subtipo un buen candidato para la inmunoterapia debido a su mayor inmunogenicidad. En varios ensayos clínicos de inmunoterapia con diana en PD-L1 se han observado mayores tasas de respuestas patológicas completas al sumar la inmunoterapia (pembrolizumab y atezolizumab) a la quimioterapia neoadyuvante^{67,68}. Recientemente, la FDA ha aprobado la terapia basada en pembrolizumab en combinación con quimioterapia neoadyuvante para pacientes TNBC de alto riesgo y estadio temprano, continuando el tratamiento adyuvante con pembrolizumab como agente único tras la cirugía.

En los tumores con expresión o amplificación de HER2 (Luminales B o HER2+) el tratamiento sistémico con quimioterapia debe incluir además tratamiento con anticuerpos anti-HER2: trastuzumab y/o pertuzumab dependiendo si el tratamiento se realiza previo a la cirugía (neoadyuvancia)⁶⁹, tras la cirugía (adyuvancia)⁷⁰ o en enfermedad metastásica⁷¹. La incorporación del trastuzumab en el tratamiento neoadyuvante ha resultado en una mayor RC y una mejor supervivencia para las pacientes⁷². Además, los resultados sugieren que el trastuzumab sería más efectivo cuando se administra previo a la operación en comparación con su posterior administración. En el pasado, era el subtipo con que presentaba el peor pronóstico⁷³, sin embargo, el amplio uso de la terapia dirigida⁷⁴, como el trastuzumab (Herceptin®), un anticuerpo monoclonal contra la porción extracelular de HER2, revolucionó el tratamiento de este tipo de cáncer de mama, mejorado sustancialmente el pronóstico de estas pacientes⁷⁵. La pérdida de *PTEN* así como la sobreexpresión de *CXCR4* han sido relacionados con la resistencia a trastuzumab, lo que proporciona dianas para estrategias combinadas de tratamiento². Los resultados del análisis de los “*Collaborative Trials in Neoajuvant*

Introducción

Breast Cancer” (CTNeoBC) han confirmado que las mujeres con tumores HER2+ que alcanzan una respuesta completa patológica tiene una mejor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global que aquellas con enfermedad residual después de la cirugía^{38,45, 76}.

Subtipo	Características IHQ	Tratamiento
Luminales A	ER positivos, PR positivos >20%, HER2 negativo y Ki67 bajo	Hormonoterapia
Luminales B	ER positivos, PR <20%, HER2 positivo o negativo y Ki67 alto	Hormonoterapia + Quimioterapia
HER2+	HER2 positivo y ER/PR negativos	Quimioterapia + fármacos anti-HER2
Triple negativo	ER negativo, PR negativo y HER2 negativo	Quimioterapia

Tabla 3. Subtipos moleculares de cáncer de mama y su tratamiento asociado.

En general, la eficacia de la terapia neoadyuvante difiere ampliamente entre los subtipos de tumores de cáncer de mama. El estatus de los receptores hormonales positivos (RH+) de las pacientes y el estatus de HER2+ tienen una profunda influencia en las tasas de RC y de supervivencia, encontrándose mayores tasas de RC en los tumores receptores hormonales negativos (RH-) que en los tumores receptores hormonales positivos (RH+)⁷⁷. Las tasas de RC más bajas se encontraron entre las pacientes con tumores de tipo luminal A (6,4 %), tasas algo más altas en los tumores de tipo luminales B (11 %-22 %), y se observaron tasas máximas de RC en los grupos de pacientes con tumores HER2+ y TNBCs (27 %-32 %). Las pacientes con tumores de tipo luminales B, HER2+ y TNBC, que alcanzaron una RC tuvieron una supervivencia global significativamente mayor en comparación con otros subtipos, resultado observado en otros meta-análisis^{76,78}. La respuesta patológica completa es una medida validada del pronóstico a largo plazo en los estudios de quimioterapia neoadyuvante (NTC), realizados principalmente en los subtipos tumorales más agresivos, como los triple negativos y los HER2+. Sin embargo, las tasas de respuestas completas en los tumores ER+ son muy bajas, tanto en los regímenes de quimioterapia neoadyuvante como de terapia endocrina neoadyuvante, aunque en este último caso, las bajas tasas de RC no impactan tanto en la supervivencia como lo hacen en los tumores no luminales⁷⁶. Por tanto, la RC no es un indicador óptico del pronóstico en la terapia endocrina y deben ser validados otros marcadores, como Ki67, marcador subrogado de proliferación celular⁷⁹.

Se necesita un enfoque de biología de sistemas junto a la aplicación de las nuevas tecnologías moleculares de alto rendimiento para cumplir eficazmente la promesa de la medicina molecular personalizada, así como nuevos diseños de ensayos clínicos enfocados a evaluar rápidamente los cientos de terapias dirigidas y posibles biomarcadores que se encuentran en evaluación preclínica. En este escenario, el entorno neoadyuvante es el más adecuado para acelerar el desarrollo de fármacos al permitir el examen *in vivo* de la respuesta tumoral y los resultados próximos, incluyendo la respuesta patológica y la recaída en pacientes de alto riesgo⁵⁵.

Metabolómica

La metabolómica consiste en la detección y medición de la totalidad de los metabolitos de una muestra⁸⁰, lo que se denomina metaboloma⁸¹. Los metabolitos son pequeñas moléculas de bajo peso molecular (normalmente <1.500 Da), producidas o consumidas en los procesos bioquímicos que tienen lugar en los seres vivos. Estas pequeñas moléculas son los productos finales tanto de las complejas redes de señalización genómica como de las señales entrantes del ambiente, por lo que proveen una lectura real de lo que está sucediendo a nivel bioquímico en un organismo. Los metabolitos pueden cambiar como consecuencia de enfermedades, la exposición ambiental o la nutrición. En un entorno clínico, la metabolómica puede proporcionar valiosas herramientas para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades complejas como el cáncer^{82,83}.

Las técnicas más comunes para la medición de metabolitos son la espectrometría de masas (EM) y la resonancia magnética nuclear (NMR). La resonancia magnética nuclear es cuantitativa y no necesita pasos adicionales en la preparación de las muestras, sin embargo, tiene una baja sensibilidad⁸⁴. Por tanto, es más común la utilización de las técnicas de espectrometría de masas en los experimentos de metabolómica no dirigida o semi no dirigida ya que es más sensible, provee de mayores resultados y puede medir más moléculas en una muestra biológica compleja. Para la separación de metabolitos previa al análisis de espectrometría de masas se utilizan técnicas de separación como la cromatografía de gases (GC), la cromatografía líquida (LC) o la cromatografía

Introducción

tografía líquida de alta eficacia (HPLC). La cromatografía es una técnica de separación en la que los componentes de una mezcla compleja son separados en base a su diferente velocidad de desplazamiento al ser arrastrados por una fase móvil (líquida o gaseosa) a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria, la cual puede ser líquida o sólida (columna). En la cromatografía líquida el componente más determinante en la separación es la columna, cuyas características definen el tipo y el modo de la cromatografía. Las columnas de fase reversa, la mayoría con partículas de sílica C18 o C8, se caracterizan por tener una gran interacción con los compuestos polares mientras que las columnas de fase normal son más efectivas para compuestos no polares. Por tanto, las especies retenidas, que dependen de las propiedades cromatográficas de la columna, posteriormente se eluyen y se evalúan mediante instrumentos de EM. En base a las características arriba descritas, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), empleando una fuente de ionización por electrospray (ESI) como fuente de ionización, constituye la plataforma más utilizada en la actualidad para el análisis metabolómico^{85,86}. Su popularidad se debe a su gran versatilidad, que permite el análisis de una amplia variedad de moléculas. Además, a diferencia de lo que ocurre con la cromatografía de gases, no es necesaria la volatilidad de la muestra, lo que evita el paso de derivatización previo, proceso que modifica la estructura química del analito y que es utilizado para mejorar su volatilidad, estabilidad y detección.

El espectrómetro de masas está compuesto por una fuente de iones, que fragmenta la muestra en iones (añadiéndoles carga positiva o negativa), un analizador de masas, que dispersa los iones en función de su relación masa/carga (m/z) y un detector, que convierte el haz de iones en una señal eléctrica que puede ser procesada, almacenada y registrada. Los iones generados en la fuente de iones son acelerados hasta el analizador y separados en función de su m/z aplicando campos eléctricos o magnéticos lo que permite determinar la masa y la carga del ion en el detector. El espectrómetro posteriormente representa las mediciones de los diferentes componentes de la muestra en un gráfico, donde se representa la abundancia de cada relación m/z ⁸⁷.

Para la cuantificación de metabolitos existen diversas técnicas, como la monitorización de reacciones únicas (SRM) y la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS). Los experimentos de SRM suelen realizarse en un espectrómetro de masas de triple cuádruplo. El primer cuádruplo filtra los iones precursores de masa conocida. El segundo cuádruplo fragmenta las moléculas seleccionadas y el tercer cuádruplo analiza los fragmentos. Otro método cada vez más común para la EM es el HRMS. Estos métodos se basan en la alta resolución de masa del analizador de masas. Un analizador de masas comúnmente utilizado es el Orbitrap™, que registra la oscilación de los iones y cuya frecuencia proporciona información sobre la masa molecular. Otra técnica de cuantificación es un instrumento de medición de tiempo de vuelo (TOF), que registra el tiempo que tarda un ion en atravesar un campo eléctrico. A continuación, en la etapa de procesamiento de datos, se realizan las asignaciones de metabolitos⁸⁸. Los datos de salida incluyen picos con los tiempos de retención y la m/z específicos de cada metabolito; el área del pico suele ser el parámetro elegido para representar la abundancia relativa de cada metabolito. Los paquetes de software disponibles suelen incluir la alineación cromatográfica, la selección de picos y la identificación de compuestos mediante la búsqueda en bases de datos de metabolómica.

Estudios previos de metabolómica en cáncer de mama

La metabolómica puede ser una herramienta adecuada para generar perfiles de metabolitos en sangre capaces de predecir la respuesta al tratamiento y las tasas de supervivencia a partir de sangre y muestras tumorales⁸⁹. En la actualidad, existen varios marcadores séricos establecidos para la detección de recaída de la enfermedad: los niveles del antígeno cancerígeno (CA) 15-33 (antígeno MUC-1) y del antígeno carcinoembrionario (CEA) que se evalúan en el momento del diagnóstico de la recaída sistémica. Sin embargo, presentan varias limitaciones. Sus valores no aumentan en todos las pacientes, son de escaso valor en la detección de micrometástasis o recaídas loco-regionales y sufren de falta de especificidad, ya que varias enfermedades benignas, así como la quimioterapia, parecen influir en sus niveles⁹⁰.

Introducción

Hasta la fecha, se han realizado varios estudios metabolómicos en cáncer de mama utilizando diferentes tipos de muestra, utilizando diferente metodología y con el objetivo de responder distintas preguntas clínicas: distinguir entre tejido tumoral y tejido normal, asociar los perfiles metabólicos al estatus de los receptores hormonales, predecir respuesta a tratamiento, recaída a largo plazo o distinguir tumores de estadios tempranos con tumores metastásicos. El primer estudio de metabolómica realizado en 1993 con muestras de cáncer de mama y utilizando NMR, describió mayores contenidos de lactato, succinato y fosfocolina, y menores niveles de glucosa e inositol en los tumores en comparación con el tejido mamario no afectado⁹¹. Más tarde, se apuntó a los niveles totales de colina como metabolito discriminante entre tejido canceroso y benigno⁹². Posteriormente, se realizaron observaciones similares con la fosfocolina, el lactato y ciertos lípidos, que además se correlacionaron con el grado histopatológico y como posibles determinantes del grado del tumor⁹³. Se observaron ratios de creatina elevados en el tejido maligno, aunque no está claro si los espectros encontrados pueden realmente distinguir entre las diferentes especies que contienen colina, las cuales incluyen colina, glicerofosfatidilcolina y fosfocolina⁹³. En otro estudio separaron las señales de colina en glicerofosfatidilcolina, que es más intensa en los controles y en fosfocolina, que está más elevada en los tumores. Basándose en estos dos metabolitos, las muestras tumorales pueden distinguirse de los tejidos no afectados con una sensibilidad y especificidad del 82 % y el 100 % respectivamente. Al mismo tiempo, se encontró que los niveles de glicina, de taurina y de lactato eran más altos en el tejido tumoral, observándose una acumulación de colina y glicina en los tumores más grandes⁹⁴. Un estudio posterior de lipidómica en muestras de tejido también describe a la fosfatidilcolina como el lípido más fuertemente asociado al estatus ER- y a un mayor grado tumoral⁹⁵.

Se ha investigado la relación entre el estatus de los receptores hormonales con el perfil metabólico de las pacientes, observando que las pacientes con ER y PR negativos parecen tener niveles más elevados de los metabolitos glicina, glicerofosfocolina y colina que las pacientes con receptores hormonales positivos⁹⁶. Con un enfoque combinado de análisis metabólico por cromatografía de gases acoplada a espectrometría

de masas (GC-MS) y genómica de muestras de tejido, se describió que los tumores ER- tenían mayores niveles de metabolitos glucogenolíticos y glucolíticos mientras que los tumores ER+ mostraron un aumento de los metabolitos derivados de la carnitina, así como de ácidos grasos de cadena corta y media⁹⁷. Diferentes estudios se enfocaron en la discriminación del cáncer temprano frente al metastásico^{98,99}, en el tiempo hasta la progresión¹⁰⁰ o en definir los márgenes del tumor con objetivos quirúrgicos¹⁰¹. Los tres estudios utilizaron muestras de suero y NMR.

Un estudio basado en el análisis de muestras de sangre de pacientes operadas mediante MRS y GC-MS es capaz de predecir la enfermedad recurrente con una sensibilidad del 86 % y una especificidad del 84 %, basándose en un panel de 11 marcadores asociados con el metabolismo de los aminoácidos, la glicólisis y el metabolismo de los ácidos grasos¹⁰². En otro estudio se analizó un pequeño conjunto de 28 muestras de sangre mediante NMR y LC-MS para predecir las respuestas de las pacientes con cáncer de mama a la quimioterapia neoadyuvante. El modelo predice el 80 % de las pacientes con tumores no respondedores a la quimioterapia y estableció cuatro metabolitos discriminatorios. tres detectados por NMR (treonina, glutamina e isoleucina) y un metabolito detectado por espectrometría de masas (ácido linolénico)¹⁰³.

A pesar del objetivo común de establecer firmas metabólicas robustas para el cáncer, los estudios existentes son heterogéneos, realizados en diferentes muestras (tejido tumoral, sangre, orina) y enfocados a dar respuesta a diferentes preguntas clínicas. Aunque cada estudio arroja un perfil metabólico algo distinto, el grueso de la evidencia apunta a que la metabolómica tiene potencial para generar herramientas clínicas de utilidad, con la histidina, la prolina, la fenilalanina, el ácido glutámico, el 3-hidroxiacetato, el lactato y ciertos lípidos como posibles marcadores⁹⁰. Dado que los tumores de mama representan un conjunto de enfermedades diferentes, la comprensión de las diferencias metabólicas entre los subtipos moleculares ofrece una forma de identificar nuevas estrategias de tratamiento específicas para cada subtipo, especialmente si los cambios en los metabolitos se evalúan en el contexto de biología de sistemas e incluso dentro del mismo subtipo tumoral, debe tenerse en cuenta la heterogeneidad tumoral entre pacientes para obtener el mejor resultado terapéutico. Por

Introducción

ejemplo, varios estudios sugieren que el subgrupo luminales B representa un tipo de tumor que depende preferentemente de los ácidos grasos para obtener energía, mientras que los tumores HER2+ muestran predominantemente alteraciones en el metabolismo de la glucosa/glutamina¹⁰⁴. Un estudio metabolómico previo de nuestro grupo realizado en tumores de cáncer de mama refleja la importancia que posee el metabolismo de la glutamina y el glutamato en la viabilidad celular y la supervivencia a largo plazo¹⁰⁵.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis y objetivos

La posibilidad de acceder al análisis molecular de la sangre de las pacientes, generada durante el manejo clínico rutinario, abre unas enormes posibilidades para la búsqueda de nuevos marcadores con valor diagnóstico, predictivo y pronóstico. La metabolómica puede ser una herramienta útil para buscar respuestas moleculares a preguntas clínicas en el ámbito de la oncología cuando no se dispone de muestra tumoral. Y lo que es aún más importante, para su traslación real a la rutina clínica mediante el desarrollo de herramientas moleculares útiles.

El objetivo principal de esta tesis es la identificación de marcadores moleculares, basados en el análisis del metaboloma, que sean relevantes en la respuesta clínica al tratamiento neoadyuvante en cáncer de mama y en la evolución de la enfermedad, es decir, marcadores predictivos de respuesta o no respuesta y marcadores pronósticos de la supervivencia global.

Este objetivo principal se puede desglosar en los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluar el potencial de la tecnología propuesta para proporcionar nuevos factores moleculares con valor predictivo en cáncer de mama, durante el tratamiento neoadyuvante.
2. Evaluar las diferencias a nivel metabolómico entre los distintos subtipos de cáncer de mama.
3. Evaluar la capacidad de predicción de respuesta al tratamiento mediante un perfil de metabolitos sanguíneos que identifique precozmente a las pacientes con cáncer de mama que alcanzarán una respuesta patológica completa.
4. Evaluar la capacidad de predicción de supervivencia largo plazo de la información metabolómica obtenida.
5. Encontrar diferencias en el perfil de metabolitos sanguíneos entre el momento del diagnóstico, el momento posterior al inicio de la quimioterapia y el final del tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material y métodos

Cohorte

La cohorte de estudio se compuso de ciento tres pacientes de cáncer de mama tratadas con terapia neoadyuvante y reclutadas durante doce meses en la Unidad de Oncología Médica del Hospital Universitario de Jaén (España).

Las pacientes fueron seleccionadas cumpliendo los siguientes criterios de inclusión:

- Pacientes ≥ 18 años.
- Capaces de otorgar su consentimiento al estudio.
- Diagnóstico patológico de carcinoma ductal de mama infiltrante.
- Estadio T1-4, N0-2.
- Indicación para recibir quimioterapia neoadyuvante, según la decisión de un comité de tumores.
- Previsión de cirugía radical una vez se complete la quimioterapia.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Histología de carcinoma lobulillar.
- Metástasis a distancia, detectadas en cualquier momento desde el diagnóstico hasta la cirugía.
- Disponibilidad de muestra de plasma antes del inicio del tratamiento neoadyuvante.

El estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional del Comité Ético de Investigación Clínica de Jaén y todas las investigaciones clínicas se llevaron a cabo bajo las guías de las Declaraciones de Helsinki y las directrices de la Conferencia Internacional sobre Armonización y Buenas Prácticas Clínicas (ICH-GCP). Todas las pacientes dieron su consentimiento informado por escrito para la participación en el ensayo antes de la extracción de la muestra de sangre.

El estadio del cáncer se clasificó según el sistema TNM de 2002. La T se refiere al tamaño y extensión del tumor primario. La N hace referencia a la extensión de cáncer

Material y métodos

que se ha diseminado a los ganglios (o nódulos) linfáticos cercanos y finalmente, la M se refiere a si el cáncer se ha metastatizado.

En cuanto a la clasificación en los principales subtipos de cáncer de mama, las pacientes diagnosticadas con HER2- y ER+ con Ki67 > 20 % se definieron como grupo luminales B y las pacientes diagnosticadas con HER2- y ER+ con Ki67 < 20 % se clasificaron como luminales A. En cuanto a los subtipos no luminales, todas las pacientes con cáncer de mama que no expresaban receptores hormonales ni sobreexpresaban HER2 se consideraron pacientes con cáncer de mama triple negativo; y finalmente, las pacientes que sobreexpresaban el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 se diagnosticaron como pacientes con cáncer de mama HER2+.

La respuesta patológica fue registrada según el sistema Miller & Payne¹⁰⁶. El grado de respuesta se evalúa desde MP1 (menos respuesta) hasta MP5 (respuesta completa).

Recogida de muestras

Se recogieron las muestras de sangre mediante venopunción estándar en tubos con EDTA tras al menos 8 horas de ayuno. Se centrifugó la sangre a 1400 x g durante 10 minutos a 4 °C, se aspiró el plasma sobrenadante y se transfirió a nuevos viales, almacenándolos a -80 °C hasta el análisis.

Experimento metabolómico

Recepción de muestras:

Se recibieron 3 muestras de plasma de 300 µL de cada una de las pacientes. Tras la recepción, las muestras fueron inventariadas y guardadas inmediatamente a -80 °C hasta ser procesadas. A cada muestra se le asignó un identificador al ser introducida en el sistema LIMS que fue utilizado para monitorizar las muestras durante todo el proceso.

Preparación de muestras:

Se prepararon las muestras de plasma utilizando el sistema automatizado MicroLab STAR® de la compañía Hamilton. Se añadieron estándares internos antes del primer

paso del proceso de extracción por razones de control de calidad. Posteriormente, se precipitaron las proteínas con metanol mediante agitación durante dos minutos. Se dividió el extracto resultante en cinco fracciones: dos fracciones para el análisis por dos métodos separados de fase inversa (RP)/UPLC-MS/MS con ionización por electrospray (ESI) en modo de ion positivo, una fracción para el análisis por RP/UPLC-MS/MS con ESI en modo de ion negativo, otra fracción para el análisis por HILIC/UPLC-MS/MS con ESI en modo de ion negativo, y una muestra se guardó como reserva. Se agitaron brevemente las muestras en un TurboVap® (Zymark) para eliminar el disolvente orgánico y se guardaron los extractos de las muestras en nitrógeno durante una noche antes de su preparación para el análisis.

Cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectroscopia de masas en tándem (UPLC-MS/MS).

Para todos los métodos metabolómicos se utilizó: una separación por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPCL) Waters ACQUITY, un espectrómetro de masas de alta resolución/precisión Q-Exactive de Thermo Scientific conectado con una fuente de ionización por electrospray calentado (HESI-II) y el analizador de masas Orbitrap operando a una resolución de 35.000 masas.

Previamente al análisis, se secaron los extractos de las muestras y se reconstituyeron en disolventes de reconstitución. Se analizó una alícuota en condiciones ácidas de ion positivo, optimizadas cromatográficamente para los compuestos más hidrofílicos. En este método, se eluyó el extracto en una columna C18 (Waters UPLC BEH C18-2,1x100 mm, 1,7 μ m) utilizando agua y metanol, con un 0,05 % de ácido perfluoropentanoico (PFPA) y un 0,1 % de ácido fórmico (FA). Otra de las alícuotas se analizó utilizando condiciones ácidas de ion positivo, pero está vez optimizada cromatográficamente para compuestos más hidrofóbicos. En este método, se eluyó el extracto a partir de la misma columna C18 mencionada anteriormente, utilizando metanol, acetonitrilo, agua, 0,05 % de PFPA y 0,01 % de FA, pero trabajando con un contenido orgánico global más elevado. Otra alícuota se analizó en condiciones básicas de ion negativo usando otra columna. Se eluyeron los extractos básicos usando metanol y agua y con 6,5 mM de bicarbonato de amonio a pH 8. Se analizó la cuarta alícuota mediante ioniza-

Material y métodos

ción negativa tras su elución desde una columna HILIC (Waters UPLC BEH Amide 2,1x150 mm, 1,7 μm) utilizando un gradiente consistente en agua y acetonitrilo con 10 mM de formiato de amonio, con un pH 10,8.

Se alternaron escaneos de MS y MSn (en tándem) en función de los datos, utilizando la exclusión dinámica durante el análisis de espectrometría de masas. El rango de escaneo varió ligeramente entre los métodos, pero cubrió 70-1000 m/z. Los archivos de datos brutos se archivaron y extrajeron como se describe a continuación.

Extracción de datos e identificación de compuestos

Se llevó a cabo la identificación de los picos espectrales y proceso de control de calidad utilizando el hardware y el software de Metabolon. Se identificaron los compuestos por comparación con las entradas de la biblioteca de estándares purificados o entidades desconocidas recurrentes.

Cuantificación de metabolitos y normalización de datos

Se cuantificaron los picos utilizando el área bajo la curva. En el caso de los estudios que abarcaban varios días, se realizó un paso de normalización de los datos para corregir la variación resultante de las diferencias de sintonía entre los instrumentos. Esencialmente, se corrigió cada compuesto en bloques de días de ejecución registrando las medianas para que fueran iguales a uno (1,00) y normalizando cada punto de datos proporcionalmente.

Calidad de datos: variabilidad instrumental y de proceso.

Se determinó la variabilidad del instrumental mediante el cálculo de la media relativa de la desviación estándar (RSD) para los estándares internos que fueron añadidos a cada muestra antes de la inyección dentro del espectrómetro de masas. Se determinó la variabilidad global del proceso mediante el cálculo de la media RSD para todos los metabolitos endógenos (por ejemplo, los estándares no instrumentales) presentes en el 100 % de las muestras MTRX, las cuales son replicados técnicos creados desde una gran reserva de plasma humano ampliamente caracterizado. Los valores de variabilidad del proceso e instrumental que cumplen los criterios de aceptabilidad son los si-

güentes: variabilidad instrumental: media RSD del 5 %; variabilidad total del proceso: media RSD del 10 %.

Control de calidad

Se incluyeron varios tipos de controles junto con las muestras experimentales: se generó una matriz de muestras combinadas cogiendo un pequeño volumen de cada muestra experimental. Esta matriz se usó como un replicado técnico a lo largo de la base de datos (o alternativamente, se usó un conjunto de plasma humano bien caracterizado). Se utilizaron como muestra blanco muestras de agua ultrapura. Se introdujo un conjunto de estándares de control de calidad para la monitorización del desempeño instrumental y el alineamiento cromatográfico. Se aleatorizaron las muestras a lo largo de la plataforma analizándolas junto con las muestras QC, siendo espaciadas uniformemente entre las inyecciones.

La calidad de los datos obtenidos se evaluó realizando una correlación de Pearson de cada una de las muestras contra todas las demás. La matriz de correlación se llevó a cabo mediante el programa Perseus utilizando la función *multi scatter plot*.

Análisis de los datos metabolómicos

Modelos gráficos probabilísticos (MGP)

La estructura funcional de la red fue desarrollada usando modelos gráficos probabilísticos no dirigidos compatibles con datos de alta dimensionalidad, como describen previamente Gámez-Pozo y colaboradores³⁶. Para realizar los modelos gráficos probabilísticos se empleó una secuencia de comandos de R ("gRapHD"). La secuencia de comandos recibe como entrada la base de datos y tras convertirla en una matriz busca el árbol de máxima verosimilitud en un primer paso. A partir de ahí en pasos en pasos sucesivos introduce nuevas aristas revisando si eso reduce el criterio de información bayesiana (BIC) de manera que se preserve la desconexión del gráfico inicial. Al final el output son dos archivos de texto que resultan en una serie de coordenadas. Esto es un archivo que contiene tres columnas, la primera contiene el número de la interacción, las columnas dos y tres contienen el nombre de dos variables (metaboli-

tos) que están relacionadas. Este archivo de texto se importa al programa, Cytoscape V3.2.1, que permite su representación gráfica¹⁰⁷.

Procesamiento de la red

Una vez importado el archivo de texto en el programa Cytoscape, se obtiene una red compuesta por una serie de nodos (cajas) cada uno de los cuales representa un metabolito. Los nodos están unidos por una línea (arista, que refleja una relación entre ellos, pero no una direccionalidad o dependencia ya que estos modelos gráficos son modelos no dirigidos). Se empleó la distribución de Cytoscape *organic layout* para separar de manera clara conjuntos de metabolitos en la red. Una vez separados, se les asignó una etiqueta en función del grupo de metabolitos significativamente más abundante en el nodo respecto al conjunto total de metabolitos, conformando así los nodos funcionales.

Estudio de los nodos funcionales de la red

Una vez definida la estructura funcional, la actividad de los nodos funcionales se calculó mediante el promedio de la cuantificación de metabolitos de cada nodo relacionados con la función principal asignada. De esta forma, se obtiene un valor resumen de cada nodo funcional de cada muestra. Estos nodos funcionales son una medida resumen que sirve para dividir las redes en un número reducido de variables que reflejen los grandes procesos biológicos relevantes en la enfermedad³⁶.

Para visualizar las actividades de los nodos funcionales en el gráfico, los datos metabólicos de los tumores fueron centrados a la media antes de incluirlos en el modelo, separados según su respuesta patológica al tratamiento o según su subtipo molecular. Los metabolitos con una cuantificación por debajo de 0 se representaron en verde, los metabolitos con una medición en torno a 0 aparecen representados en gris y en rojo, se representaron los metabolitos con una medición por encima de cero. Las diferencias de las actividades de los nodos funcionales fueron evaluadas mediante la prueba estadística de *Mann-Whitney* para comparar dos categorías y la prueba de *Kruskal-Wallis* para tres o más categorías, empleando la prueba de múltiples comparaciones de *Dunn* para las comparaciones categoría a categoría.

Análisis metabo-ontológico

El análisis metabo-ontológico diseñado permite asignar una o varias rutas metabólicas significativamente sobre representadas en cada nodo de la red, facilitando trabajar posteriormente con nodos funcionales definidos por dichas rutas. Para ello, se calcularon las frecuencias de las sub-rutas con la función `table()` del programa R que comprendían los nodos y sus proporciones sobre el total con la función `prop.table()`. Con el objetivo de obtener las rutas sobre representadas se realizó un análisis de las veces de cambio (*fold change*) de las proporciones de las sub-rutas sobre el total y se utilizó la prueba chi cuadrado con la función `chisq.test()` para determinar que sub-rutas estaban sobre representadas de una manera significativa en cada uno de los nodos, teniendo en cuenta la proporción que había en cada uno de ellos y en el total. Finalmente se identificaron las comparaciones significativas controlando mediante el valor q de Benjamini-Hochberg (BH), que la tasa de falsos descubrimientos (FDR) no superara el 5 % ($d=0,05$). Se utilizó la función de R `p.adjust(x, method = "BH")` que permite incorporar distintas correcciones, entre ellas la de Benjamini & Hochberg, recibiendo directamente un vector con los p-valores originales multiplicados por el factor correspondiente acorde a la corrección. De esta forma se pueden comparar directamente frente al nivel de significancia α (en este caso 0,05) elegido inicialmente.

Análisis de expresión diferencial (SAM)

El análisis de expresión diferencial (SAM) es un método no paramétrico, basado en la permutación, propuesto especialmente para el análisis de datos de *microarrays*¹⁰⁸. Está diseñado para hacer frente a la tasa de falsos descubrimientos cuando se ejecutan múltiples comparaciones en datos de *microarrays* de alta dimensión. El análisis calcula la tasa empírica de falsos descubrimientos mediante la permutación aleatoria de las etiquetas de clase. La permutación genera una distribución nula, porque se supone que la aleatoriedad elimina todos los efectos biológicos. En el análisis, se asigna una puntuación de significación a cada variable basada en su cambio en relación con la desviación estándar de las mediciones repetidas. Para cada umbral, una determinada proporción de las variables en el conjunto de permutaciones será significativa por

azar. La proporción es usada para calcular la tasa de FDR. Los análisis SAM se llevaron a cabo utilizando en programa MeV v.4.9.0. La FDR se ajustó a 0 % siempre que fue posible, o por debajo del 5 % en su defecto, es decir, la proporción de metabolitos que pudieron seleccionarse como significativos debido a un proceso de azar es menor del 5 %.

Predictores de clase

La herramienta de predicción de clases crea un predictor multivariante para determinar a cuál de las dos clases pertenece una muestra dada. Este método tiene como objetivo desarrollar un modelo estadístico multivariante para predecir la clase de una muestra basándose en su patrón de cuantificación de metabolitos. La precisión del predictor construido es estimada mediante el área bajo la curva (AUC) de las curvas ROC, que consisten en una representación gráfica de la sensibilidad frente a (1 – especificidad)¹⁰⁹.

Predictor de supervivencia

Los predictores de supervivencia se utilizan para clasificar muestras clínicas según su alto o bajo riesgo de recaída de la enfermedad. Para generar el predictor, se calculó un nivel de significación estadístico para cada metabolito en base a un modelo univariante¹¹⁰ con el fin de identificar los metabolitos cuya cuantificación estuviera significativamente relacionada con la supervivencia libre de metástasis (DMFs)¹¹¹. Para desarrollar el modelo de predicción de riesgo utilizando el método de componentes principales supervisado de E. Bair and R. Tibshirani¹¹² se seleccionaron aquellos metabolitos relacionados con la DMFS cuyo p-valor fuera menor a 0,05. Para los metabolitos seleccionados se establecieron grupos de correlación con el fin de encontrar perfiles reducidos que aportasen la misma información.

A continuación, para evaluar la precisión en cuanto a la predicción de los perfiles, se llevó a cabo una validación cruzada dejando uno fuera (LOOCV), en la que cada una de las muestras a nivel individual se considera cohorte de validación, y es sobre la que se analiza el perfil obtenido. El proceso se repite hasta que todas las muestras hayan pasado por esa etapa.

Para probar la significación estadística y descartar que el resultado hubiese ocurrido por un proceso al azar, el perfil fue sometido a 2.000 permutaciones aleatorias. Por el hecho de usar permutaciones, se establece un p-valor umbral de tal manera que el número de falsos positivos no supere cierta proporción. La eficiencia de estos modelos se evaluó mediante el área bajo la curva (AUC) de las curvas ROC.

Modelos lineales generalizados mixtos

Con el objetivo de comprobar si existían diferencias significativas entre las muestras tomadas en los distintos puntos temporales (basal, precirugía y postcirugía) se llevó a cabo un análisis de modelos lineales generalizados mixtos en el programa R. Para ello, se ajustó un modelo mixto generalizado con los valores de todos los metabolitos como variable respuesta, la variable que contenía si se trataba de basal, precirugía o postcirugía como explicativa de efectos fijos y el código de paciente como variable aleatoria, mediante la función *glmer()* del paquete *lme4*. También se llevó a cabo del análisis de la varianza del modelo con la función *anova()*. Se calcularon las medias marginales (promedios) de la variable dependiente según los diferentes niveles de las variables predictoras categóricas mediante la función *emmeans()* del paquete *emmeans*. Además, se compararon las medias marginales estimadas (EMM) obtenidas mediante la función *pair()*, para estudiar si las diferencias entre ellas eran significativas. Una vez obtenidos los p-valores, se ajustaron mediante el método de Bonferroni aplicando la función *p.adjust()*. Una vez realizado el análisis de los modelos mixtos, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento (mediante el análisis metabo-ontológico descrito antes) de las rutas metabólicas estadísticamente sobrerrepresentadas en cada uno de los análisis. Para ello, los metabolitos diferenciales se separaron en función de en qué momento temporal se encontraban más elevados en cada uno de los análisis entre dos puntos temporales. Posteriormente, se realizó el análisis metabo-ontológico de cada lista de metabolitos, obteniendo las rutas metabólicas sobre representadas.

Análisis estadísticos

La imputación de los datos, su transformación en logaritmo de base dos y el análisis de calidad de los datos se llevaron a cabo con el programa Perseus. Para el análisis

Material y métodos

estadístico de los datos se utilizó GraphPad Prism 8. Los gráficos de cajas y bigotes son gráficos de cajas tipo “Tukey”. Los p-valores son bilaterales y fueron considerados estadísticamente significativos por debajo de 0,05, siendo reflejados de la siguiente forma: * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$. Los predictores de clase y supervivencia se construyeron mediante BRB-Array Tools, herramienta desarrollada por el grupo del Dr. Richard Simon¹¹³. Las proporciones de cada uno de los grupos (alto y bajo riesgo) se fijaron *a priori* para evitar un sobreajuste de los predictores a nuestra población.

RESULTADOS

Resultados

Cohorte

La cohorte está compuesta por ciento tres pacientes con cáncer de mama tratadas con terapia neoadyuvante. Cuatro pacientes fueron excluidas de los estudios posteriores, tres de ellas debido a enfermedad bilateral y la cuarta por falta de información clínica sobre su respuesta al tratamiento. Por tanto, la cohorte final está formada por noventa y nueve pacientes. A continuación, se muestran los datos clínicos de estas pacientes (Tabla 4).

Clínicos	Grupo	n	
Edad	31-76	99	Media: 51.2 (DS±10.35)
IMC	18-25	42	Media 22.44 (DS±1.77)
	25-30	33	Media 27.37 (DS ±1.45)
	>30	28	Media 34.78 (DS ± 4.11)
Estado menopáusico	Premenopáusica	48	
	Perimenopáusica	11	
	Postmenopáusica	44	
Estadio tumoral	IA	3	
	IC	1	
	IIA	54	
	IIB	23	
	IIIA	9	
	IIIB	4	
	IIIC	1	
	IV	2	
	ILC (carcinoma lobulillar invasivo)	1	
Subtipo molecular	HER2+	22	
	Luminales A	11	
	Luminales B	46	
	Triple Negativo	20	
Respuesta clínica	Respuesta completa	29	
	Respuesta parcial	70	
Respuesta patológica	Respuesta completa (MP4 y MP5)	54	
	Respuesta parcial (MP1, MP2 y MP3)	45	
Estatus	Viva sin enfermedad (VSE)	85	
	Viva con enfermedad (VCE)	2	
	Exitus	12	

Tabla 4. Datos clínicos de las pacientes.

Resultados

La respuesta clínica se registró como repuesta parcial (70 pacientes, 70,7 %) y respuesta completa (29 pacientes, 29,3 %). Según la clasificación Miller & Payne, 3 pacientes presentaron MP1, 8 MP2, 34 MP3, 25 MP4 y 29 MP5. Para los análisis llevados a cabo en el estudio se trabajó con dos grupos de respuesta: respuesta parcial (MP1, MP2 y MP3): 45 (45,55 %) pacientes y respuesta completa (MP4 y MP5): 54 (55,45 %) pacientes. En la tabla 1 del Anexo II se muestra la distribución de la respuesta patológica y del estadio tumoral según el subtipo molecular y en la tabla 2 se muestra el esquema de tratamiento que recibieron las pacientes distribuido según el subtipo tumoral.

Se recibieron tres muestras de plasma por cada paciente (una muestra al diagnóstico, una previa al tratamiento y otra tras la cirugía). Por tanto, se recibieron 309 muestras que contenían 300 uL de plasma humano provenientes del Complejo Hospitalario de Jaén. Dichas muestras se guardaron a -80 °C en el Biobanco del Hospital La Paz hasta su envío a la empresa Metabolon Inc. localizada en Morrisville, EE. UU.

Experimento de metabolómica

Se identificaron 985 metabolitos mediante la determinación de los perfiles bioquímicos globales de las muestras de plasma. 436 metabolitos fueron identificados mediante el método LC/MS Negativo; 92 metabolitos fueron identificados mediante el método LC/MS Polar; 223 metabolitos fueron identificados mediante el método LC/MS Positivo temprano y 234 metabolitos LC/MS Positivo tardío. Los metabolitos identificados se engloban en las siguientes super-rutas: aminoácidos (196 metabolitos), carbohidratos (28), cofactores y vitaminas (34), energía (9), lípidos (440), nucleótidos (37), péptidos (32), xenobióticos (196) y moléculas parcialmente caracterizadas (13). Estos metabolitos se distribuyen en subrutas dentro de las rutas tal y como se muestra en Anexo I. Los metabolitos pertenecientes al grupo de xenobióticos fueron excluidos de los análisis con el objetivo de disminuir la variabilidad extrínseca que aportaban los componentes alimenticios y los medicamentos que las pacientes pudieran tomar. Por tanto, la matriz de datos resultante contuvo finalmente 789 metabolitos.

Los datos crudos provenientes del experimento de metabolómica fueron imputados a una distribución normal con el objetivo de no contar con mediciones en blanco y luego fueron transformados en logaritmo con base 2 para reducir el rango dinámico de la escala de datos. Como control de calidad de los datos se obtuvieron 95.481 diagramas de dispersión (103 pacientes, 3 tiempos cada uno), de los cuales el valor mínimo de correlación de Pearson fue 0,71 y el valor máximo 0,96, siendo la media de correlación entre muestras 0,88.

Esquema de utilización de muestras

Para esclarecer el seguimiento de los análisis realizados y los resultados obtenidos, a continuación, se muestra un esquema que representa qué muestra de las recogidas en los distintos puntos temporales fue utilizada para los distintos análisis computacionales (figura 1). Las muestras recogidas en el momento basal fueron utilizadas para realizar los análisis mediante modelos gráficos probabilísticos, los análisis de expresión diferencial y los predictores de clase. Las muestras recogidas en el momento postcirugía fueron utilizadas para realizar los análisis de supervivencia. Finalmente, las tres muestras temporales, basal, precirugía y postcirugía fueron utilizadas para realizar los análisis de modelos mixtos temporales.

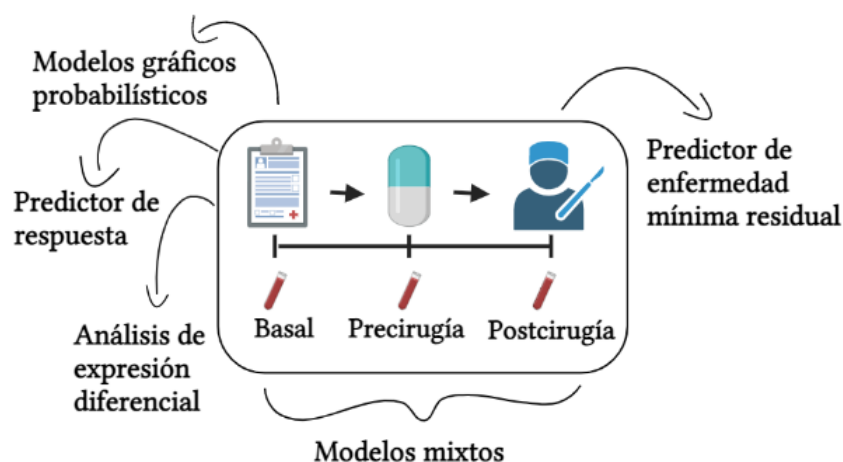


Figura 1. Esquema de utilización de las muestras recogidas en los distintos puntos temporales en el estudio.

Diferencias entre subtipos moleculares

Con el objetivo de estudiar las diferencias entre las pacientes con distintos subtipos moleculares (HER2+, luminales B, luminales A y TNBC) se construyó un modelo gráfico probabilístico utilizando los datos metabolómicos de la muestra basal, sin ninguna otra información a priori. El modelo gráfico resultante fue separado en diversas ramas y dividido en 9 nodos funcionales a los que se les asignó una función mayoritaria en base a los metabolitos significativamente predominantes en cada uno de los nodos (figura 2).

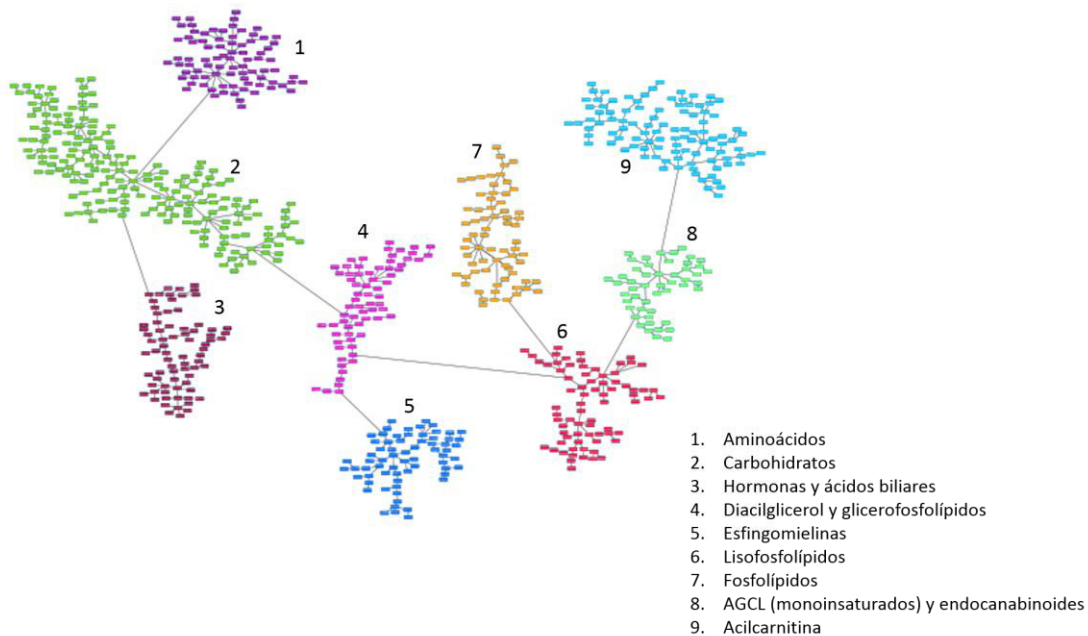


Figura 2. Modelo gráfico probabilístico de la cohorte completa. Red construida a partir de los datos metabolómicos de las 99 pacientes con tumores HER2+, luminales B, luminales A y TNBC. La red fue dividida en nueve nodos funcionales definidos por una o dos rutas metabólicas mayoritarias y representados por distintos colores. Cada caja representa un metabolito y las líneas grises conectan metabolitos con una cuantificación correlacionada a lo largo de la serie de pacientes.

Una vez construido el modelo se incluyó en él el promedio de la cuantificación de los metabolitos, separando a las pacientes según su subtipo molecular. Se analizó entonces si existían diferencias en la actividad funcional de los nodos entre los grupos, siendo la actividad funcional el promedio de la cuantificación de los metabolitos pertenecientes a la función mayoritaria del nodo. Se encontraron diferencias en la actividad del “Nodo 6. Lisofosfolípidos” entre las pacientes con tumores luminales A y luminales B y diferencias en el “Nodo 8. Ácidos grasos de cadena larga (AGCL) monoinsaturados y endocannabinoides” entre las pacientes con tumores luminales B y TNBC (figura 3). Se muestran los gráficos de la actividad de los nodos diferenciales (figura 4). El resto de los gráficos se encuentran en el Anexo II.

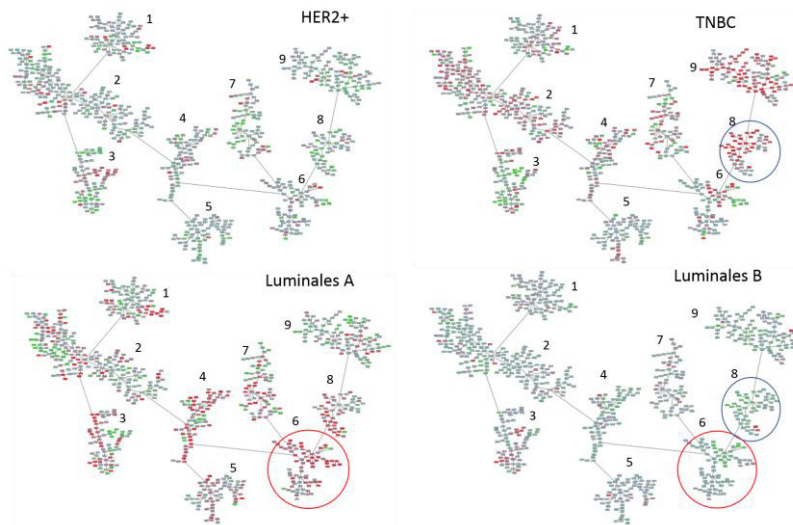


Figura 3. Representación del promedio de la cuantificación de los metabolitos según el subtipo molecular de las pacientes. Los círculos en rojo señalan el nodo con actividad diferencial entre las pacientes con tumores luminales A y luminales B. Los círculos en azul señala el nodo con actividad diferencial entre las pacientes con tumores luminales B y tumores TNBC.

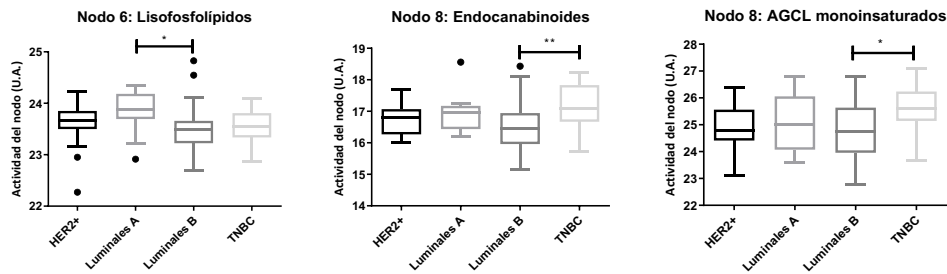


Figura 4. Gráfico de los nodos funcionales con actividad diferencial entre subtipos tumorales en la cohorte completa.

Resultados

Se realizó un análisis de expresión diferencial (SAM) con el objetivo de identificar metabolitos con una cuantificación diferencial entre subtipos y comprobar así si existían diferencias intrínsecas a ellos. Para el análisis se usaron los datos metabolómicos de la muestra basal de las 99 pacientes.

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial de clase múltiple entre las pacientes con distintos subtipos tumorales (HER2+, luminales A, luminales B y TNBC), sin embargo, no se encontraron metabolitos diferenciales. Para determinar las diferencias entre las pacientes con subtipos concretos se realizaron análisis de expresión diferencial comparando los datos de las pacientes con subtipos tumorales distintos dos a dos. Se encontraron cuantificaciones de metabolitos diferenciales entre las pacientes con tumores triple negativo y HER2+ (cuatro metabolitos, FDR = 0 %); luminales B y HER2+ (un metabolito, FDR = 0 %); luminales A y luminales B (ocho metabolitos, FDR = 0 %); luminales A y HER2+ (veintiún metabolitos, FDR = 4,06 %); triple negativo y luminales A (cuatro metabolitos, FDR = 0 %) y triple negativo y luminales B (diez metabolitos FDR = 0 %). Los metabolitos identificados se exponen en el Anexo II.

Predicción de respuesta al tratamiento en la cohorte completa

Con el objetivo de estudiar las diferencias entre los dos grupos de respuesta al tratamiento se utilizó el modelo gráfico anteriormente construido con los datos de metabólica de la muestra basal de toda la cohorte (figura 1). La red fue dividida en nueve nodos funcionales definidos por una o dos rutas metabólicas mayoritarias, en función de los grupos de metabolitos sobrerrepresentados en cada uno de ellos.

Una vez construido el modelo se incluyó en él el promedio de la medida de los metabolitos que conformaban la red separados según el grupo de respuesta patológica al tratamiento (respuesta completa (RC) o respuesta parcial (RP)). Se analizó entonces si existían diferencias en la actividad funcional de los nodos entre los dos grupos de respuesta observándose una mayor actividad del “Nodo 1. Aminoácidos” y del “Nodo 7. Fosfolípidos” en las pacientes con respuesta parcial al tratamiento (figura 5).

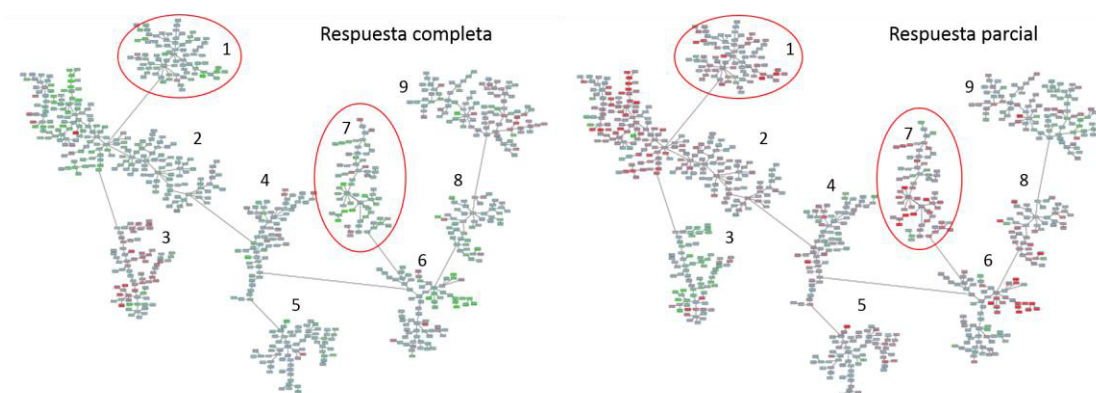


Figura 5. Detalle de los nodos con una actividad diferencial entre los grupos de respuesta en la cohorte completa. Los círculos rojos señalan los nodos con actividad diferencial entre los grupos de respuesta.

A continuación, se representa la actividad del “Nodo 1. Aminoácidos” y “Nodo 7. Fosfolípidos”. Ambos poseen una mayor actividad en las pacientes con respuesta parcial (figura 6). Los gráficos de la actividad de todos los nodos se encuentran en el Anexo II.

Resultados

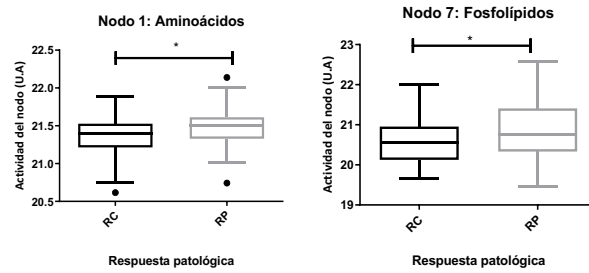


Figura 6. Gráfico de los nodos funcionales con actividad diferencial entre los grupos de respuesta en la cohorte completa.

Con el objetivo de determinar si existen metabolitos diferenciales entre las pacientes con distinta respuesta al tratamiento se realizó un análisis de expresión diferencial SAM con los datos de la muestra basal entre las pacientes con RC (54) y RP (45). Se identificaron 9 metabolitos diferenciales con una FDR= 0 % (figuras 7 y 8). Cinco metabolitos pertenecen al metabolismo de aminoácidos, dos a la ruta de carbohidratos y dos a la de ácidos grasos, resultado en consonancia con el resultado del MGP.

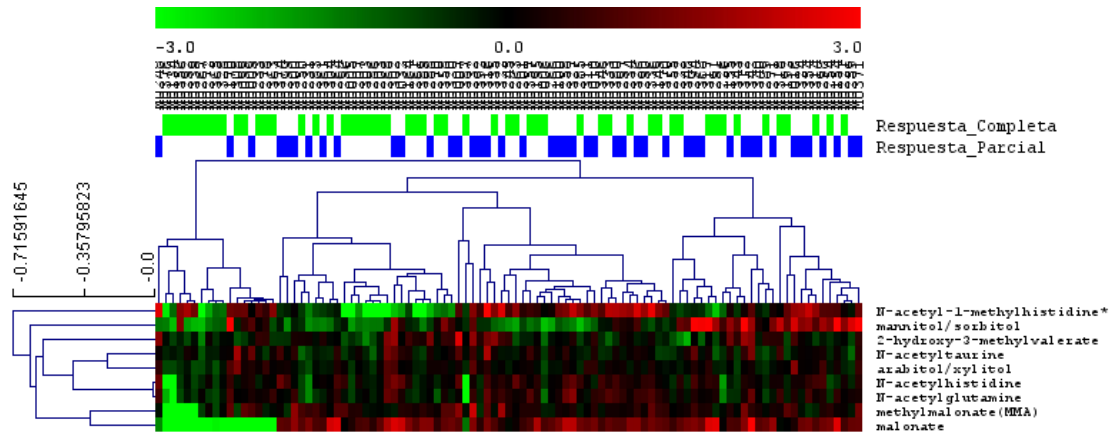


Figura 7. Agrupamiento jerárquico de los metabolitos diferenciales identificados mediante SAM en la cohorte completa. Se representa un HCL para los 99 pacientes (columnas) y otro para los metabolitos (filas). En colores están representados los grupos de respuesta al tratamiento.

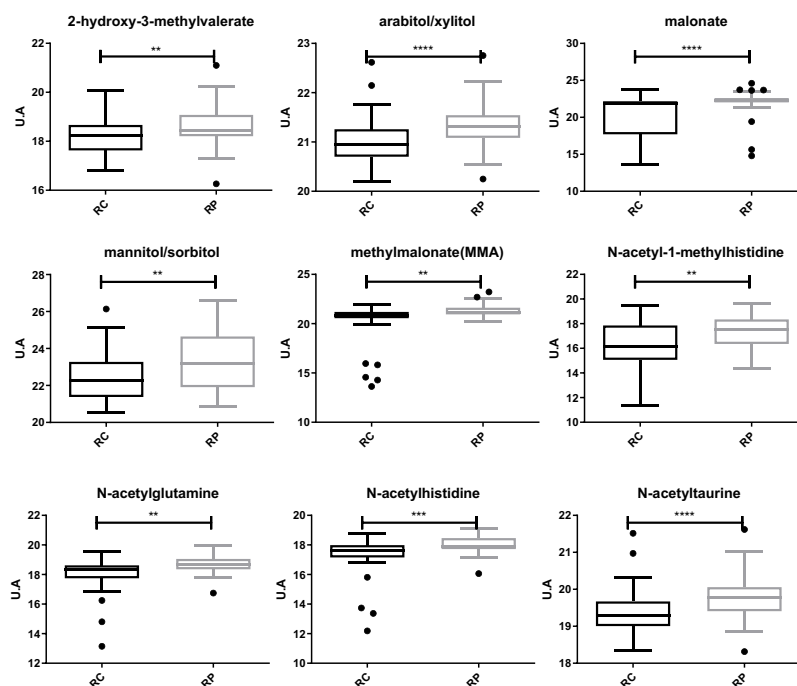


Figura 8. Gráficos de los metabolitos con una cuantificación diferencial entre los grupos de respuesta identificados mediante SAM en la cohorte completa.

Con el objetivo de obtener una serie de metabolitos cuya cuantificación posea capacidad de separar la cohorte completa en los dos grupos de respuesta al tratamiento (RC y RP), se llevaron a cabo análisis de predicción de clase. Se identificaron treinta y nueve metabolitos con un nivel de cuantificación diferencial y un nivel de significación de 0,01, con los que fue construido el predictor. La tabla que recoge los metabolitos que componen el predictor se muestra en el Anexo II. El predictor comprende los 9 metabolitos identificados anteriormente mediante el SAM. El porcentaje medio de clasificaciones correctas es del 84 %, y el área bajo la curva ROC (AUC) de 0,793.

Respuesta patológica	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
Respuesta completa	0,35	0,40	0,41	0,34
Respuesta parcial	0,40	0,35	0,34	0,41

Tabla 5. Desempeño del predictor de clase de la cohorte completa.

El análisis metabo-ontológico de los treinta y nueve metabolitos escogidos por el predictor de clase identificó las siguientes rutas sobre representadas: metabolismo de alanina y asparagina, metabolismo de amino azúcares y pentosas; metabolismo de ácidos grasos, síntesis de ácidos grasos, hexosilceramidas (HCER) y docosanoides.

Resultados

Los análisis realizados sugieren que existe un perfil diferencial entre las pacientes que alcanzaron una respuesta completa y aquellos que alcanzaron una respuesta parcial. Sin embargo, estas diferencias no poseen una estructura funcional clara, sugiriendo que dichas diferencias son subtipo-dependientes y junto con los resultados hallados en la comparación de subtipos, empujan a estudiar cada uno de los subtipos de cáncer de mama por separado.

Predicción de respuesta al tratamiento por subtipo

Debido a la heterogeneidad intrínseca del cáncer de mama y las diferencias subyacentes a cada uno de los subtipos, se llevó a cabo el análisis de pacientes con distintos subtipos tumorales por separado.

Pacientes con tumores TNBC

La cohorte comprende veinte pacientes con tumores triple negativo de las cuales doce presentaron una respuesta completa y ocho pacientes obtuvieron una respuesta parcial.

Se construyó un modelo gráfico probabilístico utilizando los datos metabolómicos de la muestra basal de las pacientes con tumores triple negativo, sin ninguna otra información a priori. El modelo gráfico resultante fue separado en diversas ramas y dividido en once nodos funcionales a los que se les asignó una función mayoritaria en base a los metabolitos significativamente predominantes en cada uno de los nodos (figura 9).

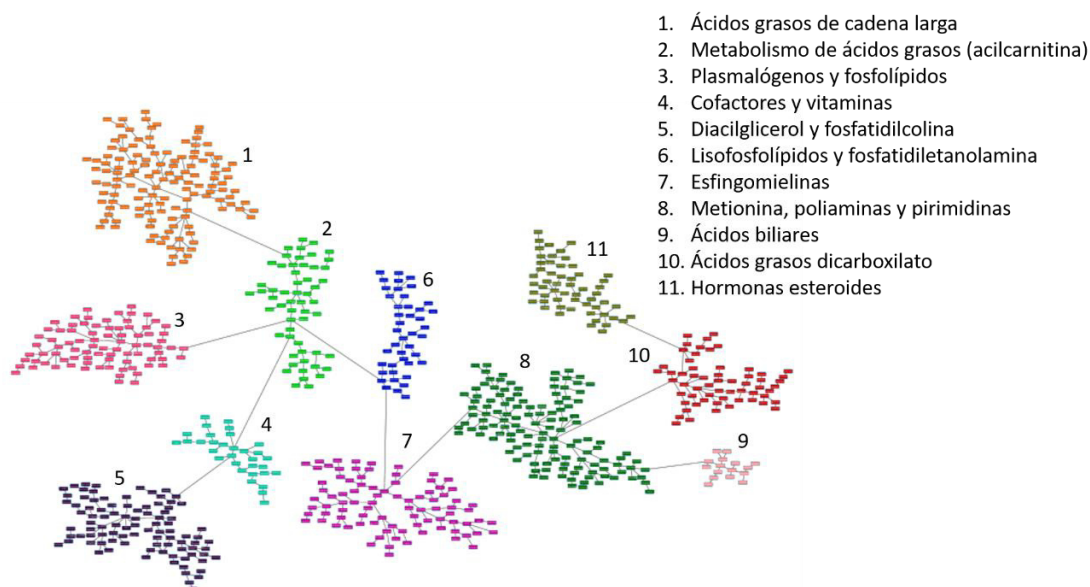


Figura 9. Modelo gráfico probabilístico de las pacientes con tumores TNBC.

Resultados

Una vez construido el modelo, se estudió si existían nodos con una actividad funcional diferencial entre las pacientes con distinta respuesta (RC vs. RP) (figura 10). Los gráficos de la actividad de cada uno de los nodos se encuentran en Anexo III.

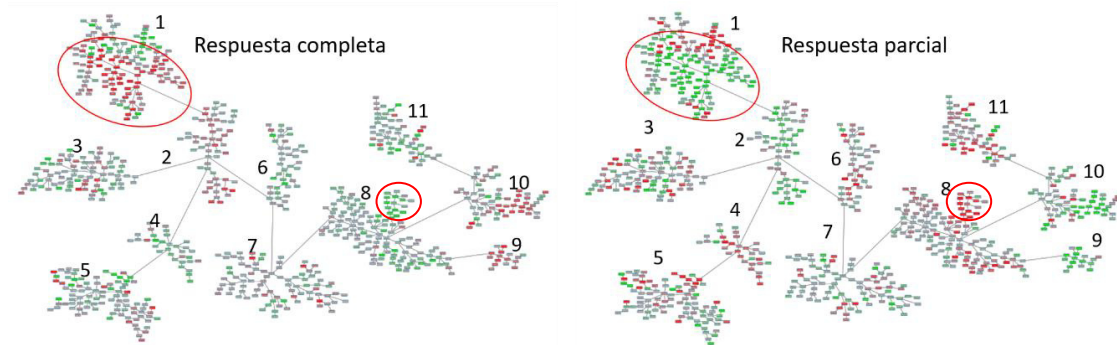


Figura 10. Detalle del nodo con una actividad funcional diferencial entre los grupos de respuesta de las pacientes con tumores TNBC.

El “Nodo 1. Ácidos grasos de cadena larga” presenta una mayor actividad en las pacientes que alcanzaron una respuesta completa (figura 11). Se observa un pequeño grupo de metabolitos en el nodo 8, relacionados con el metabolismo de aminoácidos (principalmente pertenecientes a las rutas de leucina, valina isoleucina y triptófano), que presentan una cuantificación diferencial entre los dos grupos de pacientes. Esta cuantificación es mayor en las pacientes que presentaron una respuesta parcial al tratamiento (figura 11).

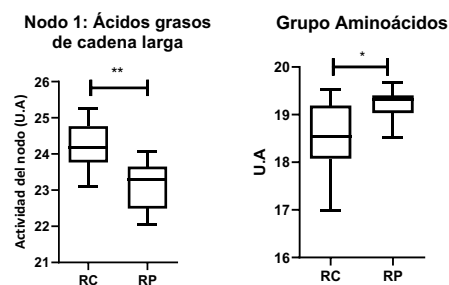


Figura 11. Gráfico del nodo con actividad diferencial entre los grupos de respuesta de las pacientes con tumores TNBC y del grupo de metabolitos localizado en el nodo 8 que presentan una cuantificación diferencial entre los grupos de respuesta.

Con el objetivo de identificar metabolitos con una cuantificación diferencial entre los grupos de respuesta se realizó un análisis SAM (figura 12). Se identificaron once metabolitos diferenciales, que se encontraban en mayor cantidad en las pacientes con RC (figura 13), la mayoría de ellos pertenecientes a la ruta de ácidos grasos de cadena larga, lo que concuerda con la mayor actividad del “Nodo 1. Ácidos grasos de cadena larga” observada en el modelo gráfico probabilístico (Figura 10).

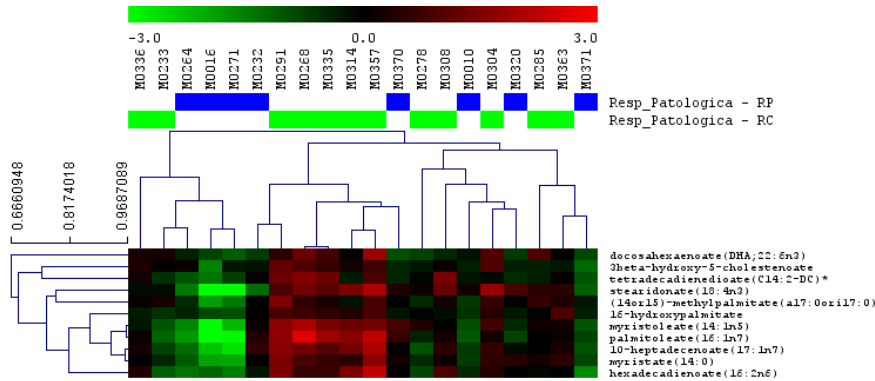


Figura 12. Agrupamiento jerárquico de los metabolitos diferenciales identificados mediante el análisis SAM en las pacientes con tumores TNBC.

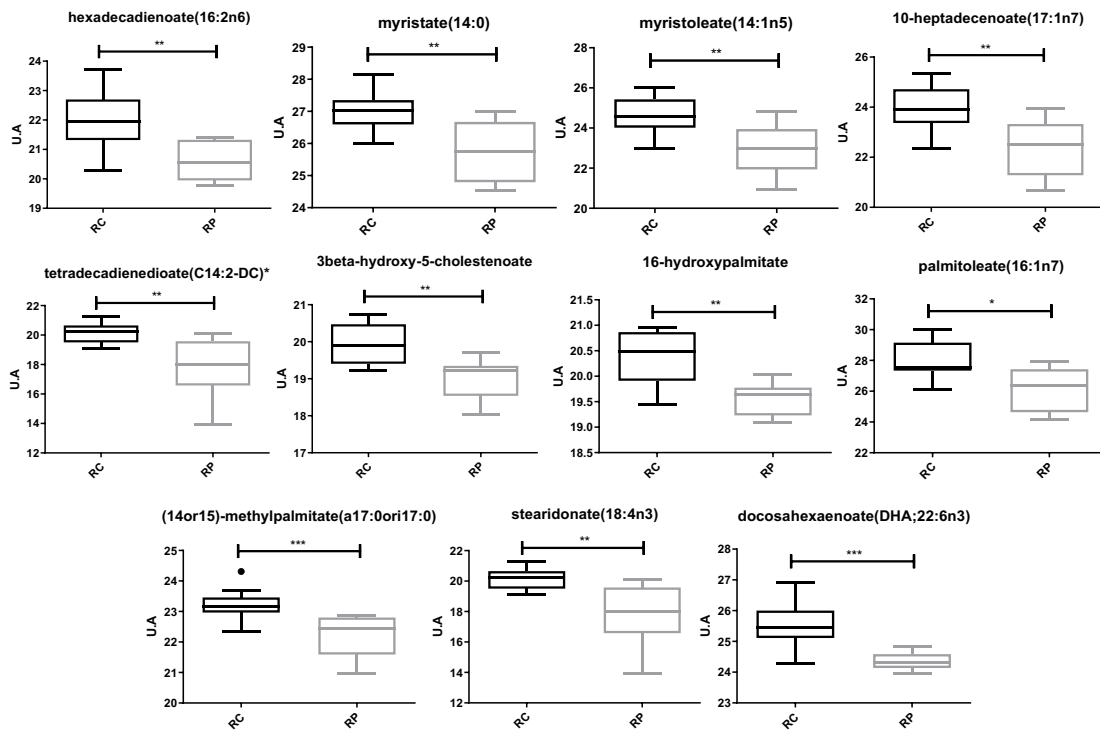


Figura 13. Gráficos de los metabolitos diferenciales identificados mediante el análisis SAM en las pacientes con tumores TNBC.

Resultados

Se realizó un análisis metabo-ontológico de los once metabolitos identificados mediante el análisis SAM con el objetivo de comprobar si alguna ruta metabólica estaba sobre representada. Se identificaron las rutas de ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados (omega-3 y omega-6), ácidos grasos de cadena larga monoinsaturados y ácidos grasos ramificados.

Con el objetivo de obtener una serie de metabolitos cuya cuantificación permita separar la población de pacientes triple negativo en los dos grupos de respuesta al tratamiento (RC y RP), se llevaron a cabo análisis de predicción de clase. Los treinta metabolitos diferencialmente cuantificados a un nivel de significación de 0,01 en un análisis univariante, entre los que se encuentran los once metabolitos identificados mediante el SAM, fueron utilizados para construir el predictor de clase. Todos los metabolitos estaban relacionados con el metabolismo de lípidos, siendo el grupo mayoritario los aquellos relacionados con el metabolismo de ácidos grasos de cadena larga. La lista de metabolitos que componen el predictor se muestra en el Anexo III. El área bajo la curva ROC (AUC) es de 0,844 y el porcentaje medio de clasificaciones correctas es del 79 %.

Respuesta patológica	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
Respuesta completa	0,583	0,5	0,636	0,444
Respuesta parcial	0,5	0,583	0,444	0,636

Tabla 6. Desempeño del predictor de clase de las pacientes con tumores TNBC.

Se realizó el análisis metabo-ontológico de los treinta metabolitos seleccionados por el predictor de clase. El análisis identificó las siguientes rutas metabólicas con una mayor representación: metabolismo de ácidos grasos de cadena larga saturados, monoinsaturados, poliinsaturados (omega-3 y omega-6), ácidos grasos ramificados y metabolismo de ácidos grasos y aminoácidos ramificados.

El grupo de metabolitos relacionado con el metabolismo de ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados, destacando los ácidos omega-3 y omega-6, presenta diferencias en su cuantificación entre las pacientes con tumores TNBC que obtuvieron una respuesta completa y las pacientes que obtuvieron una respuesta parcial al tratamiento.

Pacientes con tumores HER2+

La cohorte contiene veintidós pacientes con tumores HER2+, de las cuales quince obtuvieron una respuesta completa al tratamiento y siete presentaron una respuesta parcial.

Se construyó un modelo gráfico probabilístico utilizando los datos metabolómicos de la muestra basal de las pacientes con tumores HER2+, sin ninguna otra información a priori. La red fue dividida en nueve nodos a los que se les asignó una ruta metabólica mayoritaria en función de los grupos de metabolitos sobre representados en cada uno de ellos (figura 14).

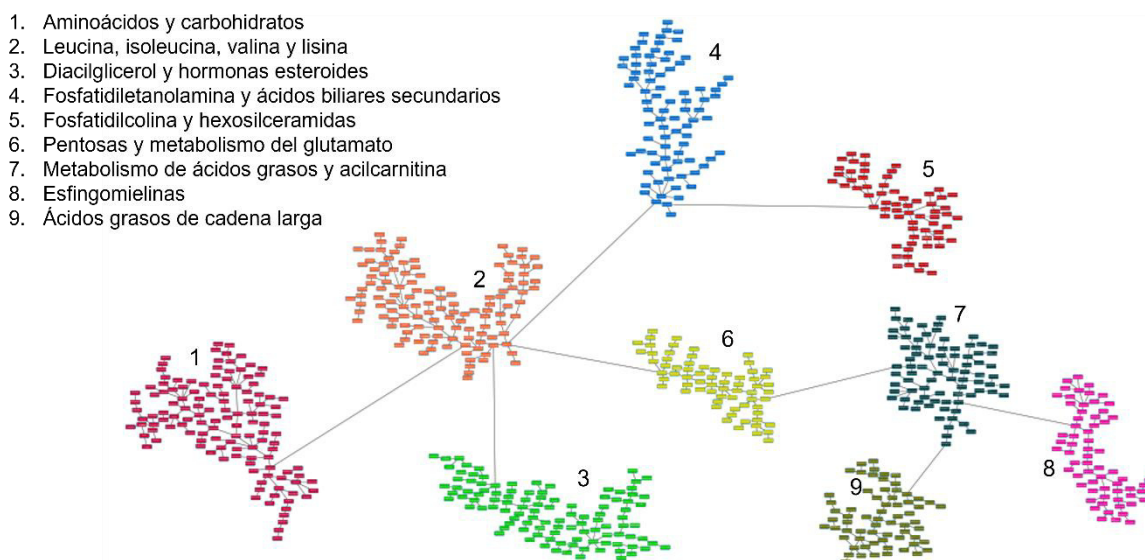


Figura 14. Modelo gráfico probabilístico de las pacientes con tumores HER2+.

Una vez construido el modelo se compararon los grupos de RC y RP. Se observaron diferencias en el “Nodo 1. Aminoácidos y carbohidratos”; en el “Nodo 2: Leucina, isoleucina, valina y lisina” y en el “Nodo 6: Pentosas y metabolismo de glutamato” (figuras 15 y 16). Los tres nodos presentan una mayor actividad en las pacientes con una respuesta parcial. Los gráficos de la actividad de todos los nodos se muestran en el Anexo IV.

Resultados

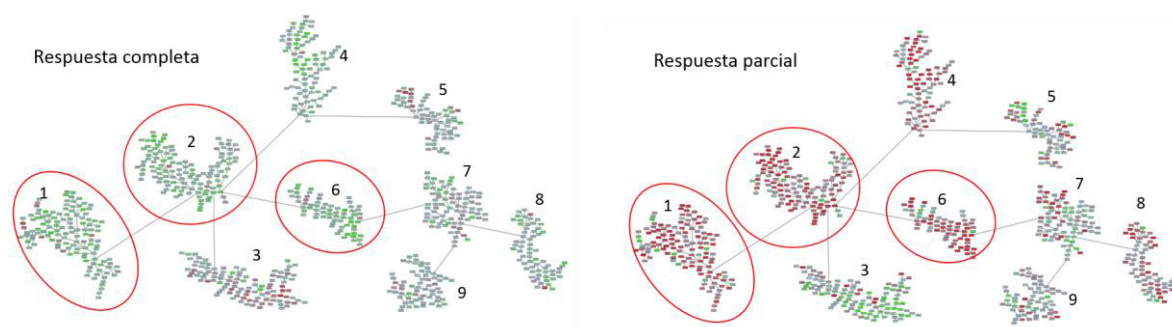


Figura 15. Detalle de los nodos con actividad diferencial entre los grupos de respuesta de las pacientes con tumores HER2+.

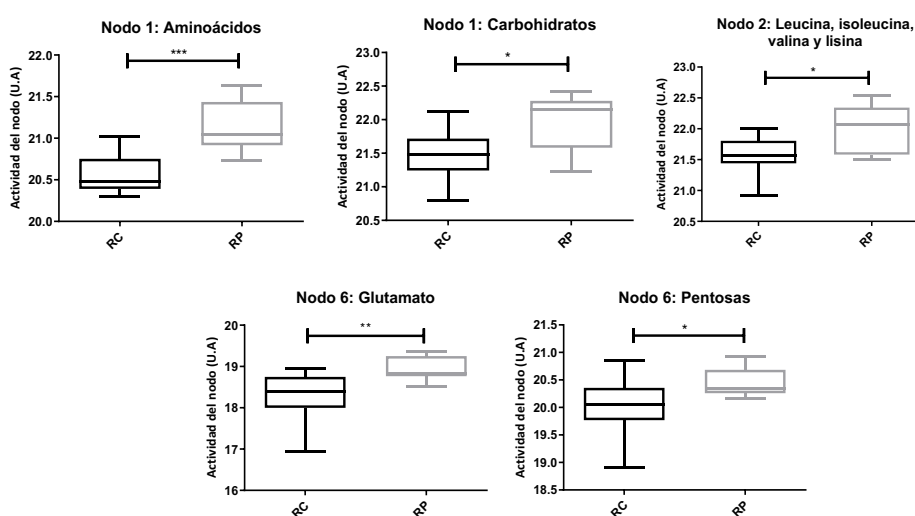


Figura 16. Gráfico de los nodos funcionales con actividad diferencial entre los grupos de respuesta de las pacientes con tumores HER2+.

Se identificaron catorce metabolitos con una cuantificación diferencial entre grupos mediante un análisis SAM. La mayoría de estos metabolitos (diez) estaban relacionados con el metabolismo de aminoácidos, resultado en consonancia con los nodos que mostraron una actividad funcional diferencial en la red (figura 15). A continuación, se representa la cuantificación de los metabolitos identificados mediante el SAM (figura 17 y figura 18). Todos ellos muestran mayor cuantificación en las muestras con respuesta parcial, resultado en consonancia con lo observado previamente.

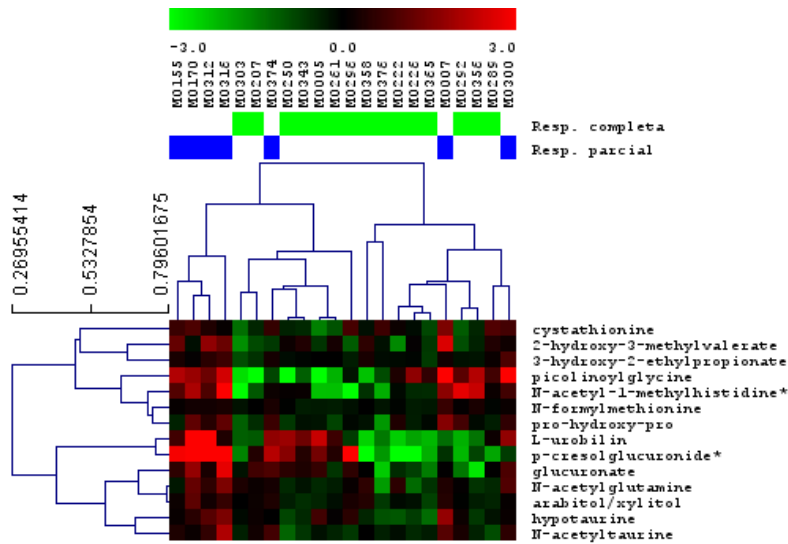
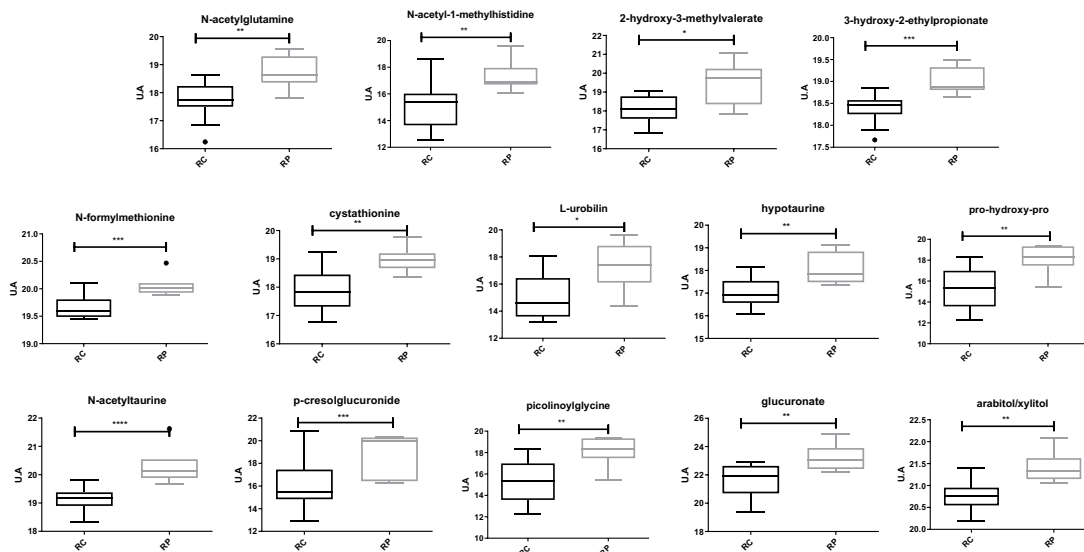


Figura 17. Agrupamiento jerárquico de los metabolitos diferenciales identificados mediante SAM en las pacientes con tumores HER2+.



Fi-

gura 18. Gráficos de los metabolitos con una cuantificación diferencial entre los grupos de respuesta identificados por SAM en las pacientes con tumores HER2+.

Se realizó un análisis metabo-ontológico de los metabolitos identificados mediante el SAM, observándose que la única ruta significativamente sobre representada fue la ruta de metabolismo de la metionina, cisteína, S-adenosilmetionina y taurina.

Se identificaron seis metabolitos diferencialmente cuantificados a un nivel de significación de 0,001, que fueron utilizados para construir el predictor de clase. Cinco de ellos fueron metabolitos relacionados con el metabolismo de aminoácidos y el restante, un metabolito relacionado con el metabolismo de carbohidratos. La tabla de meta-

Resultados

bolitos que componen el predictor se muestra en el Anexo IV. El porcentaje medio de clasificaciones correctas es del 80 % y la AUC= 0,838.

Respuesta patológica	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
Respuesta completa	0,86	0,42	0,76	0,60
Respuesta parcial	0,42	0,86	0,60	0,76

Tabla 7. Desempeño del predictor de clase de las pacientes con tumores HER2+.

También se realizó el análisis metabo-ontológico de los metabolitos identificados mediante el predictor de clase, estando significativamente sobre representadas las rutas de metabolismo de la metionina, cisteína SAM y taurina, la ruta de metabolismo de la leucina, isoleucina y valina (BCAAs) y la ruta de metabolismo de las pentosas.

En todos los análisis realizados en pacientes con tumores HER2+ se observa una diferencia en la cuantificación de metabolitos relacionados con el metabolismo aminoácidos y el metabolismo de carbohidratos, siendo ambos mayores en las pacientes que alcanzaron una respuesta parcial al tratamiento.

Pacientes con tumores Luminales B

La cohorte comprende cuarenta y seis pacientes con tumores luminales B, de las cuales veinticuatro obtuvieron una respuesta completa al tratamiento y veintidós una respuesta parcial.

Se construyó un modelo gráfico probabilístico utilizando los datos metabolómicos de la muestra basal de las pacientes con tumores luminales B, sin ninguna otra información a priori. La red fue dividida en trece nodos funcionales definidos por una o dos rutas metabólicas mayoritarias en función de los grupos de metabolitos sobre representados en cada uno de ellos (figura 19).

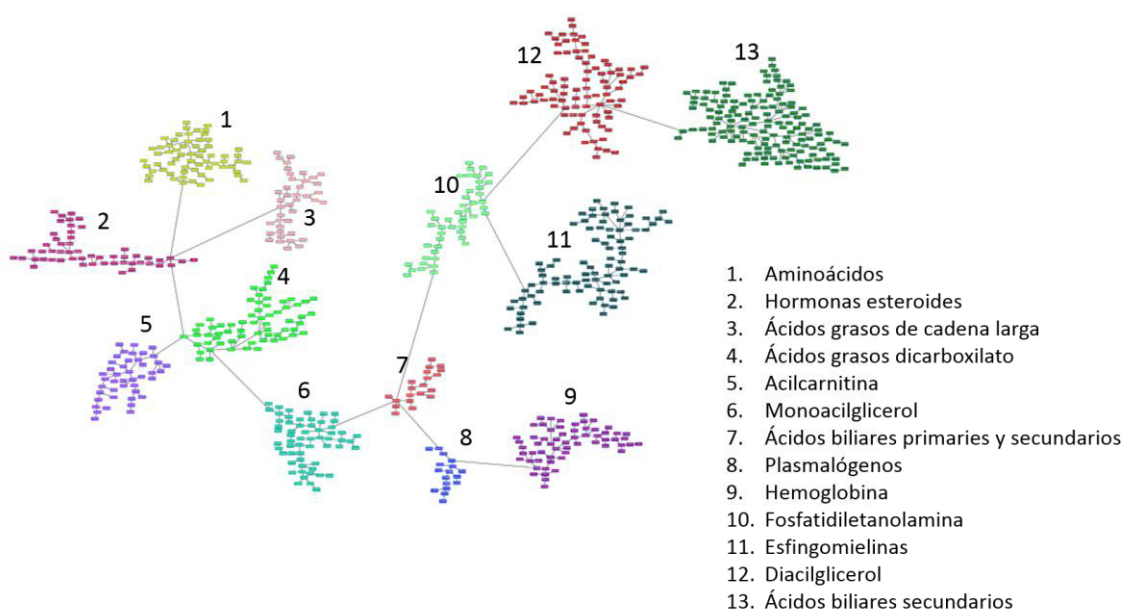


Figura 19. Modelo gráfico probabilístico de las pacientes con tumores luminales B.

Una vez construido el modelo se compararon los grupos de respuesta completa y respuesta parcial al tratamiento, observándose que el “Nodo 5. Acilcarnitinas” presenta una actividad diferencial entre los grupos (figura 20).

Resultados

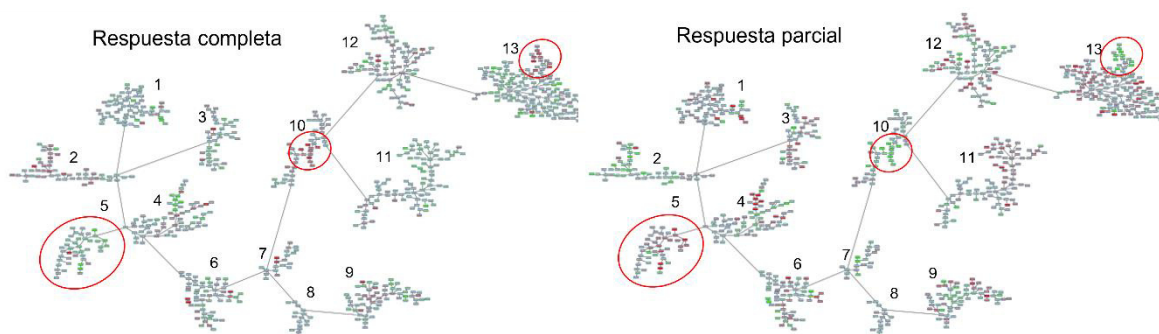


Figura 20. Detalle de los nodos con actividad diferencial entre los grupos de respuesta de las pacientes con tumores con luminales B.

A continuación, se representa la actividad del “Nodo 5. Acilcarnitina”, que presenta una actividad funcional mayor en las pacientes que obtuvieron una respuesta parcial (figura 21). En el modelo gráfico también se observan diferencias en un pequeño grupo de metabolitos (ocho fosfatidiletanolaminas y dos lisofosfolípidos) en el “Nodo 10. Fosfatidiletanolaminas” y en un grupo de metabolitos (ocho metabolitos relacionados con el metabolismo de ácidos biliares secundarios, un metabolito con ácidos biliares primarios, uno con el de tocoferoles, uno con el de la tirosina y un péptido acetilado) en el “Nodo 13. Ácidos biliares secundarios”. Ambos grupos presentan una cuantificación diferencial entre los grupos de respuestas, siendo esta mayor en las pacientes que alcanzaron una respuesta completa en ambos casos. Los gráficos de la actividad de todos los nodos se muestran en el Anexo V.

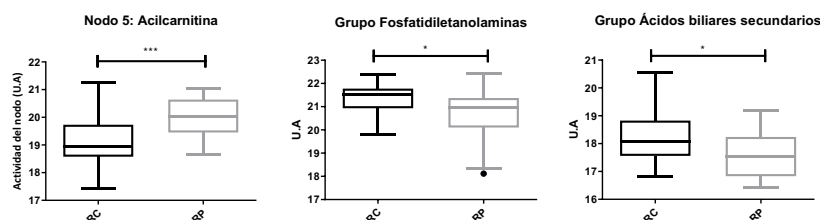


Figura 21. Gráfico del nodo con actividad diferencial y de los dos grupos de metabolitos diferenciales entre los grupos de respuesta de las pacientes con tumores luminales B.

Se identificaron cuatro metabolitos diferenciales mediante SAM, todos ellos relacionados con el metabolismo de lípidos (figura 22 y figura 23). Se realizó un análisis metabo-ontológico de los metabolitos identificados mediante el SAM, observándose que las dos rutas sobre representadas fueron la ruta de metabolismo de ácidos grasos (acilcarnitina monoinsaturada) y la ruta del metabolismo de hexosilceramidas.

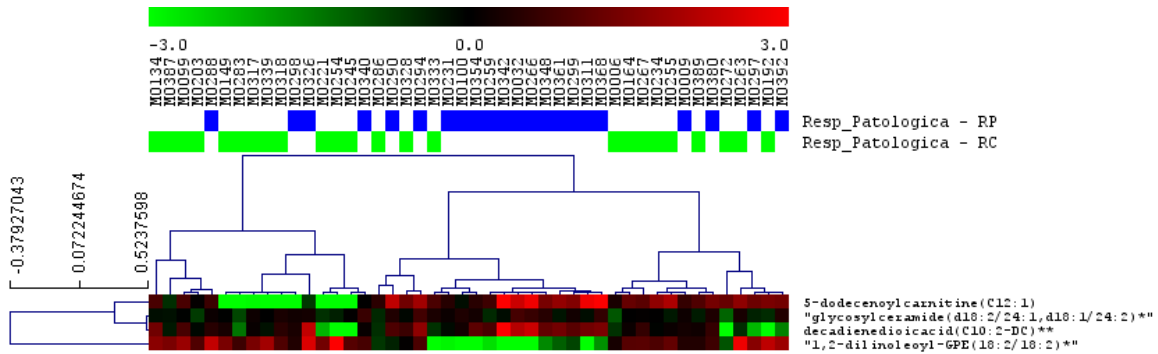


Figura 22. Agrupamiento jerárquico de los metabolitos diferenciales identificados mediante SAM en las pacientes con tumores luminales B.

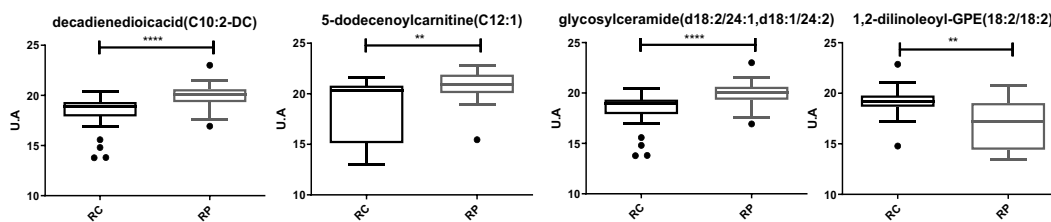


Figura 23. Gráfico de los metabolitos con una cuantificación diferencial entre los grupos de respuesta identificados por SAM en las pacientes con tumores luminales B.

Se identificaron seis metabolitos diferencialmente cuantificados en un análisis univariante a un nivel de significación de 0,001, que fueron utilizados para construir el predictor de clase. De los seis metabolitos, cinco de ellos fueron metabolitos relacionados con el metabolismo de lípidos y el restante un metabolito relacionado con el metabolismo de aminoácidos. La tabla que recoge los metabolitos que componen el predictor se muestra en el Anexo V. El porcentaje promedio de clasificaciones acertadas es del 65 % y la AUC del predictor es 0,714.

Respuesta patológica	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
Respuesta completa	0,33	0,13	0,29	0,15
Respuesta parcial	0,13	0,33	0,15	0,29

Tabla 8. Desempeño del predictor de clase de las pacientes con tumores luminales B.

Se realizó el análisis metabo-ontológico de los metabolitos identificados mediante el predictor de clase, estando significativamente sobre representada la ruta de esfingomielinas.

En las pacientes con tumores luminales B se observa una diferencia en la actividad del nodo funcional del metabolismo de la acilcarnitina relacionada con la respuesta al tra-

Resultados

tamiento. Los análisis de expresión diferencial y el predictor de clase señalan también metabolitos relacionados con el metabolismo de esfingomielinas y de hexosilceramidas como diferenciales entre grupos de respuesta.

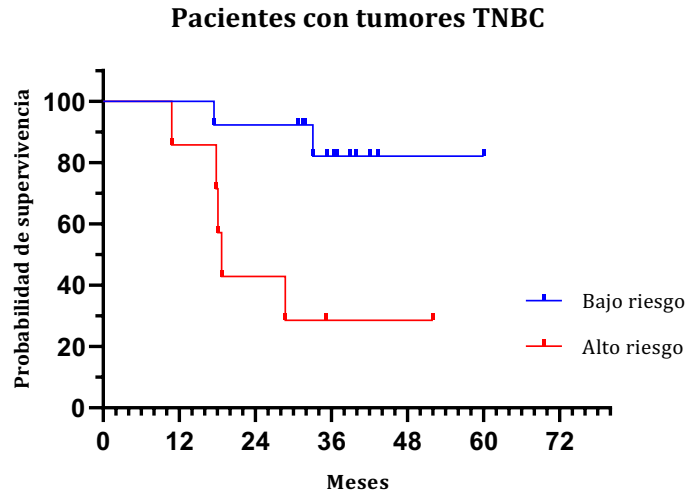
Conclusiones

Tras realizar el análisis entre las pacientes con una respuesta completa y parcial al tratamiento neoadyuvante en función del subtipo tumoral, se observa que existen diferencias en el metaboloma relacionadas con la respuesta al tratamiento, y que estas diferencias son diferentes para cada uno de los subtipos moleculares.

Predicción de recaída tras la cirugía

Se escogió la información metabolómica de las muestras postcirugía de las pacientes con tumores triple negativo para estudiar la recaída tras la cirugía. El tiempo mínimo de seguimiento es de 30 meses. En los tumores triple negativo este periodo de tiempo es suficiente para poder realizar este tipo de análisis, puesto que el riesgo de recaída en este subgrupo es mayor entre el primer y tercer año tras la cirugía. El tiempo se incluyó en meses (se contaron los días desde la fecha de diagnóstico y la fecha de progresión o última revisión). Como última fecha de revisión se anotó la última fecha en la que se recibieron los datos clínicos actualizados.

Se calculó un nivel de significación estadística para cada metabolito en base a un modelo univariante con el fin de identificar los metabolitos cuya expresión estuviera significativamente relacionada con la supervivencia libre enfermedad. Se seleccionaron 16 metabolitos relacionados con la enfermedad libre enfermedad cuyo p-valor fuera menor de 0,05. Posteriormente se establecieron grupos de correlación con el fin de encontrar perfiles reducidos que aportasen la misma información, seleccionando los 2 metabolitos que finalmente conforman el perfil de supervivencia (la acilcarnitina de cadena corta 2-metil-butiril carnitina (C5) y el ácido graso omega-3 eicosapentaenoico (EPA)). El perfil fue sometido a 2.000 permutaciones aleatorias, con un p-valor de permutación 0,0375 (figura 25).



P value	0.0086	**
Hazard Ratio (logrank)		
Ratio (and its reciprocal)	0.1517	6.591

Figura 25. Gráfico *Kaplan Meier* de las pacientes con tumores TNBC en base los grupos de riesgo de recaída.

Una nueva muestra será clasificada como de alto (bajo) riesgo si su índice pronóstico es mayor (menor o igual) que 0,667299. El índice pronóstico puede ser calculado mediante la fórmula $\sum_i w_i x_i - 12,86442$ donde w_i y x_i son los pesos y la cuantificación del metabolito i -th.

Metabolito	Ruta	Sub-ruta	p-valor	Pesos (w_i)
Eicosapentaenoato (EPA)	Lípidos	Ácidos grasos poliinsaturados (omega-3 y 6)	0,013	0,88
2-metil-butiril carnitina (C5)	Aminoácidos	Leucina, Isoleucina y Valina	0,020	-0,34

Tabla 9. Metabolitos que conforman el predictor de recaída.

Modelos mixtos temporales

Se utilizó un modelo mixto lineal generalizado con el objetivo de comprobar si existían diferencias significativas en los niveles de metabolitos entre los tres puntos temporales (basal, precirugía y postcirugía). En primer lugar, se realizó el análisis en la cohorte completa eliminando los efectos de la respuesta al tratamiento y el subtipo para observar la evolución de los niveles de metabolitos a lo largo del tiempo. A continuación, se realizó el análisis mediante modelos mixtos separando a las pacientes en función de su respuesta al tratamiento. Se comparó la tendencia temporal de los metabolitos entre la cohorte completa frente a los grupos de respuesta completa y de respuesta parcial. Curiosamente, los cambios en los niveles de metabolitos ocurren en prácticamente las mismas rutas en los tres grupos (metabolismo de aminoácidos, poliaminas, nucleótidos, pentosas, hemoglobina, hormonas esteroides, corticosteroides, ácidos biliares primarios, carnitinas y acilcarnitinas, algunos ácidos grasos, fosfolípidos y esfingolípidos). Por otra parte, llama la atención que la mayoría de los cambios temporales se producen en el momento precirugía, después de administrar el tratamiento, y que sólo alguno de dichos cambios se mantiene en el momento postcirugía.

Aminoácidos

Los metabolitos relacionados con el metabolismo del glutamato sufren una ligera caída en el momento postcirugía en los grupos RC y RP, mientras que en la cohorte completa mantienen niveles altos desde el momento precirugía (figura 26). Los gamma glutamil aminoácidos sufren una elevación paulatina desde el momento basal al momento postcirugía en los grupos RC y RP mientras que en la cohorte completa se elevan a partir del momento precirugía. El grupo RC no presenta diferencias en los niveles de metabolitos relacionados con la ruta del triptófano. En el grupo RP los niveles de los metabolitos relacionados con la metionina sufren un pico de elevación en el momento precirugía, descendiendo en el momento postcirugía mientras que en la cohorte completa sufren una elevación constante desde el momento basal al momento postcirugía. El grupo RP no presenta diferencias significativas en los cambios de los niveles de los metabolitos relacionados con la ruta de las poliaminas y del ciclo de la urea.

Resultados

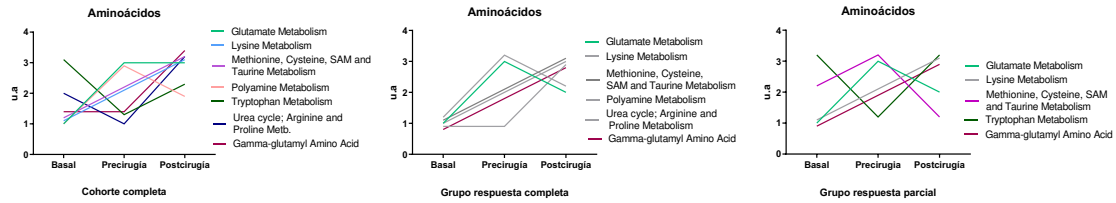


Figura 26. Interpretación gráfica de la tendencia temporal de los metabolitos relacionados con el metabolismo de aminoácidos y poliaminas.

Hemoglobina, pentosas y nucleótidos

El grupo RC presenta diferencias en los niveles de metabolitos relacionados con la ruta de metabolismo de purinas mientras que el grupo RP presenta diferencias con respecto a las pirimidinas (figura 27). En el grupo RP son diferenciales los cambios en los niveles de metabolitos relacionados con la ruta de la fosforilación oxidativa mientras que en la cohorte completa y en el grupo RC son diferenciales los cambios en los niveles de metabolitos relacionados con la ruta de las pentosas. En el grupo RP no son diferenciales los cambios en los niveles de metabolitos relacionados con la ruta de la hemoglobina.

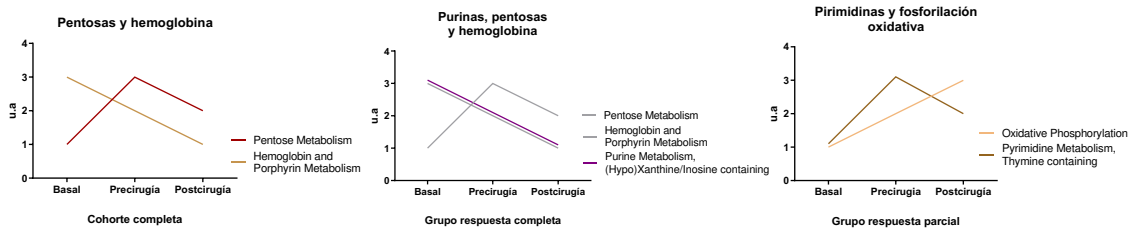


Figura 27. Interpretación gráfica de la tendencia temporal de los metabolitos relacionados con el metabolismo de hemoglobina, pentosas y nucleótidos.

Hormonas esteroides, corticosteroides y ácidos biliares primarios.

Se observa que la ruta metabólica de esteroides es diferencial solamente en el grupo RC que sufre un pico de elevación en el momento precirugía y una posterior caída en el momento postcirugía. En el grupo RP los cambios en los niveles de los metabolitos relacionados con los ácidos biliares primarios no son diferenciales (figura 28). Los metabolitos relacionados con las tres rutas de hormonas esteroides se elevan ligera-

mente en el momento postcirugía en el grupo RP mientras que en cohorte completa se mantiene bajos y en el grupo RC solo se elevan los metabolitos relacionados con las hormonas androgénicas.

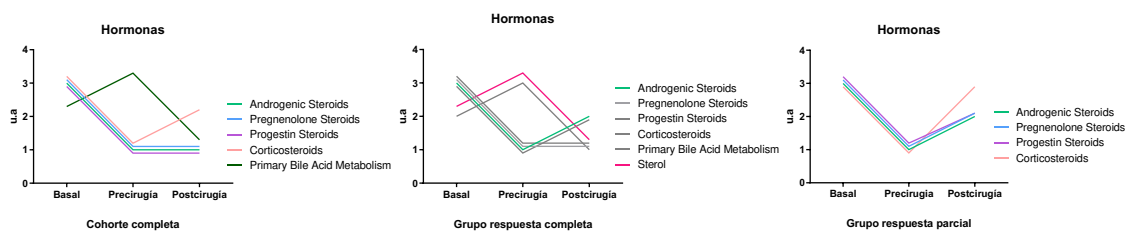


Figura 28. Interpretación gráfica de la tendencia temporal de los metabolitos relacionados con el metabolismo de hormonas esteroides, corticosteroides y ácidos biliares primarios.

Carnitinas y acilcarnitinas

La tendencia temporal de los niveles de metabolitos relacionados con las rutas de carnitina y acilcarnitinas siguen el mismo patrón temporal, con ligeras excepciones (figura 29). En los tres grupos sufren una brusca caída en el momento precirugía desde el momento basal para recuperar dichos niveles en el momento postcirugía. Se observa que hay menos diferencias significativas en los cambios de los niveles de metabolitos relacionados con las carnitinas y acilcarnitina en el grupo de respuesta parcial.

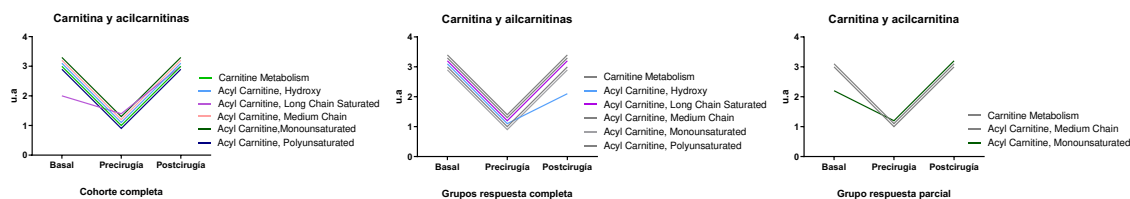


Figura 29. Interpretación gráfica de la tendencia temporal de los metabolitos relacionados con el metabolismo de carnitinas y acilcarnitinas.

Resultados

Ácidos grasos

En cuanto al metabolismo de ácidos grasos, destaca que en el grupo RC no son diferenciales los cambios en los niveles de los metabolitos relacionados con el metabolismo de ácidos grasos y BCAA ni de la ruta de ácidos grasos monohidroxilados (figura 30). Sin embargo, en el grupo RP no son diferenciales los cambios en los niveles de metabolitos relacionados con la ruta del monoacilglicerol.

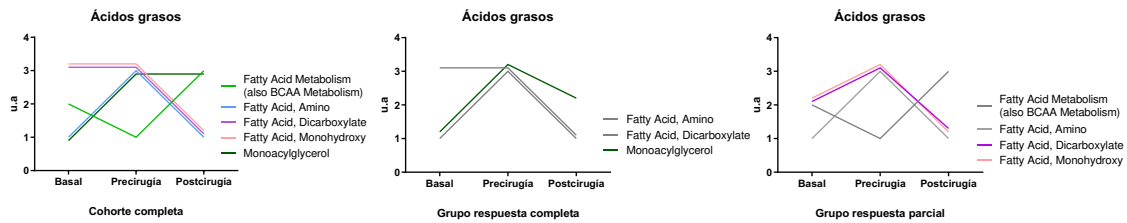


Figura 30. Interpretación gráfica de la tendencia temporal de los metabolitos relacionados con el metabolismo de ácidos grasos.

Fosfolípidos

En el grupo RC se observa que no hay diferencias significativas en los cambios temporales de los metabolitos relacionados con la ruta de lisofosfolípidos (figura 31). En los grupos RC y RP los niveles de metabolitos relacionados con las esfingomielinas disminuyen desde el momento basal al precirugía elevándose en el momento postcirugía mientras que en la cohorte completa se mantienen bajos en el momento basal y se elevan a partir del momento precirugía. En el grupo RP son diferenciales los cambios en los niveles de los metabolitos relacionados con el metabolismo de glicerolípidos.

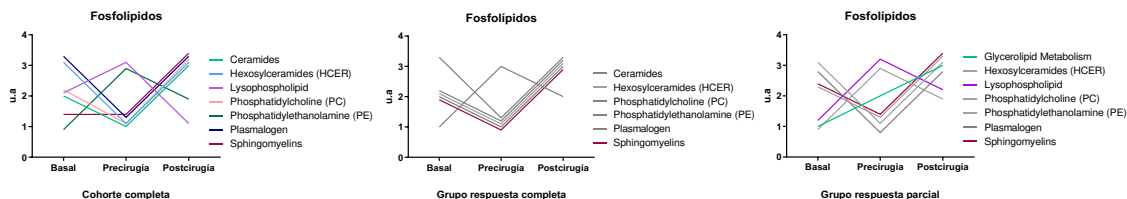


Figura 31. Interpretación gráfica de la tendencia temporal de los metabolitos relacionados con el metabolismo de fosfolípidos.

DISCUSIÓN

Discusión

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar el potencial de la metabolómica como herramienta para el manejo clínico de las pacientes con cáncer de mama que van a recibir un tratamiento neoadyuvante. El proyecto se ha centrado en la búsqueda de biomarcadores en sangre que posean capacidad predictiva de la respuesta al tratamiento neoadyuvante. Los resultados hallados en el estudio de la cohorte completa junto con el conocimiento existente sobre la heterogeneidad que subyace al cáncer de mama llevaron a la realización de los análisis por separado en base al subtipo tumoral. Por otra parte, se realizó un análisis a lo largo de los tres puntos temporales (basal, precirugía y postcirugía) con el objetivo de observar el patrón de variación en los niveles de los metabolitos a lo largo del tiempo. Finalmente, se realizó un análisis de predicción de supervivencia empleando la muestra post quirúrgica dentro del subtipo TNBC. El análisis identificó dos metabolitos con capacidad de discriminar a las pacientes con alto riesgo de recaída a tres años de aquellas con un bajo riesgo. Este resultado da pie a estudiar la posibilidad de generar una herramienta molecular basada en un análisis de sangre que permita predecir la recaída a largo plazo de las pacientes tras la cirugía, ayudando al manejo clínico de estas en cuanto a la administración o no de terapias adyuvantes y permitiendo plantear estrategias terapéuticas diferentes en las pacientes con alto riesgo.

El estudio de una enfermedad tan heterogénea como el cáncer de mama con una nueva tecnología como es la metabolómica, supone un gran reto tanto técnico como metodológico. En este trabajo se ha evaluado el metaboloma sanguíneo de 103 pacientes con cáncer de mama sometidas a tratamiento neoadyuvante, analizándose más de 300 muestras de plasma, y se han identificado y cuantificado 985 metabolitos diferentes en estas muestras, siendo este, posiblemente, el estudio metabolómico de una serie clínica de cáncer de mama más amplio y ambicioso realizado hasta la fecha. Teniendo en cuenta la necesidad de estudiar la enfermedad en base a su subtipo molecular, se han podido establecer tres subgrupos homogéneos y suficientes para realizar el estudio separándolos posteriormente en función de su respuesta al tratamiento. La identi-

ficación de una gran cantidad de metabolitos también ha permitido realizar el estudio abordándolo desde una perspectiva de biología de sistemas mediante modelos gráficos probabilísticos y, por otro lado, tener una imagen muy completa del metaboloma humano, comprendiendo la enorme variedad de rutas metabólicas que tienen lugar en el organismo y de los cambios temporales que se producen debido al tratamiento. Destacar además que este estudio es uno de los pocos que aborda la comparación de distintos subtipos tumorales entre sí en lugar de comparar muestras de tumores o subtipos tumorales frente a muestras control.

Se ha realizado además un gran esfuerzo desde el punto de vista analítico, utilizando análisis computacionales no utilizados previamente en análisis metabolómico, como modelos gráficos probabilísticos y modelos mixtos lineales generalizados. Ambas técnicas han permitido realizar el estudio desde un punto de vista funcional, necesario para manejar la enorme cantidad de información que proporcionan las técnicas ómicas de alto rendimiento.

Diferencias en el metaboloma entre subtipos tumorales

Nuestros resultados sugieren que existen diferencias en el metaboloma entre las pacientes con distintos subtipos moleculares (TNBC, HER2+, lumbinales A y lumbinales B), pero lejos de las diferencias que se observan cuando se emplean otras ómicas, como la transcriptómica o la proteómica^{36,114}. Un estudio previo de esta cohorte de pacientes mostró que existen diferencias al comparar el metaboloma de pacientes con cada uno de los subtipos con sujetos control, y que estas diferencias son específicas de cada subtipo¹¹⁵, destacando las lisofosfatidiletanolaminas, la biliverdina y el triptófano, entre otros metabolitos. Se podría pensar que el diseño del estudio (cuatro grupos y un número de pacientes limitado) no permite detectar otras diferencias, pero también es posible que el impacto a nivel fisiológico de la presencia del tumor sea más homogéneo que las diferencias moleculares tumorales entre los distintos subtipos. En nuestro trabajo, esta heterogeneidad aparece cuando se analiza la respuesta al tratamiento en cada uno de los subtipos por separado, apreciándose el enorme impacto que supone el tratamiento quimioterápico a nivel fisiológico. Por este motivo, y junto con el conoci-

miento existente sobre las diferencias entre los subtipos moleculares, se decidió estudiar el perfil metabolómico asociado a la respuesta al tratamiento tanto en la cohorte completa como dentro de cada uno de los subtipos moleculares por separado, con el objetivo de analizar grupos de pacientes lo más homogéneos posible.

Todas estas observaciones en conjunto sugieren que la metabolómica es una gran herramienta para monitorizar la evolución de las pacientes, pero no es la mejor ómica para evaluar diferencias entre grupos de tumores.

Predicción de la respuesta al tratamiento en la cohorte completa

El estudio de la cohorte completa mediante modelos gráficos probabilísticos no dirigidos señala diferencias en la actividad funcional del “Nodo 1. Aminoácidos” y “Nodo 6. Fosfolípidos”. Ambas actividades son mayores en las pacientes que alcanzaron una respuesta parcial.

Este resultado podría sugerir que las pacientes que presentan una respuesta parcial poseen tumores más proliferativos y tienen una mayor demanda de aminoácidos y lípidos y, por tanto, mayores niveles de estos en sangre. Las alteraciones metabólicas en el metabolismo de lípidos y aminoácidos son un conocido marcador de cáncer. En particular, una alta expresión de la translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36), encargada de introducir ácidos grasos a los tejidos, a las células y a las mitocondrias^{116,117}, ha sido correlacionada con una peor prognosis en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama¹¹⁸, y con un mayor potencial de metástasis en modelos murinos de cáncer oral¹¹⁹. En la literatura ha sido descrito previamente que la alta proliferación de las células cancerígenas requiere grandes cantidades de lípidos como componentes de las membranas celulares, como fuente de energía requerida para el crecimiento y la división celular, para mantener el balance redox, como segundos mensajeros e incluso como remodeladores del microambiente tumoral^{120,121}. Los aminoácidos desempeñan muchas funciones esenciales en las células tumorales como la producción de aminoácidos no esenciales, la biosíntesis de proteínas, su conversión en glucosa, lípidos y precursores de metabolitos que contienen nitrógeno (como las purinas y pirimidinas)

y la síntesis de ácidos nucleicos. También actúan como señales de nutrientes, activando vías importantes como mTOR o la autofagia, como neurotransmisores, como donantes de grupos metilo, producen energía mediante alfa-cetoácidos y el ciclo TCA, mantienen el balance redox, etc.^{122,123}.

Por otro lado, podría ser reflejo de una respuesta global del organismo a la presencia del tumor, lo que influye sistémicamente en la utilización de aminoácidos y lípidos. Los análisis de enriquecimiento señalan la ruta de la alanina y asparagina como rutas sobre representadas. La alanina extracelular está implicada en la activación de linfocitos T y de linfocitos T de memoria¹²⁴, existiendo una competición por ella, y otros nutrientes, entre el tumor y el sistema inmune¹²⁵. La asparagina se ha descrito como diana terapéutica en leucemia linfoblástica aguda infantil¹²⁶ y su disponibilidad está relacionada con el potencial metastásico en cáncer de mama¹²⁷.

Predicción de respuesta al tratamiento por subtipo

Pacientes con tumores TNBC

Tanto en el análisis mediante modelos gráficos probabilísticos, como en el análisis de expresión diferencial (SAM) y el predictor de clase, el grupo de ácidos grasos de cadena larga, con especial importancia de los ácidos grasos omega-3 y omega-6, presentan una cuantificación mayor en las pacientes que obtuvieron una respuesta completa frente a las pacientes que obtuvieron una respuesta parcial al tratamiento.

Una alta ingesta de ácidos grasos omega-3 con respecto a omega-6 se ha asociado a un menor riesgo de padecer cáncer de mama^{128,129}, observándose una disminución en proteínas asociadas con la actividad tirosina quinasa¹³⁰. Sin embargo, ácidos grasos omega-3, como el ácido eicosapentaenoico, pueden promover la biogénesis mitocondrial y con ello, el crecimiento tumoral¹³¹. Además, una ingesta elevada de ácidos grasos omega-6 con una concomitante baja ingesta de ácidos grasos omega-3 conduce a un exceso de eicosanoides pro-inflamatorios y a una menor capacidad para resolver el proceso inflamatorio, el cual ha sido asociado al riesgo de cáncer de mama^{132,133}. En este trabajo se observan mayores niveles de ácidos omega-6 con respecto a los ome-

ga-3 en las pacientes con tumores triple negativo, cómo también se describe previamente¹³⁴, y de ambos ácidos omega-3 y omega-6 en las pacientes con tumores TNBC que obtuvieron una respuesta completa. Mayores niveles de omega-6 podría favorecer el crecimiento tumoral¹³⁵ y paradójicamente, aumentar la sensibilidad a la quimioterapia de estos tumores al ser más proliferativos. En base a nuestro conocimiento, este es el primer trabajo donde se relacionan los niveles de ácidos grasos de cadena larga con la respuesta a la quimioterapia en cáncer.

Se ha visto que el metabolismo de ácidos grasos constituye una parte esencial del fenotipo metabólico de los tumores triples negativos, siendo importante en la progresión tumoral y habiéndose observado además una sobreexpresión de la sintasa de ácidos grasos en las células TNBCs¹³⁶. Por otro lado, entre el 9 % y el 15 % de los tumores triple negativo presentan una mutación en el gen *BRCA1*¹³⁷. Este gen supresor de tumores está relacionado con la regulación de la síntesis de lípidos mediante la unión de su proteína a la enzima acetil-coa carboxilasa alfa (ACCA), encargada de regular la síntesis de ácidos grasos de cadena larga y su oxidación, en su forma inactiva (fosforilada), evitando así su activación por desfosforilación. Por tanto, mutaciones en *BRCA1* conllevan una supresión de función de ACCA que provoca un aumento en la síntesis de lípidos. La enzima sintasa de ácidos grasos (FAS) constituye una encima clave por debajo de ACCA, observándose efectos antitumorales mediante su inhibición^{138,97}. En células de cáncer de mama triple negativo también ha observado que la expresión de CDCP1 (antígeno de superficie celular con un dominio CUB), que regula el metabolismo de lípidos estimulando la oxidación de ácidos grasos y la fosforilación oxidativa, favorece la migración celular y se ha establecido como un marcador de peor pronóstico¹³⁹.

Pacientes con tumores HER2+

En los análisis realizados se observa una mayor cantidad de metabolitos relacionados con rutas de aminoácidos y de carbohidratos en las pacientes que presentaron una respuesta parcial al tratamiento frente a aquellos que obtuvieron una respuesta completa al mismo.

Discusión

Al igual que en el análisis de la cohorte completa, los mayores niveles de metabolitos relacionados con rutas de aminoácidos en las pacientes que obtuvieron una respuesta parcial podrían indicar tumores más proliferativos^{140, 141}, puesto que las células tumorales utilizan los aminoácidos para mantener su crecimiento. Además de su utilización como sustrato para la síntesis de proteínas, los aminoácidos, con especial importancia de los aminoácidos ramificados (BCAAs), sirven como fuente de energía, intervienen en la síntesis de lípidos, en la síntesis de nucleósidos, en la modificación de histonas, en la respuesta inmune y en el mantenimiento del balance redox celular, como el glutamato^{140,142}. Altos niveles de BCAAS pueden desembocar en hiperinsulemia y resistencia a la insulina, procesos que promueven el desarrollo tumoral¹⁴³. Dentro de los BCAAs, ciertos aminoácidos como la leucina y la metionina tienen una gran importancia, ya que se ha visto que regulan mTOR y promueven el crecimiento y la supervivencia celular¹⁴⁴. Se ha descrito previamente que la sobreexpresión de transportadores de aminoácidos y un aumento en la capacidad de captación de éstos es común en tumores. También se han identificado altos niveles de BCAAs en plasma como marcadores tempranos de adenocarcinoma pancreático¹⁴⁵.

En este estudio, dentro de los metabolitos identificados como diferenciales entre grupos de respuesta, la ruta metabólica de la metionina, cisteína, S-adenosilmetionina y taurina está sobre representada. Las tres funciones de la metionina con mayor relevancia en cáncer son: la formación de glutatión, que mantiene el balance redox celular, la síntesis de poliaminas y la donación de grupos metilo (metilación)¹⁴⁶. La metionina también actúa como un sensor del estado nutricional a través de las proteínas SAMTOR y mTORC1 y está relacionada con el ciclo del folato mediante la contribución de homocisteína¹⁴⁷. Muchas células tumorales pierden la metionina sintasa y por tanto presentan una dependencia de metionina exógena para su supervivencia, convirtiendo la restricción de metionina en una posible diana terapéutica^{148,149}. En cuanto a la cisteína, se ha observado que una expresión elevada del transportador de cisteína SLC3A1 promueve el crecimiento tumoral en cáncer de mama¹⁵⁰, y que niveles altos de cisteína en plasma están asociados a un mayor riesgo de desarrollar la cáncer de mama¹⁵¹. Sin embargo, la suplementación con N-acetil cisteína demostró tener un

efecto antiproliferativo en cáncer de mama¹⁵². En estudios metabolómicos previos se describió que los tumores HER2+ muestran predominantemente alteraciones en el metabolismo de la glucosa y la glutamina, como también destacó nuestro grupo previamente^{104,105}. Este estudio también señala diferencias en los niveles de metabolitos relacionados con el metabolismo de las pentosas entre grupos de respuesta, cuya importancia como fuente energética y de poder reductor (NADPH) en cáncer ha sido ampliamente descrita^{153,154}, así como la importancia del metabolismo de carbohidratos en la proliferación celular^{155,156}, en la metastasis¹⁵⁷ y en el ambiente pro-tumoral¹⁵⁸.

Pacientes con tumores Luminales B

En el grupo de pacientes con tumores luminales B con una respuesta parcial se observa una mayor actividad funcional del “Nodo 5: Acilcarnitina”. Los metabolitos diferenciales identificados mediante el análisis de expresión diferencial (SAM) y el predictor de clase son metabolitos relacionados con el metabolismo de hexosilceramidas, esfingomielinas, fosfatidiletanolaminas y ácidos grasos, los cuales presentan también una cuantificación mayor en las pacientes con respuesta parcial.

Una mayor actividad del “Nodo 5. Acilcarnitina” puede indicar una mayor entrada de ácidos grasos de cadena larga y media en las células. El sistema carnitina, el cual incluye la L-carnitina, acilcarnitinas y enzimas relacionadas, es un mediador importante en las redes metabólicas del cáncer. El sistema entrelaza metabolitos, vías y factores que suplen las demandas biosintéticas y energéticas de las células tumorales¹⁵⁹. Las acilcarnitinas son intermediarios provenientes del metabolismo de ciertos aminoácidos¹⁴⁰, y de la activación de los ácidos grasos parte de las carnitina aciltransferasas para su transporte al interior de las mitocondrias¹⁶⁰. Por tanto, altos niveles de acilcarnitinas en sangre se asocian a una mayor b-oxidación de ácidos grasos de cadena larga^{161,162}. Varias acilcarnitinas, entre las que destacan las carnitinas C3, C4, C5, C6 y C18, fueron detectadas en una mayor concentración en el plasma de pacientes de cáncer de mama¹⁶³, y también en tejido tumoral en comparación con tejido adyacente normal¹⁵⁹. Altos niveles de acilcarnitina C2 están asociados a un mayor riesgo de pa-

Discusión

decer cáncer de mama¹⁶⁴, y también a hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. Ambos mecanismos, a su vez, están asociados al desarrollo del cáncer de mama¹⁴³. Se ha observado también una concentración elevada de varias acilcarnitinas en cáncer de riñón, lo que sugiere que la concentración de ciertas acilcarnitinas podría llegar a ser un prometedor marcador tumoral¹⁶⁵. En otros estudios, se ha observado una acumulación significativa de palmitoilcarnitina, estearoilcarnitina y oleoilcarnitina en pacientes con tumores luminales B en comparación con otros subtipos de cáncer de mama. Esto sugiere una conjugación de los ácidos grasos de cadena larga con la carnitina para su transporte a la mitocondria y su posterior oxidación^{104, 166}.

Por otra parte, en este trabajo se han observado también diferencias en los niveles de ciertos lípidos, como las esfingomielinas y las hexosilceramidas. Las esfingomielinas juegan un papel importante en la regulación del crecimiento y diferenciación celular. Algunos metabolitos de señalización como ceramidas, esfingosinas y la esfingosina 1 fosfato (S1P) están implicadas en el ciclo celular y poseen un rol anti-apoptótico y pro-tumoral^{167,168}. De hecho, se detectaron mayores niveles de ceramida sintasa y varias ceramidas en tejido de cáncer de mama en comparación con el tejido normal adyacente, siendo detectadas en mayor cantidad en etapas tempranas del cáncer, mostrando un continuo decrecimiento desde las pacientes en estadio I a las pacientes en estadio VI¹⁶⁹. Las ceramidas también están relacionadas con la resistencia a insulina¹⁷⁰, aspecto asociado a un mayor riesgo de aparición de tumores.

Ciertos tumores receptores hormonales positivos (*TN-like*) tienen una expresión proteica y una evolución clínica más cercana a los tumores receptores hormonales negativos³⁶. Sería interesante contar con la información de expresión génica y la cuantificación de proteínas de las pacientes con tumores luminales B para clasificar y estudiar grupos más pequeños y molecularmente homogéneos si los hubiera.

Predicción de recaída tras la cirugía

Una respuesta completa patológica tras la neoadyuvancia puede constituir marcador de mejor pronóstico en las pacientes con tumores TNBC. Varios estudios sugieren que puede ser un marcador subrogado de la supervivencia y de la respuesta a largo plazo, aunque solo si la RC es definida como ausencia de enfermedad residual en la mama y en la axila^{66,171}. En esta cohorte de pacientes, una de las siete recaídas había alcanzado una respuesta completa patológica, clasificada como MP5 según el índice Miller & Payne. Tres de las pacientes que recayeron obtuvieron una respuesta patológica parcial, una MP4 y dos MP3. El predictor de supervivencia construido clasifica tres pacientes que alcanzaron una respuesta completa (MP5) y tres pacientes con una respuesta parcial (dos MP3 y una MP4) como pacientes de alto riesgo de recaída. Por tanto, aunque alcanzar una respuesta patológica completa mejora en gran medida la prognosis de las pacientes, este resultado pone de manifiesto que es de indiscutible necesidad adelantarse a las recaídas que puedan suceder en las pacientes que alcanzan una respuesta completa.

El predictor de supervivencia está compuesto por dos metabolitos, una acilcarnitina de cadena corta, la 2-metil butiril carnitina (C5) y un ácido graso de cadena larga omega-3, el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5n3). De acuerdo con el predictor, el EPA se encontraría elevado en las pacientes con un alto riesgo mientras que los niveles de la acilcarnitina estarían disminuidos.

Los ácidos grasos insaturados de cadena larga omega-3, como el ácido eicosapentaenoico (EPA), pueden estimular la fosforilación y la activación de la señalización de AMPK y con ello, la expresión del coactivador del receptor activado por proliferadores peroxisomales (PGC1- α) en los adipocitos subcutáneos humanos, lo que provoca un aumento de la biogénesis mitocondrial¹³¹. Dicho aumento de la biogénesis mitocondrial se ha visto relacionado con una mayor proliferación tumoral^{172,173,174} y es una característica de las células madre de cáncer de mama¹⁷⁵. Por tanto, altos niveles de EPA podrían conllevar un mayor riesgo de recaída en el futuro. Por otra parte, también se ha observado una desregulación en cáncer de las sintetasas de ácidos grasos

Discusión

de cadena larga (ACSLs)^{176,177}, lo que podría contribuir a un aumento de EPA en sangre de las pacientes de alto riesgo de recaída.

La 2-metil-butiril carnitina C5 ha sido asociada previamente a un mayor riesgo de padecer cáncer de mama en pacientes postmenopáusicas con tumores ER+¹⁷⁸. Esta acilcarnitina es uno de los intermediarios de la ruta del metabolismo de aminoácidos ramificados (BCAAs), los cuales están implicados en la regulación de la insulina, el ciclo TCA, la glicolisis y la oxidación de ácidos grasos, la inflamación y la biogénesis mitocondrial¹⁴⁰, procesos que pueden promover el crecimiento tumoral y aumentar el riesgo de recaída. Las alteraciones en los niveles de 2-metil-butiril carnitina C5 se han estudiado previamente en cáncer endometrial, donde se han observado niveles altos de 2-metil-butiril carnitina C5 en muestras de suero precirugía en comparación con muestras de pacientes control. Se registró también un aumento de lípidos conjugados incluyendo acilcolinas, monoacilgliceroles y acilcarnitinas, y una disminución de ácidos grasos libres¹⁷⁹. En otro estudio en cáncer endometrial también se observaron modificaciones en los niveles de 2-metil-butiril carnitina C5 (o isovalericarnitina C5), la cual estaba alterada en todos los tumores en comparación con los casos control³⁴. Los niveles altos de la acilcarnitina (C5) son uno de los marcadores que se utilizan para la detección precoz errores congénitos del metabolismo en neonatos, como la acidemia isovalérica¹⁷⁶.

El metabolismo de la carnitina puede suponer una diana terapéutica. En esta línea, ya se está estudiando el agente etomoxir, inhibidor de la enzima carnitina palmitoil transferasa I (CPT1), que es responsable de la importación mitocondrial de ácidos grasos mediada por la lanzadera de carnitina¹⁸⁰. Dicha inhibición disminuye los niveles de ATP intracelular así como la viabilidad celular en el glioblastoma y afecta el crecimiento tumoral, por lo que se ha propuesto como posible opción terapéutica para el cáncer de mama¹⁸¹, próstata, glioblastoma, cáncer colorrectal, gástrico y mieloma, así como en modelos preclínicos^{104,182,183}.

Análisis de la evolución temporal de los niveles de los metabolitos

Los modelos mixtos temporales empleados muestran que la mayoría de los cambios en los niveles de los metabolitos se producen en la muestra de precirugía -después del tratamiento- lo que sugiere que son provocados por el tratamiento neoadyuvante. Los cambios observados en las rutas de hormonas esteroides (hormonas androgénicas, pregnolenona y progestina), la ruta del glutamato y la ruta de los monoacilgliceroles se mantienen en el momento postcirugía, lo que podría estar asociado a la desaparición del tumor. Sorprendentemente, todos estos cambios son independientes de la respuesta al tratamiento alcanzada por las pacientes. En relación con el tratamiento, observamos que los cambios en los niveles de los metabolitos pertenecientes a la ruta metabólica de las purinas y la ruta de esteroides son diferenciales únicamente en pacientes con respuesta completa, mientras que cambios en los niveles de metabolitos de las rutas de fosforilación oxidativa, de pirimidinas y de glicerofosfolípidos son diferenciales tan solo en las pacientes con una respuesta parcial.

En base a nuestro conocimiento, es la primera vez que se aborda desde una perspectiva ómica el impacto fisiológico que produce el tratamiento neoadyuvante en el organismo. Anteriormente se ha descrito un aumento en los niveles de triglicéridos y una disminución en los niveles de HDL en pacientes con cáncer de mama mediante lipídica, que revirtieron al concluir el tratamiento¹⁸⁴. En otro estudio se midió prospectivamente la concentración de 27 aminoácidos, antes del tratamiento y tras cada ciclo de quimioterapia con cisplatino, en pacientes con tumores de pulmón y cabeza y cuello. Se observó un rápido aumento de la mayoría de los aminoácidos medidos. Dicho aumento fue significativamente mayor para 17 aminoácidos en los sujetos que respondieron a la terapia en comparación con los que no respondieron¹⁸⁵. También se han estudiado los cambios en los niveles de aminoácidos en pacientes con cáncer de mama antes y después de la cirugía, observándose mayores niveles de aminoácidos tras ésta¹⁸⁶. Un estudio en tejido tumoral mediante espectroscopia de resonancia magnética mostró que las pacientes que alcanzaron una respuesta completa o casi completa a la terapia neoadyuvante tenían niveles altos de glucosa y lactato, y niveles

bajos de creatina, glicina, taurina, glicerofosfocolina, fosfocolina, colina, succinato y alanina en el momento de la cirugía¹⁸⁷.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el impacto de la neoadyuvancia es muy superior a cualquier otro rasgo de los tumores en los cambios temporales de los niveles de metabolitos. Las implicaciones de este impacto serán estudiadas en un futuro proyecto, así como si son consecuencia de una respuesta por parte del tumor, del organismo o por parte de ambos, aspectos que se escapan de los objetivos establecidos para esta tesis doctoral.

Resumen de los resultados más relevantes

En el estudio de la cohorte completa, mediante modelos gráficos probabilísticos no dirigidos y el análisis de expresión diferencial, se observa que existen diferencias entre los grupos de respuesta completa y respuesta parcial en la actividad del nodo funcional de metabolismo de aminoácidos, del nodo relacionado con el metabolismo de fosfolípidos y en ciertos carbohidratos. Sin embargo, dentro de cada uno de los subtipos tumorales, los metabolitos diferenciales pertenecen a diferentes rutas. Son diferenciales los niveles de metabolitos relacionados con el metabolismo de ácidos grasos de cadena larga en las pacientes con tumores TNBC. Sin embargo, en las pacientes con tumores luminales B las diferencias se observan en los niveles de metabolitos relacionados con el metabolismo de acilcarnitinas, de esfingomielinas y de hexosilceramidas. Las diferencias entre grupos de respuestas en las pacientes con tumores HER2+ se encuentran en metabolitos relacionados con el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos.

Por otra parte, los cambios temporales en los niveles de metabolitos parecen ser provocados por el tratamiento, independientemente de la respuesta alcanzada por las pacientes, y sólo algunos de ellos se mantienen tras la cirugía.

En el estudio de predicción de recaída tras la cirugía en las pacientes con tumores TNBC, se identificaron dos metabolitos, la acilcarnitina de cadena corta 2-metil-butiril carnitina (C5) y el ácido graso omega-3 eicosapentaenoico (EPA), con capacidad de separar a las pacientes en función de su riesgo (alto o bajo) de recaída a tres años. Es-

te resultado es especialmente relevante ya que abre la puerta a poder predecir con un análisis de sangre, justo después de la cirugía y años antes de que suceda, la recaída de una paciente. Mediante pruebas clínicas de este tipo se podría ayudar en la toma de decisiones clínicas a la hora de administrar los fármacos, administrándoselos a aquellas pacientes con un alto riesgo de recaída desde un primer momento, y en el caso de recaída, descartando aquellos fármacos que no hubieran resultado útiles. Además, ofrece la posibilidad de incluir en un ensayo clínico a pacientes de alto riesgo y podría facilitar la prueba de nuevos fármacos en el contexto adyuvante que en estos momentos todavía no están aprobados.

Limitaciones del estudio y perspectivas futuras

Dentro de las limitaciones de la cohorte, el número de pacientes va disminuyendo según se van clasificando las pacientes en función de su respuesta al tratamiento y su subtipo tumoral. Por este motivo, y a pesar del gran reto que supone reunir cohortes y establecer ensayos clínicos, estos deberían ser planteados desde un inicio por subtipos, alcanzando el suficiente número de pacientes para que los resultados tengan la potencia estadística necesaria para arrojar información fiable. Otras de las limitaciones del estudio es que, aunque el grueso de las pacientes se sitúa en estadios IIA y IIB, hay pacientes con estadio desde IA hasta IV, aumentando con ello la heterogeneidad de la cohorte. Además, dentro de un mismo subtipo las pacientes han recibido distintos esquemas de tratamiento, lo que podría provocar una diferente respuesta metabólica en el organismo.

A la hora de trabajar con este tipo de cohortes sería conveniente disponer de los datos moleculares necesarios para realizar una clasificación tumoral molecular más precisa y también para clasificar los tumores luminales A y luminales B en base a su expresión génica y no solo en base a Ki67. Además, contar con dicha información puede arrojar información complementaria a la hallada mediante los estudios de metabolómica, una más cercana al genotipo y otra al fenotipo de las pacientes.

Por otra parte, la variabilidad que aportan factores externos como la dieta, la medicación o la actividad física pueden afectar a la composición de metabolitos en sangre.

Discusión

Sería interesante de cara al futuro que los ensayos clínicos recogieran también información relativa al estilo de vida y nutricional de las pacientes.

Siguiendo con la composición de metabolitos en sangre, otras de las limitaciones o retos de la metabolómica es el gran rango de entidades bioquímicas de diferente naturaleza que abarca: lípidos de distintas clases, aminoácidos, carbohidratos, péptidos, nucleótidos, cofactores, vitaminas y xenobióticos. Este gran abanico de moléculas implica la necesidad de utilizar diferentes métodos en el análisis metabolómico, así como aumenta los tiempos de interpretación de resultados, que también se ven dilatados debido a la poca información que aún existe sobre una gran mayoría de metabolitos.

Por otra parte, el microambiente tumoral y el estado del sistema inmune de las pacientes puede ser determinante en la respuesta al tratamiento alcanzada por éstas^{188,189,190}. Esta tesis no aborda el estudio de característica de las pacientes, pero, sin duda, sería muy interesante establecer relaciones entre el metaboloma de las pacientes, el sistema inmune y la respuesta al tratamiento. Esta relación ha sido recientemente establecida en un estudio que muestra como los tumores que alcanzaron una respuesta completa presentaron en su mayoría una alta proliferación y una elevada activación inmunitaria. Ambos rasgos disminuyen de forma escalonada a medida que aumenta el grado de enfermedad residual. Sin embargo, algunos tumores, a pesar de ser proliferativos y tener un microambiente inmune enriquecido, muestran características de disfunción de células T y tienden a ser resistentes a la terapia¹⁹¹. Un sistema inmune no funcional podría explicar, al menos en parte, porque ciertas pacientes con tumores luminales B y HER2+, aunque muestren rasgos de tumores proliferativos, no alcanzaron una respuesta completa al tratamiento.

Una de las grandes cuestiones que surgen a lo largo del proyecto a raíz de los estudios realizados es si los niveles altos de los metabolitos son consecuencia de una mayor demanda de estos por el tumor, por el organismo, o por ambos, lo que resulta en un mayor transporte sanguíneo o, por el contrario, una menor utilización de dichos metabolitos que resulta en una acumulación de estos en sangre. Sin olvidar que dichos niveles pueden estar afectados por otros procesos que tengan lugar en el organismo. Discernir qué información obtenida es relevante en el escenario de cáncer⁸⁹, así como

la interpretación biológica de ésta, es uno de los mayores retos que afronta la metabolómica.

A pesar de las limitaciones del trabajo y los retos que supone abordar un estudio basado una nueva técnica como es la metabolómica, se ha cumplido con los objetivos planteados. Los resultados apuntan a que la metabolómica puede llegar a ser una herramienta útil en el manejo del paciente de cáncer de mama, constituyendo una prueba poco invasiva, rápida y con posibilidad de realizarse en distintos puntos temporales. Sin embargo, se necesitan estudios futuros con un mayor número de pacientes para confirmar los resultados obtenidos en este trabajo.

Conclusión general

Estamos viviendo un cambio de modelo en la práctica de la oncología de la mano de las nuevas tecnologías moleculares de alto rendimiento. Para que pueda ser empleada con eficacia por los profesionales sanitarios, la información obtenida debe ser traducida en pruebas diagnósticas precisas que desvelen las alteraciones metabólicas que subyacen a cada tumor específico. En este proyecto en concreto, se ha pretendido explotar el potencial de una tecnología que permite hacer seguimiento evolutivo de las pacientes con cáncer mediante un simple análisis de sangre. La posibilidad de acceder al análisis metabólico completo de la sangre de las pacientes, generada durante el manejo clínico rutinario, abre unas enormes posibilidades para la búsqueda de nuevos marcadores con valor diagnóstico, predictivo y pronóstico. Y lo que es aún más importante, para su traslación real a la clínica. La metabolómica posee un gran potencial como herramienta clínica en el manejo de las pacientes, sin embargo, queda un gran camino por recorrer. En este trabajo, mediante el análisis metabolómico y junto con diferentes análisis computacionales, ha sido posible definir potenciales perfiles metabólicos en distintos grupos de pacientes y un perfil de supervivencia a largo plazo. De cara al futuro, los perfiles metabólicos deben ser validados y ser lo suficientemente robustos para ser llevados a la clínica.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. La metabolómica puede ser una herramienta útil en el manejo clínico de las pacientes de cáncer de mama, constituyendo una prueba poco invasiva, rápida y con posibilidad de realizarse de manera seriada a lo largo del tiempo.
2. El análisis de los datos metabolómicos de la cohorte completa muestra que es necesario estudiar los distintos subtipos de cáncer de mama por separado dada su heterogeneidad subyacente.
3. Los datos metabolómicos de las pacientes permiten identificar diferencias entre grupos de respuesta al tratamiento. Estas diferencias son específicas de cada subtipo.
4. Las pacientes con tumores triple negativo que alcanzaron una respuesta completa muestran mayores niveles de metabolitos relacionados con ácidos grasos de cadena larga.
5. Las pacientes con tumores HER2+ que obtuvieron una respuesta parcial al tratamiento muestran mayores niveles de metabolitos relacionados con aminoácidos y carbohidratos.
6. Las pacientes con tumores luminales B que obtuvieron una respuesta parcial al tratamiento muestran mayores niveles de metabolitos relacionados con acilcarnitinas, esfingomielinas y ceramidas.
7. Se han identificado dos metabolitos con la capacidad de separar a las pacientes con tumores triple negativo en dos grupos de riesgo de recaída de la enfermedad a tres años.
8. La neoadyuvancia tiene impacto temporal en los niveles de ciertos metabolitos, independientemente de la respuesta alcanzada por las pacientes. Muy pocos de estos cambios se mantienen tras la cirugía.

Conclusiones

9. El uso de modelos gráficos probabilísticos no dirigidos y modelos lineales mixtos generalizados en el análisis de datos metabolómicos mejoran la información obtenida por los análisis habituales.
10. Uno de los grandes retos que afronta la metabolómica es la interpretación biológica de los resultados observados. En este trabajo hemos empleado una aproximación metabo-ontológica que permite un análisis funcional de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- (1) Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* **2021**, *71* (3), 209-249.
- (2) Dai, X.; Li, T.; Bai, Z.; Yang, Y.; Liu, X.; Zhan, J.; Shi, B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American journal of cancer research* **2015**, *5* (10), 2929-2943.
- (3) Ahmad, A. *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance: Challenges and Progress*; Springer, 2019.
- (4) Prasad, V.; Lenzer, J.; Newman, D. H. Why cancer screening has never been shown to “save lives”—and what we can do about it. *Bmj* **2016**, 352.
- (5) Puliti, D.; Duffy, S. W.; Miccinesi, G.; De Koning, H.; Lynge, E.; Zappa, M.; Paci, E. Overdiagnosis in mammographic screening for breast cancer in Europe: a literature review. *Journal of medical screening* **2012**, *19* (1_suppl), 42-56.
- (6) Pashayan, N.; Morris, S.; Gilbert, F. J.; Pharoah, P. D. Cost-effectiveness and benefit-to-harm ratio of risk-stratified screening for breast cancer: a life-table model. *JAMA oncology* **2018**, *4* (11), 1504-1510.
- (7) Pal Choudhury, P.; Wilcox, A. N.; Brook, M. N.; Zhang, Y.; Ahearn, T.; Orr, N.; Coulson, P.; Schoemaker, M. J.; Jones, M. E.; Gail, M. H. Comparative validation of breast cancer risk prediction models and projections for future risk stratification. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **2020**, *112* (3), 278-285.
- (8) Gierach, G. L.; Choudhury, P. P.; García-Closas, M. Toward Risk-Stratified Breast Cancer Screening: Considerations for Changes in Screening Guidelines. *JAMA oncology* **2020**, *6* (1), 31-33.

Bibliografía

(9) Pfeiffer, R. M.; Webb-Vargas, Y.; Wheeler, W.; Gail, M. H. Proportion of US trends in breast cancer incidence attributable to long-term changes in risk factor distributions. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* **2018**, *27* (10), 1214-1222.

(10) Martínez del Prado, P. Valor pronóstico del análisis de marcadores moleculares mediante proteómica dirigida en cáncer de mama precoz con receptores hormonales positivos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, 2018.

(11) Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2020**, *70* (1), 7-30.

(12) Mavaddat, N.; Antoniou, A. C.; Easton, D. F.; Garcia-Closas, M. Genetic susceptibility to breast cancer. *Molecular oncology* **2010**, *4* (3), 174-191.

(13) Ferreira, M. A.; Gamazon, E. R.; Al-Ejeh, F.; Aittomäki, K.; Andrulis, I. L.; Anton-Culver, H.; Arason, A.; Arndt, V.; Aronson, K. J.; Arun, B. K. Genome-wide association and transcriptome studies identify target genes and risk loci for breast cancer. *Nature communications* **2019**, *10* (1), 1-18.

(14) Shiyanbola, O. O.; Arao, R. F.; Miglioretti, D. L.; Sprague, B. L.; Hampton, J. M.; Stout, N. K.; Kerlikowske, K.; Braithwaite, D.; Buist, D. S.; Egan, K. M. Emerging trends in family history of breast cancer and associated risk. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* **2017**, *26* (12), 1753-1760.

(15) Breast cancer facts & figures 2019–2020. *Atlanta: American Cancer Society, Inc* **2019**, 1-44.

(16) Dyrstad, S. W.; Yan, Y.; Fowler, A. M.; Colditz, G. A. Breast cancer risk associated with benign breast disease: systematic review and meta-analysis. *Breast cancer research and treatment* **2015**, *149* (3), 569-575.

(17) Bertrand, K. A.; Tamimi, R. M.; Scott, C. G.; Jensen, M. R.; Pankratz, V. S.; Visscher, D.; Norman, A.; Couch, F.; Shepherd, J.; Fan, B. Mammographic density and risk of breast cancer by age and tumor characteristics. *Breast Cancer Research* **2013**, *15* (6), 1-13.

(18) Jiralerspong, S.; Goodwin, P. J. Obesity and breast cancer prognosis: evidence, challenges, and opportunities. *Journal of Clinical Oncology* **2016**, *34* (35), 4203-4216.

(19) Iyengar, N. M.; Arthur, R.; Manson, J. E.; Chlebowski, R. T.; Kroenke, C. H.; Peterson, L.; Cheng, T.-Y. D.; Feliciano, E. C.; Lane, D.; Luo, J. Association of body fat and risk of breast cancer in postmenopausal women with normal body mass index: a secondary analysis of a randomized clinical trial and observational study. *JAMA oncology* **2019**, *5* (2), 155-163.

(20) Rosner, B.; Eliassen, A. H.; Toriola, A. T.; Chen, W. Y.; Hankinson, S. E.; Willett, W. C.; Berkey, C. S.; Colditz, G. A. Weight and weight changes in early adulthood and later breast cancer risk. *International journal of cancer* **2017**, *140* (9), 2003-2014.

(21) Keum, N.; Greenwood, D. C.; Lee, D. H.; Kim, R.; Aune, D.; Ju, W.; Hu, F. B.; Giovannucci, E. L. Adult weight gain and adiposity-related cancers: a dose-response meta-analysis of prospective observational studies. *Journal of the National Cancer Institute* **2015**, *107* (2).

(22) Cao, Y.; Hou, L.; Wang, W. Dietary total fat and fatty acids intake, serum fatty acids and risk of breast cancer: A meta-analysis of prospective cohort studies. *International journal of cancer* **2016**, *138* (8), 1894-1904.

(23) Liu, Y.; Nguyen, N.; Colditz, G. A. Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. *Women's health* **2015**, *11* (1), 65-77.

(24) Gram, I. T.; Park, S.-Y.; Maskarinec, G.; Wilkens, L. R.; Haiman, C. A.; Le Marchand, L. Smoking and breast cancer risk by race/ethnicity and oestrogen and progesterone receptor status: the Multiethnic Cohort (MEC) study. *International journal of epidemiology* **2019**, *48* (2), 501-511.

(25) Pizot, C.; Boniol, M.; Mullie, P.; Koechlin, A.; Boniol, M.; Boyle, P.; Autier, P. Physical activity, hormone replacement therapy and breast cancer risk: A meta-analysis of prospective studies. *European Journal of Cancer* **2016**, *52*, 138-154.

Bibliografia

(26) Neilson, H. K.; Friedenreich, C. M.; Brockton, N. T.; Millikan, R. C. Physical activity and postmenopausal breast cancer: proposed biologic mechanisms and areas for future research. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* **2009**, *18* (1), 11-27.

(27) Gospodarowicz, M. K.; Miller, D.; Groome, P. A.; Greene, F. L.; Logan, P. A.; Sobin, L. H. The process for continuous improvement of the TNM classification. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* **2004**, *100* (1), 1-5.

(28) Amin, M. B.; Greene, F. L.; Edge, S. B.; Compton, C. C.; Gershenwald, J. E.; Brookland, R. K.; Meyer, L.; Gress, D. M.; Byrd, D. R.; Winchester, D. P. The eighth edition AJCC cancer staging manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA: a cancer journal for clinicians* **2017**, *67* (2), 93-99.

(29) Giuliano, A. E.; Connolly, J. L.; Edge, S. B.; Mittendorf, E. A.; Rugo, H. S.; Solin, L. J.; Weaver, D. L.; Winchester, D. J.; Hortobagyi, G. N. Breast cancer—major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: a cancer journal for clinicians* **2017**, *67* (4), 290-303.

(30) North American Association of Central Cancer Registries (NAACCR) Incidence Data, 1995-2016. 2018.

(31) Dieci, M. V.; Orvieto, E.; Dominici, M.; Conte, P.; Guarneri, V. Rare breast cancer subtypes: histological, molecular, and clinical peculiarities. *The oncologist* **2014**, *19* (8), 805-813.

(32) Dent, R.; Trudeau, M.; Pritchard, K. I.; Hanna, W. M.; Kahn, H. K.; Sawka, C. A.; Lickley, L. A.; Rawlinson, E.; Sun, P.; Narod, S. A. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical cancer research* **2007**, *13* (15), 4429-4434.

(33) Gluz, O.; Liedtke, C.; Gottschalk, N.; Pusztai, L.; Nitz, U.; Harbeck, N. Triple-negative breast cancer—current status and future directions. *Annals of Oncology* **2009**, *20* (12), 1913-1927.

(34) Gaudet, M. M.; Falk, R. T.; Stevens, R. D.; Gunter, M. J.; Bain, J. R.; Pfeiffer, R. M.; Potischman, N.; Lissowska, J.; Peplonska, B.; Brinton, L. A. Analysis of serum metabolic profiles

in women with endometrial cancer and controls in a population-based case-control study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **2012**, 97 (9), 3216-3223.

(35) Sharma, P. Biology and management of patients with triple-negative breast cancer. *The oncologist* **2016**, 21 (9), 1050-1062.

(36) Gámez-Pozo, A.; Trilla-Fuertes, L.; Berges-Soria, J.; Selevsek, N.; López-Vacas, R.; Díaz-Almirón, M.; Nanni, P.; Arevalillo, J. M.; Navarro, H.; Grossmann, J. Functional proteomics outlines the complexity of breast cancer molecular subtypes. *Scientific Reports* **2017**, 7 (1), 1-13.

(37) Ross, J. S.; Slodkowska, E. A.; Symmans, W. F.; Pusztai, L.; Ravdin, P. M.; Hortobagyi, G. N. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *The oncologist* **2009**, 14 (4), 320-368.

(38) Goutsouliak, K.; Veeraraghavan, J.; Sethunath, V.; De Angelis, C.; Osborne, C. K.; Rimawi, M. F.; Schiff, R. Towards personalized treatment for early stage HER2-positive breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* **2020**, 17 (4), 233-250.

(39) Yarden, Y.; Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell biology* **2001**, 2 (2), 127-137.

(40) Gandhi, N.; Das, G. M. Metabolic reprogramming in breast cancer and its therapeutic implications. *Cells* **2019**, 8 (2), 89.

(41) 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.; Akslén, L. A. Molecular portraits of human breast tumours. *nature* **2000**, 406 (6797), 747-752.

(42) Sotiriou, C.; Neo, S.-Y.; McShane, L. M.; Korn, E. L.; Long, P. M.; Jazaeri, A.; Martiat, P.; Fox, S. B.; Harris, A. L.; Liu, E. T. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, 100 (18), 10393-10398.

Bibliografía

(43) Sørlie, T.; Tibshirani, R.; Parker, J.; Hastie, T.; Marron, J. S.; Nobel, A.; Deng, S.; Johnsen, H.; Pesich, R.; Geisler, S. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the national academy of sciences* **2003**, *100* (14), 8418-8423.

(44) Howlader, N.; Cronin, K. A.; Kurian, A. W.; Andridge, R. Differences in breast cancer survival by molecular subtypes in the United States. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* **2018**, *27* (6), 619-626.

(45) Martí, C.; Sánchez-Méndez, J. I. The Present and Future of Neoadjuvant Endocrine Therapy for Breast Cancer Treatment. *Cancers* **2021**, *13* (11), 2538.

(46) Iwata, H.; Masuda, N.; Yamamoto, Y.; Fujisawa, T.; Toyama, T.; Kashiwaba, M.; Ohtani, S.; Taira, N.; Sakai, T.; Hasegawa, Y. Validation of the 21-gene test as a predictor of clinical response to neoadjuvant hormonal therapy for ER+, HER2-negative breast cancer: the TransNEOS study. *Breast cancer research and treatment* **2019**, *173* (1), 123-133.

(47) Bear, H. D.; Wan, W.; Robidoux, A.; Rubin, P.; Limentani, S.; White Jr, R. L.; Granfortuna, J.; Hopkins, J. O.; Oldham, D.; Rodriguez, A. Using the 21-gene assay from core needle biopsies to choose neoadjuvant therapy for breast cancer: a multicenter trial. *Journal of surgical oncology* **2017**, *115* (8), 917-923.

(48) Lerebours, F.; Cabel, L.; Pierga, J.-Y. Neoadjuvant Endocrine Therapy in Breast Cancer Management: State of the Art. *Cancers* **2021**, *13* (4), 902.

(49) García Adrián, S. Caracterización molecular del cáncer de mama precoz triple negativo mediante la técnica proteómica SWATH-MS. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, 2019.

(50) Coates, A. S.; Winer, E. P.; Goldhirsch, A.; Gelber, R. D.; Gnant, M.; Piccart-Gebhart, M.; Thürlimann, B.; Senn, H.-J.; Members, P.; André, F. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals of oncology* **2015**, *26* (8), 1533-1546.

- (51) Harbeck, N.; Gnant, M. Breast cancer. *Lancet* **2017**, *389* (10074), 1134–1150.
- (52) Berges Soria, J. Caracterización molecular del cáncer de mama mediante el análisis del proteoma. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, 2014.
- (53) Korde, L. A.; Somerfield, M. R.; Carey, L. A.; Crews, J. R.; Denduluri, N.; Hwang, E. S.; Khan, S. A.; Loibl, S.; Morris, E. A.; Perez, A. Neoadjuvant chemotherapy, endocrine therapy, and targeted therapy for breast cancer: ASCO guideline. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2021**, *39* (13), 1485-1505.
- (54) Kümmel, S.; Holtschmidt, J.; Loibl, S. Surgical treatment of primary breast cancer in the neoadjuvant setting. *Journal of British Surgery* **2014**, *101* (8), 912-924.
- (55) Generali, D.; Ardine, M.; Strina, C.; Milani, M.; Cappelletti, M. R.; Zanotti, L.; Forti, M.; Bedussi, F.; Martinotti, M.; Amoroso, V. Neoadjuvant treatment approach: the Rosetta stone for breast cancer? *JNCI Monographs* **2015**, *2015* (51), 32-35.
- (56) Thompson, A.; Moulder-Thompson, S. Neoadjuvant treatment of breast cancer. *Annals of Oncology* **2012**, *23*, 231-236.
- (57) Kong, X.; Moran, M. S.; Zhang, N.; Haffty, B.; Yang, Q. Meta-analysis confirms achieving pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy predicts favourable prognosis for breast cancer patients. *European journal of cancer* **2011**, *47* (14), 2084-2090.
- (58) Byrd, D. R.; Brierley, J. D.; Baker, T. P.; Sullivan, D. C.; Gress, D. M. Current and future cancer staging after neoadjuvant treatment for solid tumors. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2021**, *71* (2), 140-148.
- (59) Bonnetterre, J.; Thürlimann, B.; Robertson, J.; Krzakowski, M.; Mauriac, L.; Koralewski, P.; Vergote, I.; Webster, A.; Steinberg, M.; Von Euler, M. Anastrozole versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in 668 postmenopausal women: results of the Tamoxifen or Arimidex Randomized Group Efficacy and Tolerability study. *Journal of Clinical Oncology* **2000**, *18* (22), 3748-3757.

Bibliografía

(60) Nabholz, J.; Bonnetterre, J.; Buzdar, A.; Robertson, J.; Thürlimann, B.; Investigators, A. W. C. o. b. o. t. Anastrozole (Arimidex™) versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: survival analysis and updated safety results. *European Journal of Cancer* **2003**, *39* (12), 1684-1689.

(61) Seo, J. H.; Kim, Y. H.; Kim, J. S. Meta-analysis of pre-operative aromatase inhibitor versus tamoxifen in postmenopausal woman with hormone receptor-positive breast cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **2009**, *63* (2), 261-266.

(62) Masuda, N.; Sagara, Y.; Kinoshita, T.; Iwata, H.; Nakamura, S.; Yanagita, Y.; Nishimura, R.; Iwase, H.; Kamigaki, S.; Takei, H. Neoadjuvant anastrozole versus tamoxifen in patients receiving goserelin for premenopausal breast cancer (STAGE): a double-blind, randomised phase 3 trial. *The lancet oncology* **2012**, *13* (4), 345-352.

(63) Spring, L. M.; Gupta, A.; Reynolds, K. L.; Gadd, M. A.; Ellisen, L. W.; Isakoff, S. J.; Moy, B.; Bardia, A. Neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *JAMA oncology* **2016**, *2* (11), 1477-1486.

(64) Wang, Y.; He, L.; Song, Y.; Wu, Q.; Wang, H.; Zhang, B.; Ma, X. The tumour response of postmenopausal hormone receptor-positive breast cancers undergoing different types of neoadjuvant therapy: a meta-analysis. *BMC women's health* **2020**, *20* (1), 17.

(65) Sharma, P.; López-Tarruella, S.; García-Saenz, J. A.; Ward, C.; Connor, C. S.; Gómez, H. L.; Prat, A.; Moreno, F.; Jerez-Gilarranz, Y.; Barnadas, A. Efficacy of neoadjuvant carboplatin plus docetaxel in triple-negative breast cancer: combined analysis of two cohorts. *Clinical cancer research* **2017**, *23* (3), 649-657.

(66) Kumar, P.; Aggarwal, R. An overview of triple-negative breast cancer. *Archives of gynecology and obstetrics* **2016**, *293* (2), 247-269.

(67) Koleckova, M.; Vomackova, K.; Kolar, Z. Molecular Prognostic and Predictive Markers in Triple-Negative Breast Cancer. In *Breast Cancer - Evolving Challenges and Next Frontier*; 2021.

(68) Kwapisz, D. Pembrolizumab and atezolizumab in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **2021**, *70* (3), 607-617.

(69) Gianni, L.; Pienkowski, T.; Im, Y.-H.; Roman, L.; Tseng, L.-M.; Liu, M.-C.; Lluch, A.; Staroslawska, E.; de la Haba-Rodriguez, J.; Im, S.-A. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *The lancet oncology* **2012**, *13* (1), 25-32.

(70) Slamon, D.; Eiermann, W.; Robert, N.; Pienkowski, T.; Martin, M.; Press, M.; Mackey, J.; Glaspy, J.; Chan, A.; Pawlicki, M. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine* **2011**, *365* (14), 1273-1283.

(71) Swain, S. M.; Kim, S.-B.; Cortés, J.; Ro, J.; Semiglazov, V.; Campone, M.; Ciruelos, E.; Ferrero, J.-M.; Schneeweiss, A.; Knott, A. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *The lancet oncology* **2013**, *14* (6), 461-471.

(72) Berruti, A.; Amoroso, V.; Gallo, F.; Bertaglia, V.; Simoncini, E.; Pedersini, R.; Ferrari, L.; Bottini, A.; Bruzzi, P.; Sormani, M. P. Pathologic complete response as a potential surrogate for the clinical outcome in patients with breast cancer after neoadjuvant therapy: a meta-regression of 29 randomized prospective studies. *Journal of clinical oncology* **2014**, *32* (34), 3883-3891.

(73) Plevritis, S. K.; Munoz, D.; Kurian, A. W.; Stout, N. K.; Alagoz, O.; Near, A. M.; Lee, S. J.; Van Den Broek, J. J.; Huang, X.; Schechter, C. B. Association of screening and treatment with breast cancer mortality by molecular subtype in US women, 2000-2012. *Jama* **2018**, *319* (2), 154-164.

(74) Wolff, A. C.; Tung, N. M.; Carey, L. A. Implications of neoadjuvant therapy in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2019**, *37*(25), 2189-2192.

Bibliografía

(75) Slamon, D. J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A.; Fleming, T.; Eiermann, W.; Wolter, J.; Pegram, M. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *New England journal of medicine* **2001**, *344* (11), 783-792.

(76) Cortazar, P.; Zhang, L.; Untch, M.; Mehta, K.; Costantino, J. P.; Wolmark, N.; Bonnefoi, H.; Cameron, D.; Gianni, L.; Valagussa, P. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *The Lancet* **2014**, *384* (9938), 164-172.

(77) Von Minckwitz, G.; Untch, M.; Blohmer, J.-U.; Costa, S. D.; Eidtmann, H.; Fasching, P. A.; Gerber, B.; Eiermann, W.; Hilfrich, J.; Huober, J. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin oncol* **2012**, *30* (15), 1796-1804.

(78) Broglio, K. R.; Quintana, M.; Foster, M.; Olinger, M.; McGlothlin, A.; Berry, S. M.; Boileau, J.-F.; Brezden-Masley, C.; Chia, S.; Dent, S. Association of pathologic complete response to neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer with long-term outcomes: a meta-analysis. *JAMA oncology* **2016**, *2* (6), 751-760.

(79) Urruticoechea, A.; Smith, I. E.; Dowsett, M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *Journal of clinical oncology* **2005**, *23* (28), 7212-7220.

(80) Fiehn, O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Functional genomics* **2002**, 155-171.

(81) Patti, G. J.; Yanes, O.; Siuzdak, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature reviews Molecular cell biology* **2012**, *13* (4), 263-269.

(82) Wishart, D. S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nature reviews Drug discovery* **2016**, *15* (7), 473.

(83) Kaushik, A. K.; DeBerardinis, R. J. Applications of metabolomics to study cancer metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* **2018**, *1870* (1), 2-14.

- (84) Pan, Z.; Raftery, D. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2007**, *387* (2), 525-527.
- (85) Grandori, R.; Santambrogio, C.; Brocca, S.; Invernizzi, G.; Lotti, M. Electrospray-ionization mass spectrometry as a tool for fast screening of protein structural properties. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology* **2009**, *4* (1), 73-87.
- (86) Ho, C. S.; Lam, C.; Chan, M.; Cheung, R.; Law, L.; Lit, L.; Ng, K.; Suen, M.; Tai, H. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews* **2003**, *24* (1), 3.
- (87) Last, R. L.; Jones, A. D.; Shachar-Hill, Y. Towards the plant metabolome and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2007**, *8* (2), 167-174.
- (88) Liu, X.; Locasale, J. W. Metabolomics: a primer. *Trends in biochemical sciences* **2017**, *42* (4), 274-284.
- (89) Schmidt, D. R.; Patel, R.; Kirsch, D. G.; Lewis, C. A.; Vander Heiden, M. G.; Locasale, J. W. Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology. *CA: a cancer journal for clinicians* **2021**, 333-358.
- (90) Günther, U. L. Metabolomics biomarkers for breast cancer. *Pathobiology* **2015**, *82* (3-4), 153-165.
- (91) Gribbestad, I.; Fjøsne, H.; Haugen, O.; Nilsen, G.; Krane, J.; Petersen, S.; Kvinnsland, S. In vitro proton NMR spectroscopy of extracts from human breast tumours and non-involved breast tissue. *Anticancer research* **1993**, *13* (6A), 1973-1980.
- (92) Mackinnon, W. B.; Barry, P. A.; Malycha, P. L.; Gillett, D. J.; Russell, P.; Lean, C. L.; Doran, S. T.; Barraclough, B. H.; Bilous, M.; Mountford, C. E. Fine-needle biopsy specimens of benign breast lesions distinguished from invasive cancer ex vivo with proton MR spectroscopy. *Radiology* **1997**, *204* (3), 661-666.

Bibliografia

(93) Cheng, L. L.; Chang, I.-W.; Smith, B. L.; Gonzalez, R. G. Evaluating human breast ductal carcinomas with high-resolution magic-angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* **1998**, *135* (1), 194-202.

(94) Sitter, B.; Lundgren, S.; Bathen, T. F.; Halgunset, J.; Fjosne, H. E.; Gribbestad, I. S. Comparison of HR MAS MR spectroscopic profiles of breast cancer tissue with clinical parameters. *NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In vivo* **2006**, *19* (1), 30-40.

(95) Hilvo, M.; Denkert, C.; Lehtinen, L.; Müller, B.; Brockmöller, S.; Seppänen-Laakso, T.; Budczies, J.; Bucher, E.; Yetukuri, L.; Castillo, S. Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer research* **2011**, *71* (9), 3236-3245.

(96) Giskeødegård, G. F.; Grinde, M. T.; Sitter, B.; Axelson, D. E.; Lundgren, S.; Fjøsne, H. E.; Dahl, S.; Gribbestad, I. S.; Bathen, T. F. Multivariate modeling and prediction of breast cancer prognostic factors using MR metabolomics. *Journal of proteome research* **2010**, *9* (2), 972-979.

(97) Tang, X.; Lin, C.-C.; Spasojevic, I.; Iversen, E. S.; Chi, J.-T.; Marks, J. R. A joint analysis of metabolomics and genetics of breast cancer. *Breast cancer research* **2014**, *16* (4), 1-15.

(98) Oakman, C.; Tenori, L.; Claudino, W.; Cappadona, S.; Nepi, S.; Battaglia, A.; Bernini, P.; Zafarana, E.; Saccenti, E.; Fornier, M. Identification of a serum-detectable metabolomic fingerprint potentially correlated with the presence of micrometastatic disease in early breast cancer patients at varying risks of disease relapse by traditional prognostic methods. *Annals of Oncology* **2011**, *22* (6), 1295-1301.

(99) Tenori, L.; Oakman, C.; Morris, P. G.; Gralka, E.; Turner, N.; Cappadona, S.; Fornier, M.; Hudis, C.; Norton, L.; Luchinat, C. Serum metabolomic profiles evaluated after surgery may identify patients with oestrogen receptor negative early breast cancer at increased risk of disease recurrence. Results from a retrospective study. *Molecular oncology* **2015**, *9* (1), 128-139.

- (100) Tenori, L.; Oakman, C.; Claudino, W. M.; Bernini, P.; Cappadona, S.; Nepi, S.; Biganzoli, L.; Arbushites, M. C.; Luchinat, C.; Bertini, I. Exploration of serum metabolomic profiles and outcomes in women with metastatic breast cancer: a pilot study. *Molecular oncology* **2012**, *6* (4), 437-444.
- (101) Bathen, T. F.; Geurts, B.; Sitter, B.; Fjøsne, H. E.; Lundgren, S.; Buydens, L. M.; Gribbestad, I. S.; Postma, G.; Giskeødegård, G. F. Feasibility of MR metabolomics for immediate analysis of resection margins during breast cancer surgery. *PloS one* **2013**, *8* (4), e61578.
- (102) Asiago, V. M.; Alvarado, L. Z.; Shanaiah, N.; Gowda, G. N.; Owusu-Sarfo, K.; Ballas, R. A.; Raftery, D. Early detection of recurrent breast cancer using metabolite profiling. *Cancer research* **2010**, *70* (21), 8309-8318.
- (103) Wei, S.; Liu, L.; Zhang, J.; Bowers, J.; Gowda, G. N.; Seeger, H.; Fehm, T.; Neubauer, H. J.; Vogel, U.; Clare, S. E. Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Molecular oncology* **2013**, *7* (3), 297-307.
- (104) Cappelletti, V.; Iorio, E.; Miodini, P.; Silvestri, M.; Dugo, M.; Daidone, M. G. Metabolic footprints and molecular subtypes in breast cancer. *Disease markers* **2017**, 2017.
- (105) Trilla-Fuertes, L.; Gámez-Pozo, A.; López-Camacho, E.; Prado-Vázquez, G.; Zapater-Moros, A.; López-Vacas, R.; Arevalillo, J. M.; Díaz-Almirón, M.; Navarro, H.; Maín, P. Computational models applied to metabolomics data hints at the relevance of glutamine metabolism in breast cancer. *BMC cancer* **2020**, *20* (1), 1-11.
- (106) Ogston, K. N.; Miller, I. D.; Payne, S.; Hutcheon, A. W.; Sarkar, T. K.; Smith, I.; Schofield, A.; Heys, S. D. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *The Breast* **2003**, *12* (5), 320-327.
- (107) Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* **2003**, *13* (11), 2498-2504.

Bibliografía

(108) Tusher, V. G.; Tibshirani, R.; Chu, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (9), 5116-5121.

(109) Mossman, D.; Somoza, E. ROC curves, test accuracy, and the description of diagnostic tests. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **1991**, *3* (3), 330-333. From NLM.

(110) Johnson, W. E.; Li, C.; Rabinovic, A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* **2007**, *8* (1), 118-127. From NLM.

(111) Cox, D. R. Regression Models and Life-Tables. *J Roy Stat Soc*: 1972; Vol. 34, pp 187-220.

(112) Bair, E.; Tibshirani, R. Semi-supervised methods to predict patient survival from gene expression data. *PLoS Biol* **2004**, *2* (4), E108. From NLM.

(113) Simon, R. Roadmap for developing and validating therapeutically relevant genomic classifiers. *J Clin Oncol* **2005**, *23* (29), 7332-7341.

(114) Gámez-Pozo, A.; Berges-Soria, J.; Arevalillo, J. M.; Nanni, P.; López-Vacas, R.; Navarro, H.; Grossmann, J.; Castaneda, C. A.; Main, P.; Díaz-Almirón, M. Combined label-free quantitative proteomics and microRNA expression analysis of breast cancer unravel molecular differences with clinical implications. *Cancer research* **2015**, *75* (11), 2243-2253.

(115) Díaz-Beltrán, L.; González-Olmedo, C.; Luque-Caro, N.; Díaz, C.; Martín-Blázquez, A.; Fernández-Navarro, M.; Ortega-Granados, A. L.; Gálvez-Montosa, F.; Vicente, F.; Pérez del Palacio, J. Human plasma metabolomics for biomarker discovery: Targeting the molecular subtypes in breast cancer. *Cancers* **2021**, *13* (1), 147.

(116) Smith, B. K.; Bonen, A.; Holloway, G. P. A dual mechanism of action for skeletal muscle FAT/CD36 during exercise. *Exercise and sport sciences reviews* **2012**, *40* (4), 211-217.

(117) Holloway, G.; Luiken, J.; Glatz, J.; Spriet, L.; Bonen, A. Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview. *Acta physiologica* **2008**, *194* (4), 293-309.

- (118) Koundouros, N.; Poulogiannis, G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *British journal of cancer* **2020**, *122* (1), 4-22.
- (119) Pascual, G.; Avgustinova, A.; Mejetta, S.; Martín, M.; Castellanos, A.; Attolini, C. S.-O.; Berenguer, A.; Prats, N.; Toll, A.; Hueto, J. A. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature* **2017**, *541* (7635), 41-45.
- (120) Santos, C. R.; Schulze, A. Lipid metabolism in cancer. *The FEBS journal* **2012**, *279* (15), 2610-2623.
- (121) Lunt, S. Y.; Vander Heiden, M. G. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual review of cell and developmental biology* **2011**, *27*, 441-464.
- (122) Wei, Z.; Liu, X.; Cheng, C.; Yu, W.; Yi, P. Metabolism of Amino Acids in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2020**, *8*, 1628.
- (123) Lieu, E. L.; Nguyen, T.; Rhyne, S.; Kim, J. Amino acids in cancer. *Experimental & molecular medicine* **2020**, *52* (1), 15-30.
- (124) Ron-Harel, N.; Ghergurovich, J. M.; Notarangelo, G.; LaFleur, M. W.; Tsubosaka, Y.; Sharpe, A. H.; Rabinowitz, J. D.; Haigis, M. C. T cell activation depends on extracellular alanine. *Cell reports* **2019**, *28* (12), 3011-3021. e3014.
- (125) Sousa, C. M.; Biancur, D. E.; Wang, X.; Halbrook, C. J.; Sherman, M. H.; Zhang, L.; Kremer, D.; Hwang, R. F.; Witkiewicz, A. K.; Ying, H. Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion. *Nature* **2016**, *536* (7617), 479-483.
- (126) Lomelino, C. L.; Andring, J. T.; McKenna, R.; Kilberg, M. S. Asparagine synthetase: function, structure, and role in disease. *Journal of Biological Chemistry* **2017**, *292* (49), 19952-19958.
- (127) Knott, S. R.; Wagenblast, E.; Khan, S.; Kim, S. Y.; Soto, M.; Wagner, M.; Turgeon, M.-O.; Fish, L.; Erard, N.; Gable, A. L. Asparagine bioavailability governs metastasis in a model of breast cancer. *Nature* **2018**, *554* (7692), 378-381.

Bibliografia

(128) Brasky, T. M.; Lampe, J. W.; Potter, J. D.; Patterson, R. E.; White, E. Specialty supplements and breast cancer risk in the VITamins And Lifestyle (VITAL) Cohort. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* **2010**, *19* (7), 1696-1708.

(129) Zheng, J.-S.; Hu, X.-J.; Zhao, Y.-M.; Yang, J.; Li, D. Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. *Bmj* **2013**, *346*, f3706.

(130) Fabian, C. J.; Kimler, B. F.; Hursting, S. D. Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. *Breast cancer research* **2015**, *17* (1), 1-11.

(131) Kopecky, J.; Rossmeisl, M.; Flachs, P.; Kuda, O.; Brauner, P.; Jilkova, Z.; Stankova, B.; Tvrzicka, E.; Bryhn, M. n-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function: Symposium on 'Frontiers in adipose tissue biology'. *Proceedings of the Nutrition Society* **2009**, *68* (4), 361-369.

(132) Schwab, J. M.; Chiang, N.; Arita, M.; Serhan, C. N. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* **2007**, *447* (7146), 869-874.

(133) Weylandt, K. H.; Chiu, C.-Y.; Gomolka, B.; Waechter, S. F.; Wiedenmann, B. Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvin and protectin formation. *Prostaglandins & other lipid mediators* **2012**, *97* (3-4), 73-82.

(134) Shen, J.; Yan, L.; Liu, S.; Ambrosone, C. B.; Zhao, H. Plasma metabolomic profiles in breast cancer patients and healthy controls: by race and tumor receptor subtypes. *Translational oncology* **2013**, *6* (6), 757.

(135) Hammamieh, R.; Chakraborty, N.; Miller, S.-A.; Waddy, E.; Barmada, M.; Das, R.; Peel, S. A.; Day, A. A.; Jett, M. Differential effects of omega-3 and omega-6 Fatty acids on gene expression in breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* **2007**, *101* (1), 7-16.

(136) Giró-Perafita, A.; Sarrats, A.; Pérez-Bueno, F.; Oliveras, G.; Buxó, M.; Brunet, J.; Viñas, G.; Miquel, T. P. Fatty acid synthase expression and its association with clinico-histopathological features in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* **2017**, *8* (43), 74391.

- (137) Armstrong, N.; Ryder, S.; Forbes, C.; Ross, J.; Quek, R. G. A systematic review of the international prevalence of BRCA mutation in breast cancer. *Clinical epidemiology* **2019**, *11*, 543.
- (138) Moreau, K.; Dizin, E.; Ray, H.; Luquain, C.; Lefai, E.; Foufelle, F.; Billaud, M.; Lenoir, G. M.; Dalla Venezia, N. BRCA1 affects lipid synthesis through its interaction with acetyl-CoA carboxylase. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281* (6), 3172-3181.
- (139) Wright, H. J.; Hou, J.; Xu, B.; Cortez, M.; Potma, E. O.; Tromberg, B. J.; Razorenova, O. V. CDCP1 drives triple-negative breast cancer metastasis through reduction of lipid-droplet abundance and stimulation of fatty acid oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2017**, *114* (32), E6556-E6565.
- (140) Ye, Z.; Wang, S.; Zhang, C.; Zhao, Y. Coordinated modulation of energy metabolism and inflammation by branched-chain amino acids and fatty acids. *Frontiers in endocrinology* **2020**, *11*, 617.
- (141) Zhang, L.; Han, J. Branched-chain amino acid transaminase 1 (BCAT1) promotes the growth of breast cancer cells through improving mTOR-mediated mitochondrial biogenesis and function. *Biochemical and biophysical research communications* **2017**, *486* (2), 224-231.
- (142) Vettore, L.; Westbrook, R. L.; Tennant, D. A. New aspects of amino acid metabolism in cancer. *British journal of cancer* **2020**, *122* (2), 150-156.
- (143) Renehan, A. G.; Zwahlen, M.; Egger, M. Adiposity and cancer risk: new mechanistic insights from epidemiology. *Nature Reviews Cancer* **2015**, *15* (8), 484-498.
- (144) Son, S. M.; Park, S. J.; Lee, H.; Siddiqi, F.; Lee, J. E.; Menzies, F. M.; Rubinsztein, D. C. Leucine signals to mTORC1 via its metabolite acetyl-coenzyme A. *Cell metabolism* **2019**, *29* (1), 192-201. e197.

Bibliografia

(145) Mayers, J. R.; Wu, C.; Clish, C. B.; Kraft, P.; Torrence, M. E.; Fiske, B. P.; Yuan, C.; Bao, Y.; Townsend, M. K.; Tworoger, S. S. Elevation of circulating branched-chain amino acids is an early event in human pancreatic adenocarcinoma development. *Nature medicine* **2014**, *20* (10), 1193-1198.

(146) Wanders, D.; Hobson, K.; Ji, X. Methionine restriction and cancer biology. *Nutrients* **2020**, *12* (3), 684.

(147) Sanderson, S. M.; Gao, X.; Dai, Z.; Locasale, J. W. Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. *Nature Reviews Cancer* **2019**, *19* (11), 625-637.

(148) Chaturvedi, S.; Hoffman, R. M.; Bertino, J. R. Exploiting methionine restriction for cancer treatment. *Biochemical pharmacology* **2018**, *154*, 170-173.

(149) Cavuoto, P.; Fenech, M. F. A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer treatment reviews* **2012**, *38* (6), 726-736.

(150) Jiang, Y.; Cao, Y.; Wang, Y.; Li, W.; Liu, X.; Lv, Y.; Li, X.; Mi, J. Cysteine transporter SLC3A1 promotes breast cancer tumorigenesis. *Theranostics* **2017**, *7* (4), 1036.

(151) Lin, J.; Lee, I.-M.; Song, Y.; Cook, N. R.; Selhub, J.; Manson, J. E.; Buring, J. E.; Zhang, S. M. Plasma homocysteine and cysteine and risk of breast cancer in women. *Cancer research* **2010**, *70* (6), 2397-2405.

(152) Monti, D.; Sotgia, F.; Whitaker-Menezes, D.; Tuluc, M.; Birbe, R.; Berger, A.; Lazar, M.; Cotzia, P.; Draganova-Tacheva, R.; Lin, Z. Pilot study demonstrating metabolic and anti-proliferative effects of in vivo anti-oxidant supplementation with N-Acetylcysteine in Breast Cancer. In *Seminars in oncology*, 2017; Elsevier: Vol. 44, pp 226-232.

(153) Patra, K. C.; Hay, N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in biochemical sciences* **2014**, *39* (8), 347-354.

- (154) Jiang, P.; Du, W.; Wu, M. Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein & cell* **2014**, *5* (8), 592-602.
- (155) Vander Heiden, M. G.; Cantley, L. C.; Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science* **2009**, *324* (5930), 1029-1033.
- (156) Wu, Z.; Wu, J.; Zhao, Q.; Fu, S.; Jin, J. Emerging roles of aerobic glycolysis in breast cancer. *Clinical and Translational Oncology* **2020**, *22* (5), 631-646.
- (157) Elia, I.; Rossi, M.; Stegen, S.; Broekaert, D.; Doglioni, G.; van Gorsel, M.; Boon, R.; Escalona-Noguero, C.; Torrekens, S.; Verfaillie, C. Breast cancer cells rely on environmental pyruvate to shape the metastatic niche. *Nature* **2019**, *568* (7750), 117-121.
- (158) Li, W.; Xu, M.; Li, Y.; Huang, Z.; Zhou, J.; Zhao, Q.; Le, K.; Dong, F.; Wan, C.; Yi, P. Comprehensive analysis of the association between tumor glycolysis and immune/inflammation function in breast cancer. *Journal of translational medicine* **2020**, *18* (1), 1-12.
- (159) Sun, C.; Wang, F.; Zhang, Y.; Yu, J.; Wang, X. Mass spectrometry imaging-based metabolomics to visualize the spatially resolved reprogramming of carnitine metabolism in breast cancer. *Theranostics* **2020**, *10* (16), 7070.
- (160) Ramsay, R. R.; Gandour, R. D.; van der Leij, F. R. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* **2001**, *1546* (1), 21-43.
- (161) Shekhawat, P. S.; Matern, D.; Strauss, A. W. Fetal fatty acid oxidation disorders, their effect on maternal health and neonatal outcome: impact of expanded newborn screening on their diagnosis and management. *Pediatric research* **2005**, *57* (7), 78-86.
- (162) Adams, S. H.; Hoppel, C. L.; Lok, K. H.; Zhao, L.; Wong, S. W.; Minkler, P. E.; Hwang, D. H.; Newman, J. W.; Garvey, W. T. Plasma acylcarnitine profiles suggest incomplete long-chain fatty acid β -oxidation and altered tricarboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic African-American women. *The Journal of nutrition* **2009**, *139* (6), 1073-1081.

Bibliografia

(163) 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. *International journal of molecular sciences* **2013**, *14* (4), 8047-8061.

(164) His, M.; Viallon, V.; Dossus, L.; Gicquiau, A.; Achaintre, D.; Scalbert, A.; Ferrari, P.; Romieu, I.; Onland-Moret, N. C.; Weiderpass, E. Prospective analysis of circulating metabolites and breast cancer in EPIC. *BMC medicine* **2019**, *17* (1), 1-13.

(165) Ganti, S.; Taylor, S. L.; Kim, K.; Hoppel, C. L.; Guo, L.; Yang, J.; Evans, C.; Weiss, R. H. Urinary acylcarnitines are altered in human kidney cancer. *International journal of cancer* **2012**, *130* (12), 2791-2800.

(166) Luo, X.; Cheng, C.; Tan, Z.; Li, N.; Tang, M.; Yang, L.; Cao, Y. Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis. *Molecular cancer* **2017**, *16* (1), 1-10.

(167) Ogretmen, B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nature Reviews Cancer* **2018**, *18* (1), 33-50.

(168) Mashhadi Akbar Boojar, M.; Mashhadi Akbar Boojar, M.; Golmohammad, S. Ceramide pathway: a novel approach to cancer chemotherapy. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* **2018**, *5* (4), 237-244.

(169) Schiffmann, S.; Sandner, J.; Birod, K.; Wobst, I.; Angioni, C.; Ruckhäberle, E.; Kaufmann, M.; Ackermann, H.; Lötsch, J.; Schmidt, H. Ceramide synthases and ceramide levels are increased in breast cancer tissue. *Carcinogenesis* **2009**, *30* (5), 745-752.

(170) Samuel, V. T.; Shulman, G. I. Nonalcoholic fatty liver disease, insulin resistance, and ceramides. *New England Journal of Medicine* **2019**, *381* (19), 1866-1869.

(171) Kuerer, H. M.; Newman, L. A.; Smith, T. L.; Ames, F. C.; Hunt, K. K.; Dhingra, K.; Theriault, R. L.; Singh, G.; Binkley, S. M.; Sneige, N. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* **1999**, *17* (2), 460-460.

(172) Martínez-Outschoorn, U. E.; Pavlides, S.; Sotgia, F.; Lisanti, M. P. Mitochondrial biogenesis drives tumor cell proliferation. *The American journal of pathology* **2011**, *178* (5), 1949.

(173) Salem, A. F.; Whitaker-Menezes, D.; Howell, A.; Sotgia, F.; Lisanti, M. P. Mitochondrial biogenesis in epithelial cancer cells promotes breast cancer tumor growth and confers autophagy resistance. *Cell cycle* **2012**, *11* (22), 4174-4180.

(174) Lebok, P.; Schütt, K.; Kluth, M.; Witzel, I.; Wölber, L.; Paluchowski, P.; Terracciano, L.; Wilke, C.; Heilenkötter, U.; Müller, V. High mitochondrial content is associated with breast cancer aggressiveness. *Molecular and clinical oncology* **2021**, *15* (4), 1-9.

(175) Sánchez-Alvarez, R.; De Francesco, E. M.; Fiorillo, M.; Sotgia, F.; Lisanti, M. P. Mitochondrial Fission Factor (MFF) inhibits mitochondrial metabolism and reduces breast cancer stem cell (CSC) activity. *Frontiers in Oncology* **2020**, *10*, 1776.

(176) Fernández Ruano, M. L.; Besga García, B.; Montero Plata, A.; Dulín Íñiguez, E. Falsos positivos en cribado neonatal: elevación de C5-carnitina en neonatos por tratamiento parto con cefditoreno pivoxilo. *Revista Española de Salud Pública* **2018**, *92*.

(177) Chace, D. H.; Kalas, T. A.; Naylor, E. W. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clinical chemistry* **2003**, *49* (11), 1797-1817.

(178) Moore, S. C.; Playdon, M. C.; Sampson, J. N.; Hoover, R. N.; Trabert, B.; Matthews, C. E.; Ziegler, R. G. A metabolomics analysis of body mass index and postmenopausal breast cancer risk. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **2018**, *110* (6), 588-597.

(179) Audet-Delage, Y.; Villeneuve, L.; Grégoire, J.; Plante, M.; Guillemette, C. Identification of metabolomic biomarkers for endometrial cancer and its recurrence after surgery in postmenopausal women. *Frontiers in endocrinology* **2018**, *9*, 87.

Bibliografía

(180) Qu, Q.; Zeng, F.; Liu, X.; Wang, Q.; Deng, F. Fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I: emerging therapeutic targets in cancer. *Cell death & disease* **2016**, *7* (5), e22226-e22226.

(181) Altea Manzano, P.; Cuadros, A.; Van Elsen, J.; Fendt, S. M. Palmitate Metabolism—A driver of Metastasis Formation. In *BACR Annual Meeting 2020. Cancer metastases: from bedside to bench. Location: Brussels, Belgium, 2020*.

(182) Camarda, R.; Zhou, A. Y.; Kohnz, R. A.; Balakrishnan, S.; Mahieu, C.; Anderton, B.; Eyob, H.; Kajimura, S.; Tward, A.; Krings, G. Inhibition of fatty acid oxidation as a therapy for MYC-overexpressing triple-negative breast cancer. *Nature medicine* **2016**, *22* (4), 427-432.

(183) Yao, C.-H.; Liu, G.-Y.; Wang, R.; Moon, S. H.; Gross, R. W.; Patti, G. J. Identifying off-target effects of etomoxir reveals that carnitine palmitoyltransferase I is essential for cancer cell proliferation independent of β -oxidation. *PLoS biology* **2018**, *16* (3), e2003782.

(184) Tian, W.; Yao, Y.; Fan, G.; Zhou, Y.; Wu, M.; Xu, D.; Deng, Y. Changes in lipid profiles during and after (neo) adjuvant chemotherapy in women with early-stage breast cancer: A retrospective study. *PloS one* **2019**, *14* (8), e0221866.

(185) Cobo-Dols, M.; Pérez-Miranda, E.; Gil-Calle, S.; Alés-Díaz, I.; Villar-Chamorro, E.; Montesa-Pino, A.; Alcaide Garcia, J.; Carabante-Ocón, F.; Benavides-Orgaz, M. Changes in the serum amino acids concentrations after first cycle as a factor predictive of tumor response to chemotherapy. *Oncología (Barcelona)* **2005**, *28* (7), 21-28.

(186) Poschke, I.; Mao, Y.; Kiessling, R.; de Boniface, J. Tumor-dependent increase of serum amino acid levels in breast cancer patients has diagnostic potential and correlates with molecular tumor subtypes. *Journal of translational medicine* **2013**, *11* (1), 1-9.

(187) Euceda, L. R.; Haukaas, T. H.; Giskeødegård, G. F.; Vettukattil, R.; Engel, J.; Silwal-Pandit, L.; Lundgren, S.; Borgen, E.; Garred, Ø.; Postma, G. Evaluation of metabolomic changes during neoadjuvant chemotherapy combined with bevacizumab in breast cancer using MR spectroscopy. *Metabolomics* **2017**, *13* (4), 37.

(188) Marusyk, A.; Janiszewska, M.; Polyak, K. Intratumor heterogeneity: the rosetta stone of therapy resistance. *Cancer cell* **2020**, 37 (4), 471-484.

(189) Zapater-Moros, A.; Gámez-Pozo, A.; Prado-Vázquez, G.; Trilla-Fuertes, L.; Arevalillo, J. M.; Díaz-Almirón, M.; Navarro, H.; Maín, P.; Feliú, J.; Zamora, P. Probabilistic graphical models relate immune status with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Oncotarget* **2018**, 9 (45), 27586-27594.

(190) Vazquez, G. P. Caracterización molecular del melanoma mediante inteligencia artificial: Implicaciones en pacientes tratados con inmunoterapia. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, 2021.

(191) Sammut, S.-J.; Crispin-Ortuzar, M.; Chin, S.-F.; Provenzano, E.; Bardwell, H. A.; Ma, W.; Cope, W.; Dariush, A.; Dawson, S.-J.; Abraham, J. E. Multi-omic machine learning predictor of breast cancer therapy response. *Nature* **2021**, 1-10.

ANEXOS

Anexo I. Metabolitos identificados

METABOLITE	SUPER-PATHWAY	SUB_PATHWAY
alanine	Amino Acid	Alanine and Aspartate Metabolism
asparagine	Amino Acid	Alanine and Aspartate Metabolism
aspartate	Amino Acid	Alanine and Aspartate Metabolism
hydroxyasparagine**	Amino Acid	Alanine and Aspartate Metabolism
N,N-dimethylalanine	Amino Acid	Alanine and Aspartate Metabolism
N-acetylalanine	Amino Acid	Alanine and Aspartate Metabolism
N-acetylasparagine	Amino Acid	Alanine and Aspartate Metabolism
N-acetylaspartate(NAA)	Amino Acid	Alanine and Aspartate Metabolism
N-carbamoylalanine	Amino Acid	Alanine and Aspartate Metabolism
creatine	Amino Acid	Creatine Metabolism
creatinine	Amino Acid	Creatine Metabolism
guanidinoacetate	Amino Acid	Creatine Metabolism
4-hydroxyglutamate	Amino Acid	Glutamate Metabolism
alpha-ketoglutarate*	Amino Acid	Glutamate Metabolism
beta-citrylglutamate	Amino Acid	Glutamate Metabolism
carboxyethyl-GABA	Amino Acid	Glutamate Metabolism
gamma-carboxyglutamate	Amino Acid	Glutamate Metabolism
glutamate	Amino Acid	Glutamate Metabolism
glutamine	Amino Acid	Glutamate Metabolism
N-acetyl-aspartyl-glutamate(NAAG)	Amino Acid	Glutamate Metabolism
N-acetylglutamate	Amino Acid	Glutamate Metabolism
N-acetylglutamine	Amino Acid	Glutamate Metabolism
pyroglutamine*	Amino Acid	Glutamate Metabolism
5-1-pyrroline-5-carboxylate	Amino Acid	Glutamate Metabolism
2-aminobutyrate	Amino Acid	Glutathione Metabolism
2-hydroxybutyrate/2-hydroxyisobutyrate	Amino Acid	Glutathione Metabolism
5-oxoproline	Amino Acid	Glutathione Metabolism
cys-gly,oxidized	Amino Acid	Glutathione Metabolism
cysteine-gluthathionedisulfide	Amino Acid	Glutathione Metabolism
cysteinylglycine	Amino Acid	Glutathione Metabolism
cysteinylglycinedisulfide*	Amino Acid	Glutathione Metabolism
glutathione,oxidized(GSSG)	Amino Acid	Glutathione Metabolism
2-methylserine	Amino Acid	Gly, Ser and Thr Metabolism
betaine	Amino Acid	Gly, Ser and Thr Metabolism
dimethylglycine	Amino Acid	Gly, Ser and Thr Metabolism
glycine	Amino Acid	Gly, Ser and Thr Metabolism
N-acetylglycine	Amino Acid	Gly, Ser and Thr Metabolism
N-acetylserine	Amino Acid	Gly, Ser and Thr Metabolism
N-acetylthreonine	Amino Acid	Gly, Ser and Thr Metabolism
sarcosine	Amino Acid	Gly, Ser and Thr Metabolism
serine	Amino Acid	Gly, Ser and Thr Metabolism
threonine	Amino Acid	Gly, Ser and Thr Metabolism
4-guanidinobutanoate	Amino Acid	Guanidino and Acetamido Metb*.
1-methyl-4-imidazoleacetate	Amino Acid	Histidine Metabolism
1-methyl-5-imidazoleacetate	Amino Acid	Histidine Metabolism
1-methylhistidine	Amino Acid	Histidine Metabolism
1-ribosyl-imidazoleacetate*	Amino Acid	Histidine Metabolism
3-methylhistidine	Amino Acid	Histidine Metabolism
4-imidazoleacetate	Amino Acid	Histidine Metabolism
formiminoglutamate	Amino Acid	Histidine Metabolism
histidine	Amino Acid	Histidine Metabolism
hydantoin-5-propionate	Amino Acid	Histidine Metabolism
imidazolelactate	Amino Acid	Histidine Metabolism
imidazolepropionate	Amino Acid	Histidine Metabolism
N-acetyl-1-methylhistidine*	Amino Acid	Histidine Metabolism
N-acetylcarnosine	Amino Acid	Histidine Metabolism
N-acetylhistidine	Amino Acid	Histidine Metabolism
trans-urocanate	Amino Acid	Histidine Metabolism
1-carboxyethylisoleucine	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
1-carboxyethylleucine	Amino Acid	Leu, Ile and Val Metabolism
1-carboxyethylvaline	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism

Anexos

2,3-dihydroxy-2-methylbutyrate	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
2-hydroxy-3-methylvalerate	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
2-ketocaprylate	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
2-methylbutyrylcarnitine(C5)	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
3-hydroxy-2-ethylpropionate	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
3-hydroxyisobutyrate	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
3-methyl-2-oxobutyrate	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
3-methyl-2-oxovalerate	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
3-methylglutaconate	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
3-methylglutaryl carnitine(2)	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
4-methyl-2-oxopentanoate	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
alpha-hydroxyisocaproate	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
alpha-hydroxyisovalerate	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
beta-hydroxyisovalerate	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
beta-hydroxyisovalerylcarnitine	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
ethylmalonate	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
isobutyrylcarnitine(C4)	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
isobutyrylglycine	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
isoleucine	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
isovalerate(i5:0)	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
isovalerylcarnitine(C5)	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
isovalerylglycine	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
leucine	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
methylsuccinate	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
N-acetylsoleucine	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
N-acetylleucine	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
N-acetylvaline	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
tiglylcarnitine(C5:1-DC)	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
valine	Amino Acid	Leu, Ile, and Val Metabolism
2-aminoadipate	Amino Acid	Lysine Metabolism
5-(galactosylhydroxy)-L-lysine	Amino Acid	Lysine Metabolism
5-hydroxylysine	Amino Acid	Lysine Metabolism
6-oxopiperidine-2-carboxylate	Amino Acid	Lysine Metabolism
fructosyllysine	Amino Acid	Lysine Metabolism
glutaryl carnitine(C5-DC)	Amino Acid	Lysine Metabolism
hydroxy-N6,N6,N6-trimethyllysine*	Amino Acid	Lysine Metabolism
lysine	Amino Acid	Lysine Metabolism
N,N,N-trimethyl-5-aminovalerate	Amino Acid	Lysine Metabolism
N,N-dimethyl-5-aminovalerate	Amino Acid	Lysine Metabolism
N2-acetyl,N6,N6-dimethyllysine	Amino Acid	Lysine Metabolism
N2-acetyl,N6-methyllysine	Amino Acid	Lysine Metabolism
N6,N6,N6-trimethyllysine	Amino Acid	Lysine Metabolism
N6,N6-dimethyllysine	Amino Acid	Lysine Metabolism
N6-acetyllysine	Amino Acid	Lysine Metabolism
N6-methyllysine	Amino Acid	Lysine Metabolism
pipecolate	Amino Acid	Lysine Metabolism
2,3-dihydroxy-5-methylthio-4-pentenoate(DMTPA)*	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
alpha-ketobutyrate	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
cystathionine	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
cysteine	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
cysteines-sulfate	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
cystine	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
hypotaurine	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
methionine	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
methioninesulfone	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
methioninesulfoxide	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
N-acetylmethionine	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
N-acetyltaurine	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
N-formylmethionine	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
N-methyltaurine	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
S-adenosylhomocysteine(SAH)	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
S-methylcysteine	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
S-methylcysteinesulfoxide	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
succinoyltaurine	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism
taurine	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Tau Metabolism

1-carboxyethylphenylalanine	Amino Acid	Phenylalanine Metabolism
2-hydroxyphenylacetate	Amino Acid	Phenylalanine Metabolism
4-hydroxyphenylacetate	Amino Acid	Phenylalanine Metabolism
N-acetylphenylalanine	Amino Acid	Phenylalanine Metabolism
phenylalanine	Amino Acid	Phenylalanine Metabolism
phenyllactate(PLA)	Amino Acid	Phenylalanine Metabolism
phenylpyruvate	Amino Acid	Phenylalanine Metabolism
(N(1)+N(8))-acetylspermidine	Amino Acid	Polyamine Metabolism
4-acetamidobutanoate	Amino Acid	Polyamine Metabolism
5-methylthioadenosine(MTA)	Amino Acid	Polyamine Metabolism
acisoga	Amino Acid	Polyamine Metabolism
N-acetyl-isoputrescine	Amino Acid	Polyamine Metabolism
N-acetylputrescine	Amino Acid	Polyamine Metabolism
spermidine	Amino Acid	Polyamine Metabolism
3-indoxylsulfate	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
6-bromotryptophan	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
C-glycosyltryptophan	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
indoleacetate	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
indoleacetyl carnitine*	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
indolelactate	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
indolepropionate	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
kynurenate	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
kynurenine	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
N-acetyltryptophan	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
N-formylanthranilic acid	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
picolinate	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
serotonin	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
tryptophan	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
tryptophanbetaine	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
xanthurenate	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
1-carboxyethyltyrosine	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
3-(4-hydroxyphenyl)lactate	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
3-methoxytyraminesulfate	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
3-methoxytyrosine	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
4-hydroxyphenylpyruvate	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
4-methoxyphenolsulfate	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
dopamine3-O-sulfate	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
gentisate	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
N-acetyltyrosine	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
N-formylphenylalanine	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
p-cresolglucuronide*	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
phenolsulfate	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
thyroxine	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
tyramineO-sulfate	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
tyrosine	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
vanillactate	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
vanillic alcohol sulfate	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
vanillylmandelate(VMA)	Amino Acid	Tyrosine Metabolism
2-oxoarginine*	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism#
3-amino-2-piperidone	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
argininate*	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
arginine	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
citrulline	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
dimethylarginine(SDMA+ADMA)	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
homoarginine	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
homocitrulline	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
N,N,N-trimethyl-alanylprolinebetaine(TMAP)	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
N2,N5-diacetylornithine	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
N-acetylarginine	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
N-acetylcitrulline	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
N-acetylproline	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
N-delta-acetylornithine	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
N-methylhydroxyproline**	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
N-methylproline	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
ornithine	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
pro-hydroxy-pro	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism

Anexos

proline	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
trans-4-hydroxyproline	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
urea	Amino Acid	Urea cycle; Arg and Pro Metabolism
N6-carboxymethyllysine	Carbohydrate	Advanced Glycation End-product
erythronate*	Carbohydrate	Aminosugar Metabolism
glucuronate	Carbohydrate	Aminosugar Metabolism
N-acetylglucosamine/N-acetylgalactosamine	Carbohydrate	Aminosugar Metabolism
N-acetylglucosaminylasparagine	Carbohydrate	Aminosugar Metabolism
N-acetylneuraminate	Carbohydrate	Aminosugar Metabolism
lactose	Carbohydrate	Disaccharides and Oligosaccharides
sucrose	Carbohydrate	Disaccharides and Oligosaccharides
fructose	Carbohydrate	Fructose, Mannose & Galactose Metb.
galactonate	Carbohydrate	Fructose, Mannose & Galactose Metb.
mannitol/sorbitol	Carbohydrate	Fructose, Mannose & Galactose Metb.
mannose	Carbohydrate	Fructose, Mannose & Galactose Metb.
maltose	Carbohydrate	Glycogen Metabolism
1,5-anhydroglucitol(1,5-AG)	Carbohydrate	Glycolysis, Gluconeog., & Pyr Metb [#] .
2,3-diphosphoglycerate	Carbohydrate	Glycolysis, Gluconeog., & Pyr Metb.
3-phosphoglycerate	Carbohydrate	Glycolysis, Gluconeog., & Pyr Metb.
glucose	Carbohydrate	Glycolysis, Gluconeog., & Pyr Metb.
glycerate	Carbohydrate	Glycolysis, Gluconeog., & Pyr Metb.
lactate	Carbohydrate	Glycolysis, Gluconeog., & Pyr Metb.
pyruvate	Carbohydrate	Glycolysis, Gluconeog., & Pyr Metb.
arabinose	Carbohydrate	Pentose Metabolism
arabitol/xylitol	Carbohydrate	Pentose Metabolism
arabonate/xylonate	Carbohydrate	Pentose Metabolism
ribitol	Carbohydrate	Pentose Metabolism
ribonate	Carbohydrate	Pentose Metabolism
ribulonate/xylulonate/lyxonate*	Carbohydrate	Pentose Metabolism
sedoheptulose	Carbohydrate	Pentose Metabolism
xylose	Carbohydrate	Pentose Metabolism
2-O-methylascorbicacid	Cofactors and Vits	Ascorbate and Aldarate Metabolism
ascorbicacid2-sulfate	Cofactors and Vits	Ascorbate and Aldarate Metabolism
ascorbicacid3-sulfate*	Cofactors and Vits	Ascorbate and Aldarate Metabolism
gulonate*	Cofactors and Vits	Ascorbate and Aldarate Metabolism
oxalate(ethanedioate)	Cofactors and Vits	Ascorbate and Aldarate Metabolism
threonate	Cofactors and Vits	Ascorbate and Aldarate Metabolism
bilirubin(E,E)*	Cofactors and Vits	Hemoglobin and Porphyrin Metb.
bilirubin(E,ZorZ,E)*	Cofactors and Vits	Hemoglobin and Porphyrin Metb.
bilirubin(Z,Z)	Cofactors and Vits	Hemoglobin and Porphyrin Metb.
biliverdin	Cofactors and Vits	Hemoglobin and Porphyrin Metb.
heme	Cofactors and Vits	Hemoglobin and Porphyrin Metb.
I-urobilinogen	Cofactors and Vits	Hemoglobin and Porphyrin Metb.
L-urobilin	Cofactors and Vits	Hemoglobin and Porphyrin Metb.
1-methylnicotinamide	Cofactors and Vits	Nicotinate and Nicotinamide Metb.
N1-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide	Cofactors and Vits	Nicotinate and Nicotinamide Metb.
N1-Methyl-4-pyridone-3-carboxamide	Cofactors and Vits	Nicotinate and Nicotinamide Metb.
nicotinamide	Cofactors and Vits	Nicotinate and Nicotinamide Metb.
quinolinate	Cofactors and Vits	Nicotinate and Nicotinamide Metb.
trigonelline(N'-methylnicotinate)	Cofactors and Vits	Nicotinate and Nicotinamide Metb.
pantoate	Cofactors and Vits	Pantothenate and CoA Metabolism
pantothenate	Cofactors and Vits	Pantothenate and CoA Metabolism
alpha-CEHCsulfate	Cofactors and Vits	Tocopherol Metabolism
alpha-tocopherol	Cofactors and Vits	Tocopherol Metabolism
gamma-CEHC	Cofactors and Vits	Tocopherol Metabolism
gamma-tocopherol/beta-tocopherol	Cofactors and Vits	Tocopherol Metabolism
beta-cryptoxanthin	Cofactors and Vits	Vitamin A Metabolism
carotenediol(1)	Cofactors and Vits	Vitamin A Metabolism
carotenediol(2)	Cofactors and Vits	Vitamin A Metabolism
carotenediol(3)	Cofactors and Vits	Vitamin A Metabolism
retinal	Cofactors and Vits	Vitamin A Metabolism
retinol(VitaminA)	Cofactors and Vits	Vitamin A Metabolism
pyridoxal	Cofactors and Vits	Vitamin B6 Metabolism
pyridoxate	Cofactors and Vits	Vitamin B6 Metabolism
pyridoxine(VitaminB6)	Cofactors and Vits	Vitamin B6 Metabolism
phosphate	Energy	Oxidative Phosphorylation

aconitate[cisortrans]	Energy	TCA Cycle
alpha-ketoglutarate	Energy	TCA Cycle
citraconate/glutaconate	Energy	TCA Cycle
citrate	Energy	TCA Cycle
fumarate	Energy	TCA Cycle
malate	Energy	TCA Cycle
succinate	Energy	TCA Cycle
succinylcarnitine(C4-DC)	Energy	TCA Cycle
11beta-hydroxyandrosteroneglucuronide	Lipid	Androgenic Steroids
16a-hydroxyDHEA3-sulfate	Lipid	Androgenic Steroids
5alpha-androstan-3alpha,17alpha-diolmonosulfate	Lipid	Androgenic Steroids
5alpha-androstan-3alpha,17beta-diolmonosulfate(1)	Lipid	Androgenic Steroids
5alpha-androstan-3beta,17alpha-dioldisulfate	Lipid	Androgenic Steroids
5alpha-androstan-3beta,17beta-dioldisulfate	Lipid	Androgenic Steroids
5alpha-androstan-3beta,17beta-diolmonosulfate(2)	Lipid	Androgenic Steroids
androstenediol(3alpha,17alpha)monosulfate(2)	Lipid	Androgenic Steroids
androstenediol(3alpha,17alpha)monosulfate(3)	Lipid	Androgenic Steroids
androstenediol(3beta,17beta)disulfate(1)	Lipid	Androgenic Steroids
androstenediol(3beta,17beta)disulfate(2)	Lipid	Androgenic Steroids
androstenediol(3beta,17beta)monosulfate(1)	Lipid	Androgenic Steroids
androstenediol(3beta,17beta)monosulfate(2)	Lipid	Androgenic Steroids
androsteroidmonosulfateC19H28O6S(1)*	Lipid	Androgenic Steroids
androsteroneglucuronide	Lipid	Androgenic Steroids
androsteronesulfate	Lipid	Androgenic Steroids
dehydroepiandrosteronesulfate(DHEA-S)	Lipid	Androgenic Steroids
epiandrosteronesulfate	Lipid	Androgenic Steroids
etiocholanoloneglucuronide	Lipid	Androgenic Steroids
carnitine	Lipid	Carnitine Metabolism
deoxycarnitine	Lipid	Carnitine Metabolism
palmitoyl-sphingosine-phosphoethanolamine(d18:1/16:0)	Lipid	Ceramide PEs
ceramide(d16:1/24:1,d18:1/22:1)*	Lipid	Ceramides
ceramide(d18:1/14:0,d16:1/16:0)*	Lipid	Ceramides
ceramide(d18:1/17:0,d17:1/18:0)*	Lipid	Ceramides
ceramide(d18:1/20:0,d16:1/22:0,d20:1/18:0)*	Lipid	Ceramides
ceramide(d18:2/24:1,d18:1/24:2)*	Lipid	Ceramides
N-behenoyl-sphingadienine(d18:2/22:0)*	Lipid	Ceramides
N-palmitoyl-heptadecaspingosine(d17:1/16:0)*	Lipid	Ceramides
N-palmitoyl-sphingadienine(d18:2/16:0)*	Lipid	Ceramides
N-palmitoyl-sphingosine(d18:1/16:0)	Lipid	Ceramides
N-stearoyl-sphingadienine(d18:2/18:0)*	Lipid	Ceramides
N-stearoyl-sphingosine(d18:1/18:0)*	Lipid	Ceramides
cortisol	Lipid	Corticosteroids
cortisone	Lipid	Corticosteroids
cortoloneglucuronide(1)	Lipid	Corticosteroids
diacylglycerol(16:1/18:2[2],16:0/18:3[1])*	Lipid	Diacylglycerol
linoleoyl-arachidonoyl-glycerol(18:2/20:4)[1]*	Lipid	Diacylglycerol
linoleoyl-arachidonoyl-glycerol(18:2/20:4)[2]*	Lipid	Diacylglycerol
linoleoyl-docosahexaenoyl-glycerol(18:2/22:6)[1]*	Lipid	Diacylglycerol
linoleoyl-docosahexaenoyl-glycerol(18:2/22:6)[2]*	Lipid	Diacylglycerol
linoleoyl-linolenoyl-glycerol(18:2/18:3)[2]*	Lipid	Diacylglycerol
linoleoyl-linoleoyl-glycerol(18:2/18:2)[1]*	Lipid	Diacylglycerol
linoleoyl-linoleoyl-glycerol(18:2/18:2)[2]*	Lipid	Diacylglycerol
oleoyl-arachidonoyl-glycerol(18:1/20:4)[1]*	Lipid	Diacylglycerol
oleoyl-arachidonoyl-glycerol(18:1/20:4)[2]*	Lipid	Diacylglycerol
oleoyl-linolenoyl-glycerol(18:1/18:3)[2]*	Lipid	Diacylglycerol
oleoyl-linoleoyl-glycerol(18:1/18:2)[1]	Lipid	Diacylglycerol
oleoyl-linoleoyl-glycerol(18:1/18:2)[2]	Lipid	Diacylglycerol
oleoyl-oleoyl-glycerol(18:1/18:1)[1]*	Lipid	Diacylglycerol
oleoyl-oleoyl-glycerol(18:1/18:1)[2]*	Lipid	Diacylglycerol
palmitoleoyl-arachidonoyl-glycerol(16:1/20:4)[2]*	Lipid	Diacylglycerol
palmitoleoyl-linoleoyl-glycerol(16:1/18:2)[1]*	Lipid	Diacylglycerol
palmitoyl-arachidonoyl-glycerol(16:0/20:4)[1]*	Lipid	Diacylglycerol
palmitoyl-arachidonoyl-glycerol(16:0/20:4)[2]*	Lipid	Diacylglycerol
palmitoyl-docosahexaenoyl-glycerol(16:0/22:6)[1]*	Lipid	Diacylglycerol
palmitoyl-linoleoyl-glycerol(16:0/18:2)[1]*	Lipid	Diacylglycerol
palmitoyl-linoleoyl-glycerol(16:0/18:2)[2]*	Lipid	Diacylglycerol

Anexos

palmitoyl-oleoyl-glycerol(16:0/18:1)[1]*	Lipid	Diacylglycerol
palmitoyl-oleoyl-glycerol(16:0/18:1)[2]*	Lipid	Diacylglycerol
stearoyl-arachidonoyl-glycerol(18:0/20:4)[1]*	Lipid	Diacylglycerol
stearoyl-arachidonoyl-glycerol(18:0/20:4)[2]*	Lipid	Diacylglycerol
N-palmitoyl-sphinganine(d18:0/16:0)	Lipid	Dihydroceramides
N-stearoyl-sphinganine(d18:0/18:0)*	Lipid	Dihydroceramides
behenoyldihydrosphingomyelin(d18:0/22:0)*	Lipid	Dihydrosphingomyelins
myristoyldihydrosphingomyelin(d18:0/14:0)*	Lipid	Dihydrosphingomyelins
palmitoyldihydrosphingomyelin(d18:0/16:0)*	Lipid	Dihydrosphingomyelins
sphingomyelin(d18:0/18:0,d19:0/17:0)*	Lipid	Dihydrosphingomyelins
sphingomyelin(d18:0/20:0,d16:0/22:0)*	Lipid	Dihydrosphingomyelins
14-HDoHE/17-HDoHE	Lipid	Docosanoid
N-oleoylserine	Lipid	Endocannabinoid
N-oleoyltaurine	Lipid	Endocannabinoid
N-stearoylserine*	Lipid	Endocannabinoid
N-stearoyltaurine	Lipid	Endocannabinoid
oleoylethanolamide	Lipid	Endocannabinoid
adipoylcarnitine(C6-DC)	Lipid	FAM [#] (Acyl Carnitine, Dicarboxylate)
octadecanedioylcarnitine(C18-DC)*	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Dicarboxylate)
octadecenedioylcarnitine(C18:1-DC)*	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Dicarboxylate)
pimeloylcarnitine/3-methyladipoylcarnitine(C7-DC)	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Dicarboxylate)
(S)-3-hydroxybutyrylcarnitine	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Hydroxy)
3-hydroxydecanoylcarnitine	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Hydroxy)
3-hydroxyhexanoylcarnitine(1)	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Hydroxy)
3-hydroxyoleoylcarnitine	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Hydroxy)
arachidoylcarnitine(C20)*	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, LCS*)
behenoylcarnitine(C22)*	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, LCS)
cerotoylcarnitine(C26)*	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, LCS)
lignoceroylcarnitine(C24)*	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, LCS)
margaroylcarnitine(C17)*	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, LCS)
myristoylcarnitine(C14)	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, LCS)
palmitoylcarnitine(C16)	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, LCS)
stearoylcarnitine(C18)	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, LCS)
decanoylcarnitine(C10)	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Medium Chain)
hexanoylcarnitine(C6)	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Medium Chain)
laurylcarnitine(C12)	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Medium Chain)
nonanoylcarnitine(C9)	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Medium Chain)
octanoylcarnitine(C8)	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Medium Chain)
3-decenoylcarnitine	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Monounsat. [#])
5-dodecenoylcarnitine(C12:1)	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Monounsat.)
cis-4-decenoylcarnitine(C10:1)	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Monounsat.)
eicosenoylcarnitine(C20:1)*	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Monounsat.)
myristoleoylcarnitine(C14:1)*	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Monounsat.)
nervonoylcarnitine(C24:1)*	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Monounsat.)
oleoylcarnitine(C18:1)	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Monounsat.)
palmitoleoylcarnitine(C16:1)*	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Monounsat.)
undecenoylcarnitine(C11:1)	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Monounsat.)
ximenoylcarnitine(C26:1)*	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Monounsat.)
arachidonoylcarnitine(C20:4)	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Polyunsat. [#])
dihomo-linolenoylcarnitine(C20:3n3or6)*	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Polyunsat.)
dihomo-linoleoylcarnitine(C20:2)*	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Polyunsat.)
docosaheptaenoylcarnitine(C22:6)*	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Polyunsat.)
linolenoylcarnitine(C18:3)*	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Polyunsat.)
linoleoylcarnitine(C18:2)*	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Polyunsat.)
acetylcarnitine(C2)	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Polyunsat.)
arachidonoylcholine	Lipid	Fatty Acid Metabolism (Acyl Choline)
dihomo-linolenoyl-choline	Lipid	Fatty Acid Metabolism (Acyl Choline)
docosaheptaenoylcholine	Lipid	Fatty Acid Metabolism (Acyl Choline)
linoleoylcholine*	Lipid	Fatty Acid Metabolism (Acyl Choline)
oleoylcholine	Lipid	Fatty Acid Metabolism (Acyl Choline)
palmitoylcholine	Lipid	Fatty Acid Metabolism (Acyl Choline)
stearoylcholine*	Lipid	Fatty Acid Metabolism (Acyl Choline)
hexanoylglutamine	Lipid	FAM (Acyl Glutamine)
3-hydroxybutyrylglutamine**	Lipid	Fatty Acid Metabolism (Acyl Glycine)
hexanoylglutamine	Lipid	Fatty Acid Metabolism (Acyl Glycine)
N-palmitoylglutamine	Lipid	Fatty Acid Metabolism (Acyl Glycine)

picolinoylglycine	Lipid	Fatty Acid Metabolism (Acyl Glycine)
butyrylcarnitine(C4)	Lipid	Fatty Acid Metabolism (also BCAA)
butyrylglycine	Lipid	Fatty Acid Metabolism (also BCAA)
methylmalonate(MMA)	Lipid	Fatty Acid Metabolism (also BCAA)
propionylcarnitine(C3)	Lipid	Fatty Acid Metabolism (also BCAA)
propionylglycine	Lipid	Fatty Acid Metabolism (also BCAA)
malonate	Lipid	Fatty Acid Synthesis
2-aminoheptanoate	Lipid	Fatty Acid, Amino
2-aminooctanoate	Lipid	Fatty Acid, Amino
N-acetyl-2-aminooctanoate*	Lipid	Fatty Acid, Amino
(14or15)-methylpalmitate(a17:0ori17:0)	Lipid	Fatty Acid, Branched
(16or17)-methylstearate(a19:0ori19:0)	Lipid	Fatty Acid, Branched
2-hydroxyphytanate*	Lipid	Fatty Acid, Branched
branched-chainfattyacid18:0(2)**	Lipid	Fatty Acid, Branched
2-hydroxyglutarate	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
2-hydroxysebacate	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
3-carboxy-4-methyl-5-pentyl-2-furanpropionate(3-CMPFP)**	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoate(CMPF)	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
3-hydroxyadipate*	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
3-hydroxydodecanedioate*	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
3-methylglutarate/2-methylglutarate	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
4-hydroxy-2-oxoglutaricacid	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
adipate(C6-DC)	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
azelate(C9-DC)	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
branchedchain14:0dicarboxylicacid**	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
decadienedioicacid(C10:2-DC)**	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
docosadioate(C22-DC)	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
dodecadienoate(12:2)*	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
dodecanedioate(C12-DC)	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
dodecenedioate(C12:1-DC)*	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
eicosanedioate(C20-DC)	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
eicosenedioate(C20:1-DC)*	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
glutarate(C5-DC)	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
heptenedioate(C7:1-DC)*	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
hexadecanedioate(C16-DC)	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
hexadecenedioate(C16:1-DC)*	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
hydroxy-CMPF*	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
maleate	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
octadecadienedioate(C18:2-DC)*	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
octadecanedioate(C18-DC)	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
octadecenedioate(C18:1-DC)	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
sebacate(C10-DC)	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
suberate(C8-DC)	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
tetradecadienedioate(C14:2-DC)*	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
tetradecanedioate(C14-DC)	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
tridecenedioate(C13:1-DC)*	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
undecanedioate(C11-DC)	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
12,13-DiHOME	Lipid	Fatty Acid, Dihydroxy
2R,3R-dihydroxybutyrate	Lipid	Fatty Acid, Dihydroxy
2S,3R-dihydroxybutyrate	Lipid	Fatty Acid, Dihydroxy
3,4-dihydroxybutyrate	Lipid	Fatty Acid, Dihydroxy
9,10-DiHOME	Lipid	Fatty Acid, Dihydroxy
13-HODE+9-HODE	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
16-hydroxypalmitate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
2-hydroxyarachidate*	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
2-hydroxydecanoate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
2-hydroxylaurate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
2-hydroxynervonate*	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
2-hydroxyoctanoate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
2-hydroxypalmitate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
2-hydroxystearate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
3-hydroxydecanoate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
3-hydroxyhexanoate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
3-hydroxylaurate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
3-hydroxyoctanoate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
3-hydroxysebacate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy

Anexos

9-hydroxystearate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
alpha-hydroxycaproate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
trans-4-hydroxycrotonicacid	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
glycerol	Lipid	Glycerolipid Metabolism
glycerol3-phosphate	Lipid	Glycerolipid Metabolism
glycosylceramide(d18:1/20:0,d16:1/22:0)*	Lipid	Hexosylceramides (HCER)
glycosylceramide(d18:1/23:1,d17:1/24:1)*	Lipid	Hexosylceramides (HCER)
glycosylceramide(d18:2/24:1,d18:1/24:2)*	Lipid	Hexosylceramides (HCER)
glycosyl-N-(2-hydroxynervonoyl)-sphingosine(d18:1/24:1(2OH))*	Lipid	Hexosylceramides (HCER)
glycosyl-N-behenoyl-sphingadienine(d18:2/22:0)*	Lipid	Hexosylceramides (HCER)
glycosyl-N-palmitoyl-sphingosine(d18:1/16:0)	Lipid	Hexosylceramides (HCER)
glycosyl-N-stearoyl-sphingosine(d18:1/18:0)	Lipid	Hexosylceramides (HCER)
glycosyl-N-tricosanoyl-sphingadienine(d18:2/23:0)*	Lipid	Hexosylceramides (HCER)
chiro-inositol	Lipid	Inositol Metabolism
myo-inositol	Lipid	Inositol Metabolism
3-hydroxybutyrate(BHBA)	Lipid	Ketone Bodies
acetoacetate	Lipid	Ketone Bodies
lactosyl-N-behenoyl-sphingosine(d18:1/22:0)*	Lipid	Lactosylceramides (LCER)
lactosyl-N-nervonoyl-sphingosine(d18:1/24:1)*	Lipid	Lactosylceramides (LCER)
lactosyl-N-palmitoyl-sphingosine(d18:1/16:0)	Lipid	Lactosylceramides (LCER)
10-heptadecenoate(17:1n7)	Lipid	Long Chain Monounsats. Fatty Acid
10-nonadecenoate(19:1n9)	Lipid	Long Chain Monounsats. Fatty Acid
eicosenoate(20:1)	Lipid	Long Chain Monounsats. Fatty Acid
erucate(22:1n9)	Lipid	Long Chain Monounsats. Fatty Acid
myristoleate(14:1n5)	Lipid	Long Chain Monounsats. Fatty Acid
oleate/vaccenate(18:1)	Lipid	Long Chain Monounsats. Fatty Acid
palmitoleate(16:1n7)	Lipid	Long Chain Monounsats. Fatty Acid
adrenate(22:4n6)	Lipid	LCPFA# (n3 and n6)
arachidonate(20:4n6)	Lipid	LCPFA (n3 and n6)
dihomo-linoleate(20:2n6)	Lipid	LCPFA (n3 and n6)
dihomo-linolenate(20:3n3orn6)	Lipid	LCPFA (n3 and n6)
docosadienoate(22:2n6)	Lipid	LCPFA (n3 and n6)
docosahexaenoate(DHA;22:6n3)	Lipid	LCPFA (n3 and n6)
docosapentaenoate(n3DPA;22:5n3)	Lipid	LCPFA (n3 and n6)
docosapentaenoate(n6DPA;22:5n6)	Lipid	LCPFA (n3 and n6)
docosatrienoate(22:3n3)	Lipid	LCPFA (n3 and n6)
eicosapentaenoate(EPA;20:5n3)	Lipid	LCPFA (n3 and n6)
hexadecadienoate(16:2n6)	Lipid	LCPFA (n3 and n6)
linoleate(18:2n6)	Lipid	LCPFA (n3 and n6)
linolenate[alphaorgamma;(18:3n3or6)]	Lipid	LCPFA (n3 and n6)
stearidonate(18:4n3)	Lipid	LCPFA (n3 and n6)
tetradecadienoate(14:2)*	Lipid	LCPFA (n3 and n6)
arachidate(20:0)	Lipid	Long Chain Saturated Fatty Acid
behenate(22:0)*	Lipid	Long Chain Saturated Fatty Acid
margarate(17:0)	Lipid	Long Chain Saturated Fatty Acid
myristate(14:0)	Lipid	Long Chain Saturated Fatty Acid
nonadecanoate(19:0)	Lipid	Long Chain Saturated Fatty Acid
palmitate(16:0)	Lipid	Long Chain Saturated Fatty Acid
pentadecanoate(15:0)	Lipid	Long Chain Saturated Fatty Acid
stearate(18:0)	Lipid	Long Chain Saturated Fatty Acid
1-arachidonoyl-GPC(20:4n6)*	Lipid	Lysophospholipid
1-arachidonoyl-GPE(20:4n6)*	Lipid	Lysophospholipid
1-arachidonoyl-GPI(20:4)*	Lipid	Lysophospholipid
1-cerotoyl-GPC(26:0)*	Lipid	Lysophospholipid
1-lignoceroyl-GPC(24:0)	Lipid	Lysophospholipid
1-linolenoyl-GPC(18:3)*	Lipid	Lysophospholipid
1-linoleoyl-GPA(18:2)*	Lipid	Lysophospholipid
1-linoleoyl-GPC(18:2)	Lipid	Lysophospholipid
1-linoleoyl-GPE(18:2)*	Lipid	Lysophospholipid
1-linoleoyl-GPG(18:2)*	Lipid	Lysophospholipid
1-linoleoyl-GPI(18:2)*	Lipid	Lysophospholipid
1-oleoyl-GPC(18:1)	Lipid	Lysophospholipid
1-oleoyl-GPE(18:1)	Lipid	Lysophospholipid
1-oleoyl-GPG(18:1)*	Lipid	Lysophospholipid
1-oleoyl-GPI(18:1)	Lipid	Lysophospholipid
1-palmitoleoyl-GPC(16:1)*	Lipid	Lysophospholipid

1-palmitoyl-GPC(16:0)	Lipid	Lysophospholipid
1-palmitoyl-GPE(16:0)	Lipid	Lysophospholipid
1-palmitoyl-GPG(16:0)*	Lipid	Lysophospholipid
1-palmitoyl-GPI(16:0)	Lipid	Lysophospholipid
1-stearoyl-GPC(18:0)	Lipid	Lysophospholipid
1-stearoyl-GPE(18:0)	Lipid	Lysophospholipid
1-stearoyl-GPG(18:0)	Lipid	Lysophospholipid
1-stearoyl-GPI(18:0)	Lipid	Lysophospholipid
1-stearoyl-GPS(18:0)*	Lipid	Lysophospholipid
2-palmitoleoyl-GPC(16:1)*	Lipid	Lysophospholipid
2-palmitoyl-GPC(16:0)*	Lipid	Lysophospholipid
2-stearoyl-GPE(18:0)*	Lipid	Lysophospholipid
1-(1-enyl-oleoyl)-GPE(P-18:1)*	Lipid	Lysoplasmalogen
1-(1-enyl-palmitoyl)-GPC(P-16:0)*	Lipid	Lysoplasmalogen
1-(1-enyl-palmitoyl)-GPE(P-16:0)*	Lipid	Lysoplasmalogen
1-(1-enyl-stearoyl)-GPE(P-18:0)*	Lipid	Lysoplasmalogen
(2or3)-decanoate(10:1n7orn8)	Lipid	Medium Chain Fatty Acid
10-undecenoate(11:1n1)	Lipid	Medium Chain Fatty Acid
5-dodecenoate(12:1n7)	Lipid	Medium Chain Fatty Acid
caprate(10:0)	Lipid	Medium Chain Fatty Acid
caproate(6:0)	Lipid	Medium Chain Fatty Acid
cis-4-decenoate(10:1n6)*	Lipid	Medium Chain Fatty Acid
heptanoate(7:0)	Lipid	Medium Chain Fatty Acid
laurate(12:0)	Lipid	Medium Chain Fatty Acid
3-hydroxy-3-methylglutarate	Lipid	Mevalonate Metabolism
1-arachidonylglycerol(20:4)	Lipid	Monoacylglycerol
1-dihomo-linolenylglycerol(20:3)	Lipid	Monoacylglycerol
1-linoleoylglycerol(18:2)	Lipid	Monoacylglycerol
1-myristoylglycerol(14:0)	Lipid	Monoacylglycerol
1-oleoylglycerol(18:1)	Lipid	Monoacylglycerol
1-palmitoleoylglycerol(16:1)*	Lipid	Monoacylglycerol
1-palmitoylglycerol(16:0)	Lipid	Monoacylglycerol
2-linoleoylglycerol(18:2)	Lipid	Monoacylglycerol
2-oleoylglycerol(18:1)	Lipid	Monoacylglycerol
2-palmitoylglycerol(16:0)	Lipid	Monoacylglycerol
1,2-dilinoleoyl-GPC(18:2/18:2)	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1,2-dipalmitoyl-GPC(16:0/16:0)	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-linoleoyl-2-arachidonoyl-GPC(18:2/20:4n6)*	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-linoleoyl-2-linolenoyl-GPC(18:2/18:3)*	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-myristoyl-2-arachidonoyl-GPC(14:0/20:4)*	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-myristoyl-2-palmitoyl-GPC(14:0/16:0)	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-oleoyl-2-docosahexaenoyl-GPC(18:1/22:6)*	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-palmitoleoyl-2-linolenoyl-GPC(16:1/18:3)*	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-palmitoleoyl-2-linoleoyl-GPC(16:1/18:2)*	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-palmitoyl-2-arachidonoyl-GPC(16:0/20:4n6)	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-palmitoyl-2-dihomo-linolenoyl-GPC(16:0/20:3n3or6)*	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-GPC(16:0/22:6)	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-palmitoyl-2-gamma-linolenoyl-GPC(16:0/18:3n6)*	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-palmitoyl-2-linoleoyl-GPC(16:0/18:2)	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-palmitoyl-2-oleoyl-GPC(16:0/18:1)	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-palmitoyl-2-palmitoleoyl-GPC(16:0/16:1)*	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-palmitoyl-2-stearoyl-GPC(16:0/18:0)	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-stearoyl-2-arachidonoyl-GPC(18:0/20:4)	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-GPC(18:0/22:6)	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-stearoyl-2-linoleoyl-GPC(18:0/18:2)*	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1-stearoyl-2-oleoyl-GPC(18:0/18:1)	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)
1,2-dilinoleoyl-GPE(18:2/18:2)*	Lipid	Phosphatidylethanolamine (PE)
1,2-dipalmitoyl-GPE(16:0/16:0)*	Lipid	Phosphatidylethanolamine (PE)
1-oleoyl-2-arachidonoyl-GPE(18:1/20:4)*	Lipid	Phosphatidylethanolamine (PE)
1-oleoyl-2-docosahexaenoyl-GPE(18:1/22:6)*	Lipid	Phosphatidylethanolamine (PE)
1-oleoyl-2-linoleoyl-GPE(18:1/18:2)*	Lipid	Phosphatidylethanolamine (PE)
1-palmitoyl-2-arachidonoyl-GPE(16:0/20:4)*	Lipid	Phosphatidylethanolamine (PE)
1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-GPE(16:0/22:6)*	Lipid	Phosphatidylethanolamine (PE)
1-palmitoyl-2-linoleoyl-GPE(16:0/18:2)	Lipid	Phosphatidylethanolamine (PE)
1-palmitoyl-2-oleoyl-GPE(16:0/18:1)	Lipid	Phosphatidylethanolamine (PE)
1-palmitoyl-2-stearoyl-GPE(16:0/18:0)*	Lipid	Phosphatidylethanolamine (PE)

Anexos

1-stearoyl-2-arachidonoyl-GPE(18:0/20:4)	Lipid	Phosphatidylethanolamine (PE)
1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-GPE(18:0/22:6)*	Lipid	Phosphatidylethanolamine (PE)
1-stearoyl-2-linoleoyl-GPE(18:0/18:2)*	Lipid	Phosphatidylethanolamine (PE)
1-stearoyl-2-oleoyl-GPE(18:0/18:1)	Lipid	Phosphatidylethanolamine (PE)
1-palmitoyl-2-arachidonoyl-GPI(16:0/20:4)*	Lipid	Phosphatidylinositol (PI)
1-palmitoyl-2-linoleoyl-GPI(16:0/18:2)	Lipid	Phosphatidylinositol (PI)
1-palmitoyl-2-oleoyl-GPI(16:0/18:1)*	Lipid	Phosphatidylinositol (PI)
1-stearoyl-2-arachidonoyl-GPI(18:0/20:4)	Lipid	Phosphatidylinositol (PI)
1-stearoyl-2-linoleoyl-GPI(18:0/18:2)	Lipid	Phosphatidylinositol (PI)
1-stearoyl-2-oleoyl-GPI(18:0/18:1)*	Lipid	Phosphatidylinositol (PI)
1-stearoyl-2-arachidonoyl-GPS(18:0/20:4)	Lipid	Phosphatidylserine (PS)
1-stearoyl-2-oleoyl-GPS(18:0/18:1)	Lipid	Phosphatidylserine (PS)
choline	Lipid	Phospholipid Metabolism
cholinephosphate	Lipid	Phospholipid Metabolism
glycerophosphoethanolamine	Lipid	Phospholipid Metabolism
glycerophosphorylcholine(GPC)	Lipid	Phospholipid Metabolism
phosphoethanolamine	Lipid	Phospholipid Metabolism
trimethylamineN-oxide	Lipid	Phospholipid Metabolism
1-(1-enyl-palmitoyl)-2-arachidonoyl-GPC(P-16:0/20:4)*	Lipid	Plasmalogen
1-(1-enyl-palmitoyl)-2-arachidonoyl-GPE(P-16:0/20:4)*	Lipid	Plasmalogen
1-(1-enyl-palmitoyl)-2-linoleoyl-GPC(P-16:0/18:2)*	Lipid	Plasmalogen
1-(1-enyl-palmitoyl)-2-linoleoyl-GPE(P-16:0/18:2)*	Lipid	Plasmalogen
1-(1-enyl-palmitoyl)-2-oleoyl-GPC(P-16:0/18:1)*	Lipid	Plasmalogen
1-(1-enyl-palmitoyl)-2-oleoyl-GPE(P-16:0/18:1)*	Lipid	Plasmalogen
1-(1-enyl-palmitoyl)-2-palmitoleoyl-GPC(P-16:0/16:1)*	Lipid	Plasmalogen
1-(1-enyl-palmitoyl)-2-palmitoyl-GPC(P-16:0/16:0)*	Lipid	Plasmalogen
1-(1-enyl-stearoyl)-2-arachidonoyl-GPE(P-18:0/20:4)*	Lipid	Plasmalogen
1-(1-enyl-stearoyl)-2-linoleoyl-GPE(P-18:0/18:2)*	Lipid	Plasmalogen
1-(1-enyl-stearoyl)-2-oleoyl-GPE(P-18:0/18:1)	Lipid	Plasmalogen
21-hydroxypregnenolonedisulfate	Lipid	Pregnenolone Steroids
pregnenedioldisulfate(C21H34O8S2)*	Lipid	Pregnenolone Steroids
pregnenediolsulfate(C21H34O5S)*	Lipid	Pregnenolone Steroids
pregnenetrioldisulfate*	Lipid	Pregnenolone Steroids
pregnenetriolsulfate*	Lipid	Pregnenolone Steroids
pregnenolonesulfate	Lipid	Pregnenolone Steroids
chenodeoxycholate	Lipid	Primary Bile Acid Metabolism
cholate	Lipid	Primary Bile Acid Metabolism
glyco-beta-muricholate**	Lipid	Primary Bile Acid Metabolism
glycochenodeoxycholate	Lipid	Primary Bile Acid Metabolism
glycochenodeoxycholate3-sulfate	Lipid	Primary Bile Acid Metabolism
glycochenodeoxycholateglucuronide(1)	Lipid	Primary Bile Acid Metabolism
glycocholate	Lipid	Primary Bile Acid Metabolism
glycocholateglucuronide(1)	Lipid	Primary Bile Acid Metabolism
taurochenodeoxycholate	Lipid	Primary Bile Acid Metabolism
taurocholate	Lipid	Primary Bile Acid Metabolism
5alpha-pregnan-3beta,20alpha-dioldisulfate	Lipid	Progestin Steroids
5alpha-pregnan-3beta,20alpha-diolmonosulfate(2)	Lipid	Progestin Steroids
5alpha-pregnan-3beta,20beta-diolmonosulfate(1)	Lipid	Progestin Steroids
5alpha-pregnan-dioldisulfate	Lipid	Progestin Steroids
pregnanediol-3-glucuronide	Lipid	Progestin Steroids
pregnanolone/allopregnanolonesulfate	Lipid	Progestin Steroids
3b-hydroxy-5-cholenoicacid	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
3-dehydrochenodeoxycholate	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
deoxycholate	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
deoxycholicacid(12or24)-sulfate*	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
deoxycholicacidglucuronide	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
glycocholatesulfate*	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
glycodeoxycholate	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
glycodeoxycholate3-sulfate	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
glycodeoxycholateglucuronide(1)	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
glycohyocholate	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
glycolithocholate	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
glycolithocholatesulfate*	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
glycoursodeoxycholate	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
glycoursodeoxycholicacidsulfate(1)	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
hyocholate	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism

isoursodeoxycholate	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
lithocholatesulfate(1)	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
taurochenodeoxycholicacid3-sulfate	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
taurocholatesulfate*	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
taurodeoxycholate	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
taurodeoxycholicacid3-sulfate	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
tauroolithocholate3-sulfate	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
taouroursodeoxycholate	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
ursodeoxycholate	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
butyrate/isobutyrate(4:0)	Lipid	Short Chain Fatty Acid
valerate(5:0)	Lipid	Short Chain Fatty Acid
sphingadienine	Lipid	Sphingolipid Synthesis
sphinganine	Lipid	Sphingolipid Synthesis
sphinganine-1-phosphate	Lipid	Sphingolipid Synthesis
behenoylsphingomyelin(d18:1/22:0)*	Lipid	Sphingomyelins
hydroxypalmitoylsphingomyelin(d18:1/16:0(OH))**	Lipid	Sphingomyelins
lignoceroylsphingomyelin(d18:1/24:0)	Lipid	Sphingomyelins
palmitoylsphingomyelin(d18:1/16:0)	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d17:1/14:0,d16:1/15:0)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d17:1/16:0,d18:1/15:0,d16:1/17:0)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d17:2/16:0,d18:2/15:0)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:1/14:0,d16:1/16:0)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:1/17:0,d17:1/18:0,d19:1/16:0)	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:1/18:1,d18:2/18:0)	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:1/19:0,d19:1/18:0)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:1/20:0,d16:1/22:0)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:1/20:1,d18:2/20:0)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:1/20:2,d18:2/20:1,d16:1/22:2)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:1/21:0,d17:1/22:0,d16:1/23:0)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:1/22:1,d18:2/22:0,d16:1/24:1)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:1/22:2,d18:2/22:1,d16:1/24:2)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:1/24:1,d18:2/24:0)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:1/25:0,d19:0/24:1,d20:1/23:0,d19:1/24:0)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:2/14:0,d18:1/14:1)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:2/16:0,d18:1/16:1)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:2/18:1)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:2/21:0,d16:2/23:0)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:2/23:0,d18:1/23:1,d17:1/24:1)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:2/23:1)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:2/24:1,d18:1/24:2)*	Lipid	Sphingomyelins
sphingomyelin(d18:2/24:2)*	Lipid	Sphingomyelins
stearoylsphingomyelin(d18:1/18:0)	Lipid	Sphingomyelins
tricosanoylsphingomyelin(d18:1/23:0)*	Lipid	Sphingomyelins
hexadecaspingosine(d16:1)*	Lipid	Sphingosines
sphingosine	Lipid	Sphingosines
sphingosine1-phosphate	Lipid	Sphingosines
3beta,7alpha-dihydroxy-5-cholestenoate	Lipid	Sterol
3beta-hydroxy-5-cholestenoate	Lipid	Sterol
4-cholesten-3-one	Lipid	Sterol
7-alpha-hydroxy-3-oxo-4-cholestenoate(7-Hoca)	Lipid	Sterol
campesterol	Lipid	Sterol
cholesterol	Lipid	Sterol
allantoin	Nucleotide	Purine Metb. Xanthine/Inosine contg
hypoxanthine	Nucleotide	Purine Metb. Xanthine/Inosine contg
inosine	Nucleotide	Purine Metb. Xanthine/Inosine contg
inosine5'-monophosphate(IMP)	Nucleotide	Purine Metb. Xanthine/Inosine contg
N1-methylinosine	Nucleotide	Purine Metb. Xanthine/Inosine contg
urate	Nucleotide	Purine Metb. Xanthine/Inosine contg
xanthine	Nucleotide	Purine Metb. Xanthine/Inosine contg
xanthosine	Nucleotide	Purine Metb. Xanthine/Inosine contg
adenosine5'-diphosphate(ADP)	Nucleotide	Purine Metb. Adenine containing
adenosine5'-monophosphate(AMP)	Nucleotide	Purine Metb. Adenine containing
N1-methyladenosine	Nucleotide	Purine Metb. Adenine containing
N6-carbamoylthreonyladenosine	Nucleotide	Purine Metb. Adenine containing
N6-methyladenosine	Nucleotide	Purine Metb. Adenine containing
N6-succinyladenosine	Nucleotide	Purine Metb. Adenine containing

Anexos

7-methylguanine	Nucleotide	Purine Metb. Guanine containing
N2,N2-dimethylguanosine	Nucleotide	Purine Metb. Guanine containing
2'-O-methylcytidine	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Cytidine containing
3-methylcytidine	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Cytidine containing
cytidine	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Cytidine containing
cytosine	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Cytidine containing
N4-acetylcytidine	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Cytidine containing
dihydroorotate	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Orotate containing
orotate	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Orotate containing
orotidine	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Orotate containing
3-aminoisobutyrate	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Thymine contg#.
5,6-dihydrothymine	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Thymine contg.
2'-deoxyuridine	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Uracil containing
2'-O-methyluridine	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Uracil containing
3-(3-amino-3-carboxypropyl)uridine*	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Uracil containing
3-ureidopropionate	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Uracil containing
5,6-dihydrouridine	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Uracil containing
5-methyluridine(ribothymidine)	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Uracil containing
beta-alanine	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Uracil containing
N-acetyl-beta-alanine	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Uracil containing
pseudouridine	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Uracil containing
uracil	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Uracil containing
uridine	Nucleotide	Pyrimidine Metb. Uracil containing
branched-chain, straight-chain, or cyclopropyl10:1 fatty acid(1)*	Partially Charact.#	Partially Characterized Molecules
branched-chain, straight-chain, or cyclopropyl12:1 fatty acid*	Partially Charact.	Partially Characterized Molecules
GlcNAc sulfate conjugate of C21H34O2 steroid**	Partially Charact.	Partially Characterized Molecules
glucuronide of C10H18O2(1)*	Partially Charact.	Partially Characterized Molecules
glucuronide of C10H18O2(7)*	Partially Charact.	Partially Characterized Molecules
glucuronide of C10H18O2(8)*	Partially Charact.	Partially Characterized Molecules
glucuronide of C12H22O4(1)*	Partially Charact.	Partially Characterized Molecules
glucuronide of C14H26O4(1)*	Partially Charact.	Partially Characterized Molecules
glutamine conjugate of C6H10O2(1)*	Partially Charact.	Partially Characterized Molecules
glutamine conjugate of C6H10O2(2)*	Partially Charact.	Partially Characterized Molecules
glutamine conjugate of C7H12O2*	Partially Charact.	Partially Characterized Molecules
metabonolactonesulfate	Partially Charact.	Partially Characterized Molecules
pentose acid*	Partially Charact.	Partially Characterized Molecules
4-hydroxyphenylacetylglutamine	Peptide	Acetylated Peptides
phenylacetylcarnitine	Peptide	Acetylated Peptides
phenylacetylglutamate	Peptide	Acetylated Peptides
phenylacetylglutamine	Peptide	Acetylated Peptides
prolylglycine	Peptide	Dipeptide
FibrinopeptideA(2-15)**	Peptide	Fibrinogen Cleavage Peptide
FibrinopeptideA(3-16)**	Peptide	Fibrinogen Cleavage Peptide
FibrinopeptideA(5-16)*	Peptide	Fibrinogen Cleavage Peptide
FibrinopeptideA*	Peptide	Fibrinogen Cleavage Peptide
FibrinopeptideA, des-ala(1)*	Peptide	Fibrinogen Cleavage Peptide
FibrinopeptideA, phosphono-ser(3)*	Peptide	Fibrinogen Cleavage Peptide
FibrinopeptideB	Peptide	Fibrinogen Cleavage Peptide
FibrinopeptideB(1-11)**	Peptide	Fibrinogen Cleavage Peptide
FibrinopeptideB(1-12)**	Peptide	Fibrinogen Cleavage Peptide
FibrinopeptideB(1-13)**	Peptide	Fibrinogen Cleavage Peptide
gamma-glutamyl-2-aminobutyrate	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
gamma-glutamylalanine	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
gamma-glutamyl-alpha-lysine	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
gamma-glutamylcitrulline*	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
gamma-glutamyl-epsilon-lysine	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
gamma-glutamylglutamate	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
gamma-glutamylglutamine	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
gamma-glutamylglycine	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
gamma-glutamylhistidine	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
gamma-glutamylisoleucine*	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
gamma-glutamylleucine	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
gamma-glutamylmethionine	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
gamma-glutamylphenylalanine	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
gamma-glutamylthreonine	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
gamma-glutamyltryptophan	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid

gamma-glutamyltyrosine	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
gamma-glutamylvaline	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
N-methylpiperolate	Xenobiotics	Bacterial/Fungal
2-hydroxyhippurate(salicylurate)	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
2-methoxyhydroquinonesulfate(1)	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
2-methoxyhydroquinonesulfate(2)	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
3-(3-hydroxyphenyl)propionate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
3-(3-hydroxyphenyl)propionatesulfate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
3-hydroxyhippurate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
3-methoxycatecholsulfate(1)	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
3-methoxycatecholsulfate(2)	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
3-methylcatecholsulfate(1)	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
3-methylcatecholsulfate(2)	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
3-phenylpropionate(hydrocinamate)	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
4-acetylphenolsulfate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
4-allylcatecholsulfate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
4-ethylcatecholsulfate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
4-ethylphenylsulfate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
4-hydroxyhippurate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
4-methylcatecholsulfate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
4-methylguaiaacolsulfate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
4-vinylphenolsulfate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
benzoate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
catecholsulfate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
guaiaacolsulfate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
hippurate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
methyl-4-hydroxybenzoatesulfate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
o-cresolsulfate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
p-cresolsulfate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
propyl4-hydroxybenzoate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
propyl4-hydroxybenzoatesulfate	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
1,2,3-benzenetriolsulfate(2)	Xenobiotics	Chemical
2,2'-Methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol)	Xenobiotics	Chemical
2-aminophenolsulfate	Xenobiotics	Chemical
2-methoxyresorcinolsulfate	Xenobiotics	Chemical
2-naphtholsulfate	Xenobiotics	Chemical
3-(2-methoxyethoxy)propanoicacid	Xenobiotics	Chemical
3,5-dichloro-2,6-dihydroxybenzoicacid	Xenobiotics	Chemical
3-acetylphenolsulfate	Xenobiotics	Chemical
3-bromo-5-chloro-2,6-dihydroxybenzoicacid*	Xenobiotics	Chemical
3-hydroxy-2-methylpyridinesulfate	Xenobiotics	Chemical
3-hydroxypyridineglucuronide	Xenobiotics	Chemical
3-hydroxypyridinesulfate	Xenobiotics	Chemical
4-acetamidobenzoate	Xenobiotics	Chemical
4-chlorobenzoicacid	Xenobiotics	Chemical
4-hydroxychlorothalonil	Xenobiotics	Chemical
5-hydroxy-2-methylpyridinesulfate	Xenobiotics	Chemical
6-hydroxyindolesulfate	Xenobiotics	Chemical
ectoine	Xenobiotics	Chemical
EDTA	Xenobiotics	Chemical
ethylglucuronide	Xenobiotics	Chemical
ethylparabensulfate	Xenobiotics	Chemical
iminodiacetate(IDA)	Xenobiotics	Chemical
methylnaphthylsulfate(2)*	Xenobiotics	Chemical
N-acetyl-4-chlorophenylalanine	Xenobiotics	Chemical
O-sulfo-L-tyrosine	Xenobiotics	Chemical
perfluorooctanesulfonate(PFOS)	Xenobiotics	Chemical
perfluorooctanoate(PFOA)	Xenobiotics	Chemical
sulfate*	Xenobiotics	Chemical
thioprolin	Xenobiotics	Chemical
2-acetamidophenolsulfate	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
2-hydroxyacetaminophensulfate*	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
2-hydroxyibuprofen	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
2-methoxyacetaminophenglucuronide*	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
2-methoxyacetaminophensulfate*	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
3-(cystein-S-yl)acetaminophen*	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics

Anexos

3-(methylthio)acetaminophensulfate*	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
3-(N-acetyl-L-cystein-S-yl)acetaminophen	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
4-acetamidophenol	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
4-acetamidophenylglucuronide	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
4-acetaminophensulfate	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
carboxybuprofen	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
carboxybuprofen glucuronide*	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
celecoxib	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
desmethylnaproxen	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
desmethylnaproxensulfate	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
ibuprofenacylglucuronide	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
naproxen	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
O-desmethyltramadol	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
O-desmethyltramadolglucuronide	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
salicylic acid glucuronide*	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
tramadol	Xenobiotics	Drug - Analgesics, Anesthetics
amoxicillin	Xenobiotics	Drug - Antibiotic
ciprofloxacin	Xenobiotics	Drug - Antibiotic
ofloxacin	Xenobiotics	Drug - Antibiotic
quinine	Xenobiotics	Drug - Antibiotic
sulfociprofloxacin*	Xenobiotics	Drug - Antibiotic
dexamethasone	Xenobiotics	Drug - Antiinflam. Immunosupr.#
tamoxifen	Xenobiotics	Drug - Antineoplastic
4-hydroxycoumarin	Xenobiotics	Drug - Cardiovascular
atenolol	Xenobiotics	Drug - Cardiovascular
candesartan	Xenobiotics	Drug - Cardiovascular
enalapril	Xenobiotics	Drug - Cardiovascular
hydrochlorothiazide	Xenobiotics	Drug - Cardiovascular
indapamide	Xenobiotics	Drug - Cardiovascular
losartan	Xenobiotics	Drug - Cardiovascular
olmesartan	Xenobiotics	Drug - Cardiovascular
torasemide	Xenobiotics	Drug - Cardiovascular
valsartan	Xenobiotics	Drug - Cardiovascular
warfarin	Xenobiotics	Drug - Cardiovascular
dexlansoprazole	Xenobiotics	Drug - Gastrointestinal
omeprazole	Xenobiotics	Drug - Gastrointestinal
ondansetron	Xenobiotics	Drug - Gastrointestinal
pantoprazole	Xenobiotics	Drug - Gastrointestinal
ranitidine	Xenobiotics	Drug - Gastrointestinal
ranitidine N-oxide*	Xenobiotics	Drug - Gastrointestinal
atorvastatin(lipitor)	Xenobiotics	Drug - Metabolic
glyburide	Xenobiotics	Drug - Metabolic
metformin	Xenobiotics	Drug - Metabolic
sitagliptin	Xenobiotics	Drug - Metabolic
2-hydroxycarbamazepine	Xenobiotics	Drug - Neurological
carbamazepine	Xenobiotics	Drug - Neurological
carbamazepine 10,11-epoxide*	Xenobiotics	Drug - Neurological
carbamazepine glucuronide*	Xenobiotics	Drug - Neurological
gabapentin	Xenobiotics	Drug - Neurological
levetiracetam	Xenobiotics	Drug - Neurological
pregabalin	Xenobiotics	Drug - Neurological
taxol	Xenobiotics	Drug - Other
citalopram/escitalopram	Xenobiotics	Drug - Psychoactive
fluoxetine	Xenobiotics	Drug - Psychoactive
O-desmethylvenlafaxine	Xenobiotics	Drug - Psychoactive
paroxetine	Xenobiotics	Drug - Psychoactive
trazadone	Xenobiotics	Drug - Psychoactive
cetirizine	Xenobiotics	Drug - Respiratory
2,6-dihydroxybenzoic acid	Xenobiotics	Drug - Topical Agents
hydroquinonesulfate	Xenobiotics	Drug - Topical Agents
salicylate	Xenobiotics	Drug - Topical Agents
(2,4or2,5)-dimethylphenolsulfate	Xenobiotics	Food Component/Plant
(S)-a-amino-omega-caprolactam	Xenobiotics	Food Component/Plant
1,6-anhydroglucose	Xenobiotics	Food Component/Plant
2,3-dihydroxyisovalerate	Xenobiotics	Food Component/Plant
2-keto-3-deoxy-gluconate	Xenobiotics	Food Component/Plant

2-piperidinone	Xenobiotics	Food Component/Plant
3-ethylcatecholsulfate(1)	Xenobiotics	Food Component/Plant
3-formylindole	Xenobiotics	Food Component/Plant
3-hydroxystachydrine*	Xenobiotics	Food Component/Plant
3-indoleglyoxylicacid	Xenobiotics	Food Component/Plant
4-acetylcatecholsulfate(1)	Xenobiotics	Food Component/Plant
4-allylphenolsulfate	Xenobiotics	Food Component/Plant
4-vinylguaiacolsulfate	Xenobiotics	Food Component/Plant
acesulfame	Xenobiotics	Food Component/Plant
alliin	Xenobiotics	Food Component/Plant
betonicine	Xenobiotics	Food Component/Plant
caffeicacidsulfate	Xenobiotics	Food Component/Plant
cinnamoylglycine	Xenobiotics	Food Component/Plant
daidzeinsulfate(2)	Xenobiotics	Food Component/Plant
dihydrocaffeatesulfate(2)	Xenobiotics	Food Component/Plant
dihydroferulate	Xenobiotics	Food Component/Plant
ergothioneine	Xenobiotics	Food Component/Plant
erythritol	Xenobiotics	Food Component/Plant
ethylalpha-glucopyranoside	Xenobiotics	Food Component/Plant
ethylbeta-glucopyranoside	Xenobiotics	Food Component/Plant
eugenolsulfate	Xenobiotics	Food Component/Plant
ferulicacid4-sulfate	Xenobiotics	Food Component/Plant
genisteinsulfate*	Xenobiotics	Food Component/Plant
ginkgolicacidC15:1	Xenobiotics	Food Component/Plant
gluconate	Xenobiotics	Food Component/Plant
homostachydrine*	Xenobiotics	Food Component/Plant
indolin-2-one	Xenobiotics	Food Component/Plant
levulinate(4-oxovalerate)	Xenobiotics	Food Component/Plant
maltosulfate	Xenobiotics	Food Component/Plant
mannonate*	Xenobiotics	Food Component/Plant
methylglucopyranoside(alpha+beta)	Xenobiotics	Food Component/Plant
methylindole-3-acetate	Xenobiotics	Food Component/Plant
N-(2-furoyl)glycine	Xenobiotics	Food Component/Plant
N-acetylliin	Xenobiotics	Food Component/Plant
N-acetyltheanine	Xenobiotics	Food Component/Plant
N-oxalyglycine(NOG)	Xenobiotics	Food Component/Plant
piperine	Xenobiotics	Food Component/Plant
pyrraline	Xenobiotics	Food Component/Plant
quinat	Xenobiotics	Food Component/Plant
resveratroidisulfate(2)*	Xenobiotics	Food Component/Plant
saccharin	Xenobiotics	Food Component/Plant
S-allylcysteine	Xenobiotics	Food Component/Plant
stachydrine	Xenobiotics	Food Component/Plant
sulfateofpiperinemetaboliteC16H19NO3(2)*	Xenobiotics	Food Component/Plant
sulfateofpiperinemetaboliteC16H19NO3(3)*	Xenobiotics	Food Component/Plant
tartarate	Xenobiotics	Food Component/Plant
tartronate(hydroxymalonate)	Xenobiotics	Food Component/Plant
thymolsulfate	Xenobiotics	Food Component/Plant
umbelliferonesulfate	Xenobiotics	Food Component/Plant
vanillicacidglycine	Xenobiotics	Food Component/Plant
cotinine	Xenobiotics	Tobacco Metabolite
hydroxycotinine	Xenobiotics	Tobacco Metabolite
1,3,7-trimethylurate	Xenobiotics	Xanthine Metabolism
1,3-dimethylurate	Xenobiotics	Xanthine Metabolism
1,7-dimethylurate	Xenobiotics	Xanthine Metabolism
1-methylurate	Xenobiotics	Xanthine Metabolism
1-methylxanthine	Xenobiotics	Xanthine Metabolism
3,7-dimethylurate	Xenobiotics	Xanthine Metabolism
3-methylxanthine	Xenobiotics	Xanthine Metabolism
5-acetylamino-6-amino-3-methyluracil	Xenobiotics	Xanthine Metabolism
7-methylurate	Xenobiotics	Xanthine Metabolism
7-methylxanthine	Xenobiotics	Xanthine Metabolism
caffeine	Xenobiotics	Xanthine Metabolism
paraxanthine	Xenobiotics	Xanthine Metabolism
theobromine	Xenobiotics	Xanthine Metabolism
theophylline	Xenobiotics	Xanthine Metabolism

Anexos

Metabolitos identificados mediante el experimento de metabolómica y la ruta y sub-ruta metabólica a la que están asociados. Metb#: metabolism; Leu, Ile, and Val Metabolism#: Leucina, Isoleucine and Valine metabolism; Arg and Pro Metabolism#: arginina y proline metabolism; Glycolysis, Gluconeog., & Pyr Metb#: Glycolysis, Gluconeogenesis and pyruvate metabolism; LCPF#: Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid; LCS#: Long Chaing Saturated; FAM* (Acyl Carnitine, Monounsat. #) = Fatty Acid Metabolism (Acyl Carnitine, Monounsaturated); FAM# (Acyl Carnitine, Polyunsat. #): Fatty Acid Metabolism (Acyl Carnitine, Polyunsaturated); Drug - Antiinflam. Immunosupr. #: Drug - Antiinflammatory, Immunosuppressant; Partially Charact. #: Partially Characterized Molecules; contg. #: containing.

Anexo II. Cohorte completa.

Características clínico-patológicas de las pacientes.

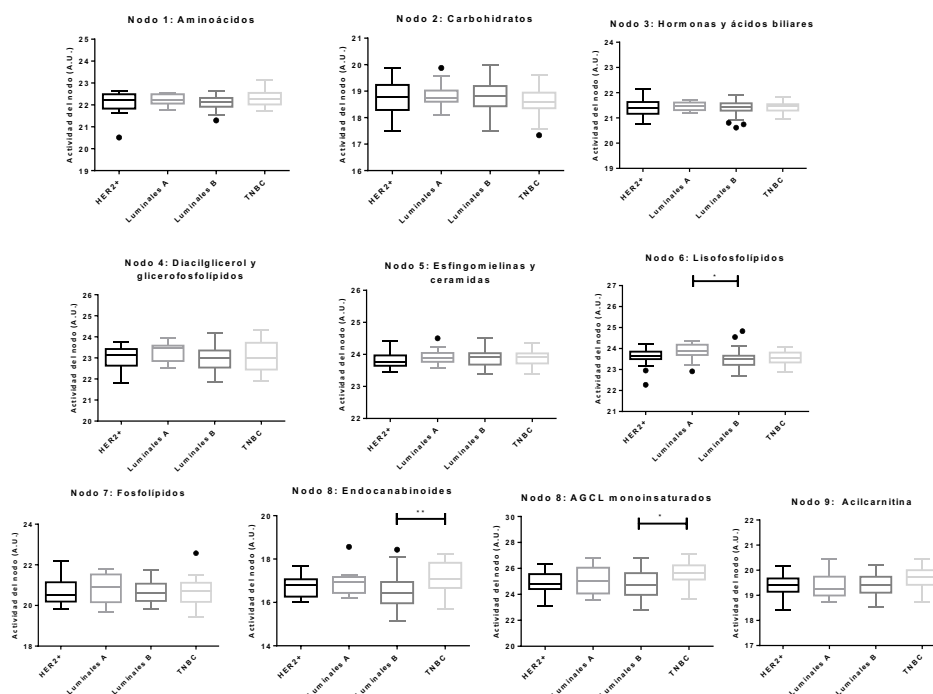
	Resp. patológica			Estadio tumoral										Total
	RC	PR	Total	IA	IC	IDC	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	ILC	IV	
HER2+	15	7	22				9	11	1	1				22
Luminales A	3	8	11	1		1	7	1	1					11
Luminales B	24	22	46				26	9	7	1		1	2	46
TNBC	12	8	20	2	1		12	2		2	1			20
Total	54	45	99	3	1	1	54	23	9	4	1	1	2	99

Distribución de la respuesta patológica y del estadio tumoral a lo largo de la cohorte de pacientes según el subtipo tumoral.

Tratamiento	HER2+	TNBC	Luminales A	Luminales B	Total
Epirubicina + ciclofosfamida (EC) +TAXANOS	4	12	10	39	65
EC + taxanos + trastuzumab + pertuzumab	11	0	1	5	17
Taxol	2	1	0	1	4
EC +nab paclitaxel + carboplatino	0	6	0	1	4
Carboplatino + docetaxel	0	1	0	0	1
EC + docetaxel + trastuzumab	1	0	0	0	1

Esquema de tratamiento de las pacientes distribuidas en función del subtipo tumoral.

Diferencias entre subtipos tumorales en la cohorte completa



Gráficos de las actividades de los nodos del modelo gráfico probabilístico construido con los datos metabólicos de la cohorte completa dividida en base al subtipo tumoral de las pacientes.

Metabolitos diferenciales entre subtipos tumorales identificados mediante SAM

METABOLITE	SUPER-PATHWAY	SUB-PATHWAY	FOLD-CHANGE
N-acetyl-1-methylhistidine*	Amino Acid	Histidine Metabolism	2.25
eicosapentaenoate(EPA;20:5n3)	Lipid	LCFA (n3 and n6)	2.15
1-palmitoyl-2-palmitoleoyl-GPC(16:0/16:1)*	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)	2.06
hydroxy-CMPF*	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate	1.94
stearoyl-arachidonoyl-glycerol(18:0/20:4)[1]*	Lipid	Diacylglycerol	1.85
1-palmitoyl-2-gamma-linolenoyl GPC(16:0/18:3n6)*	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)	1.75
N-acetyltyrosine	Amino Acid	Tyrosine Metabolism	1.74
N-acetylglutamine	Amino Acid	Glutamate Metabolism	1.72
1-myristoyl-2-palmitoyl-GPC(14:0/16:0)	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)	1.71
1-palmitoyl-2-arachidonoyl-GPI(16:0/20:4)*	Lipid	Phosphatidylinositol (PI)	1.70
16-hydroxypalmitate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy	1.63
1-myristoyl-2-arachidonoyl-GPC(14:0/20:4)*	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)	1.63
pyridoxate	Cofactors and Vitamins	Vitamin B6 Metabolism	1.59
2-O-methylascorbicacid	Cofactors and Vitamins	Ascorbate and Aldarate Metabolism	1.48
gulonate*	Cofactors and Vitamins	Ascorbate and Aldarate Metabolism	1.46
N-formylphenylalanine	Amino Acid	Tyrosine Metabolism	1.44
1-lignoceroyl-GPC(24:0)	Lipid	Lysophospholipid	1.42
N-stearoyl-sphingosine(d18:1/18:0)*	Lipid	Ceramides	1.39
"2R,3R-dihydroxybutyrate"	Lipid	Fatty Acid, Dihydroxy	1.39
1-stearoyl-2-arachidonoyl-GPI(18:0/20:4)	Lipid	Phosphatidylinositol (PI)	1.37
1-linoleoyl-2-arachidonoyl-GPC(18:2/20:4n6)*	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)	1.31

Metabolitos diferenciales entre pacientes con tumores HER2+ vs pacientes con tumores luminales A.

METABOLITE	SUPER-PATHWAY	SUB-PATHWAY	FOLD-CHANGE
Gulonate	Cofactors and Vitamins	Ascorbate and Aldarate Metabolism	1.64

Metabolitos diferenciales entre pacientes con tumores HER2+ vs pacientes con tumores luminales B.

METABOLITE	SUPER-PATHWAY	SUB-PATHWAY	FOLD-CHANGE
stearidonate(18:4n3)	Lipid	Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid (n3 and n6)	2.33
docosapentaenoate(n3DPA;22:5n3)	Lipid	Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid (n3 and n6)	2.20
N4-acetylcytidine	Nucleotide	Pyrimidine Metabolism, Cytidine containing	2.16
eicosapentaenoate(EPA;20:5n3)	Lipid	Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid (n3 and n6)	2.16

Metabolitos diferenciales entre pacientes con tumores HER2+ vs pacientes con tumores TNBC.

METABOLITE	SUPER-PATHWAY	SUB-PATHWAY	FOLD-CHANGE
7-alpha-hydroxy-3-oxo-4-cholestenoate(7-Hoca)	Lipid	Sterol	0.69
N-formylphenylalanine	Amino Acid	Tyrosine Metabolism	0.68
1-lignoceroyl-GPC(24:0)	Lipid	Lysophospholipid	0.67
pyridoxate	Cofactors and Vitamins	Vitamin B6 Metabolism	0.66
1-palmitoyl-2-arachidonoyl-GPI(16:0/20:4)*	Lipid	Phosphatidylinositol (PI)	0.61
alpha-hydroxyisovalerate	Amino Acid	Leu, Ile and Val Metabolism	0.51
stearoyl-arachidonoyl-glycerol(18:0/20:4)[1]*	Lipid	Diacylglycerol	0.50
2-stearoyl-GPE(18:0)*	Lipid	Lysophospholipid	0.49

Metabolitos diferenciales entre pacientes con tumores luminales A vs paciente con tumores luminales B.

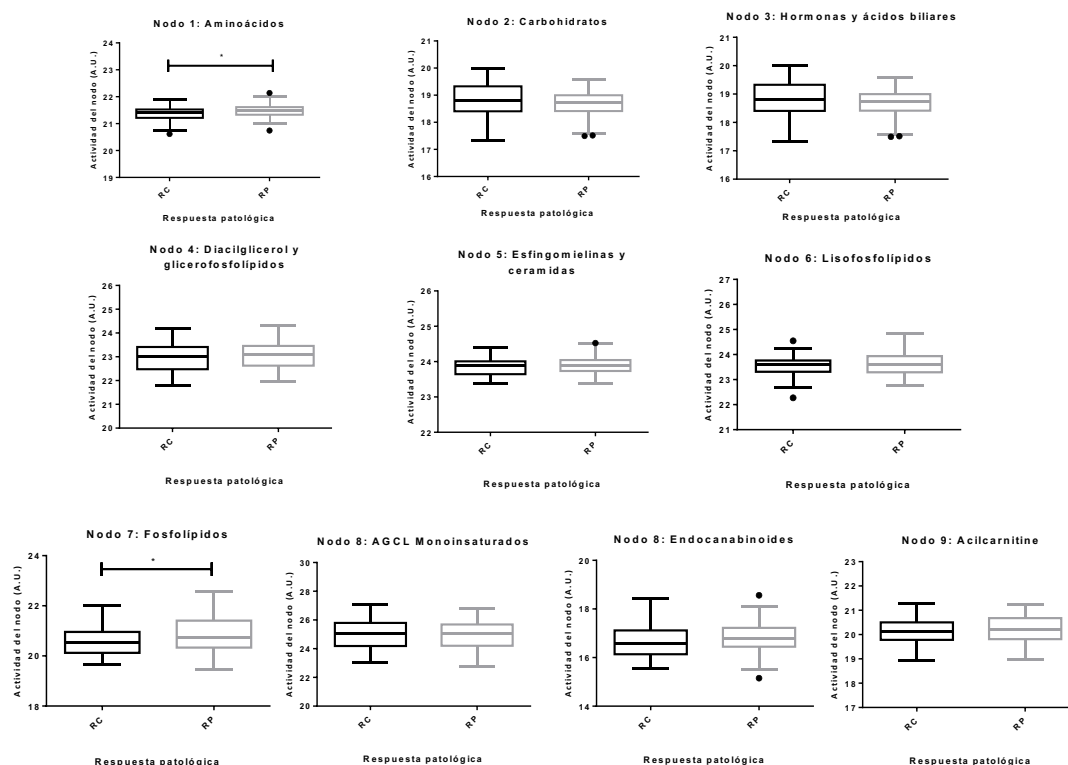
METABOLITE	SUPER-PATHWAY	SUB-PATHWAY	FOLD-CHANGE
succinoyltaurine	Amino Acid	Methionine, Cysteine, SAM and Taurine Metabolism	2.07
adipoylcarnitine(C6-DC)	Lipid	Fatty Acid Metabolism (Acyl Carnitine, Dicarboxylate)	1.92
N-acetylproline	Amino Acid	Urea cycle; Arginine and Proline Metabolism	1.67
3-hydroxyhexanoate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy	1.60

Metabolitos diferenciales entre pacientes con tumores luminales A vs pacientes con tumores TNBC.

METABOLITE	SUPER-PATHWAY	SUB-PATHWAY	FOLD-CHANGE
N-oleoyltaurine	Lipid	Endocannabinoid	2.18
hexanoylglutamine	Lipid	Fatty Acid Metabolism (Acyl Glutamine)	1.71
docosadienoate(22:2n6)	Lipid	Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid (n3 and n6)	1.67
(S)-3-hydroxybutyrylcarnitine	Lipid	Fatty Acid Metabolism (Acyl Carnitine, Hydroxy)	1.62
dodecenedioate(C12:1-DC)*	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate	1.61
(2or3)-decanoate(10:1n7orn8)	Lipid	Medium Chain Fatty Acid	1.59
3-hydroxydecanoate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy	1.59
3-hydroxylaurate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy	1.53
oleoylethanolamide	Lipid	Endocannabinoid	1.51
arabitol/xylitol	Carbohydrate	Pentose Metabolism	1.42

Metabolitos diferenciales entre pacientes con tumores luminales B vs pacientes con tumores TNBC.

Diferencias entre grupos de respuesta de la cohorte completa



Gráficos de las actividades de los nodos del modelo gráfico probabilístico construido con los datos metabolómicos de la cohorte completa dividida en base al grupo de respuesta.

Metabolitos diferenciales entre grupos de respuesta

METABOLITE	SUPER-PATHWAY	SUB-PATHWAY	FOLD-CHANGE
N-acetylglutamine	Amino Acid	Glutamate Metabolism	1.35
N-acetyl-1-methylhistidine	Amino Acid	Histidine Metabolism	1.46
N-acetylhistidine	Amino Acid	Histidine Metabolism	2.29
2-hydroxy-3-methylvalerate	Amino Acid	Leucine, Isoleucine and Valine Metabolism	1.56
N-acetyltaurine	Amino Acid	Methionine, Cysteine, SAM and Taurine Metb.	1.34
mannitol/sorbitol	Carbohydrate	Fructose, Mannose and Galactose Metabolism	1.26
arabitol/xylitol	Carbohydrate	Pentose Metabolism	1.37
methylmalonate(MMA)	Lipid	Fatty Acid Metabolism (also BCAA)	1.61
malonate	Lipid	Fatty Acid Synthesis	1.66

Metabolitos diferenciales entre los grupos de respuesta en la cohorte completa identificados mediante el análisis SAM.

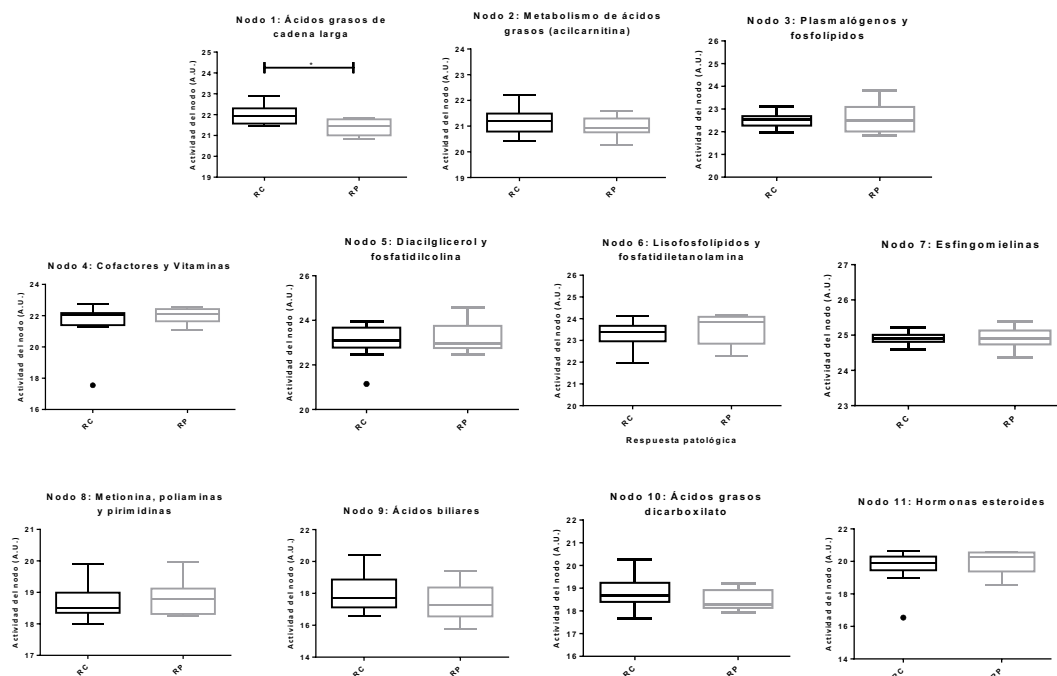
Anexos

METABOLITE	SUPE-PATHWAY	SUB-PATHWAY	FOLD-CHANGE
N-acetylaniline	Amino Acid	Alanine and Aspartate Metabolism	0.90
N-acetylasparagine	Amino Acid	Alanine and Aspartate Metabolism	0.70
N-acetylglutamine	Amino Acid	Glutamate Metabolism	0.66
N-acetylserine	Amino Acid	Glycine, Serine and Threonine Metabolism	0.87
N-acetyl-1-methylhistidine*	Amino Acid	Histidine Metabolism	0.44
N-acetylhistidine	Amino Acid	Histidine Metabolism	0.66
2-hydroxy-3-methylvalerate	Amino Acid	Leucine, Isoleucine and Valine Metabolism	0.69
alpha-hydroxyisovalerate	Amino Acid	Leucine, Isoleucine and Valine Metabolism	0.74
N-acetyltaurine	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Taurine Metabolism	0.74
cystine	Amino Acid	Met, Cys, SAM and Taurine Metabolism	0.86
dimethylarginine(SDMA+ADMA)	Amino Acid	Urea cycle; Arginine and Proline Metabolism	0.92
trans-4-hydroxyproline	Amino Acid	Urea cycle; Arginine and Proline Metabolism	0.8
erythronate*	Carbohydrate	Aminosugar Metabolism	0.86
glucuronate	Carbohydrate	Aminosugar Metabolism	0.67
mannitol/sorbitol	Carbohydrate	Fructose, Mannose and Galactose Metabolism	0.53
glucose	Carbohydrate	Glycolysis, Gluconeog. & Pyruvate Metabolism	0.87
arabitol/xylitol	Carbohydrate	Pentose Metabolism	0.78
ribonate	Carbohydrate	Pentose Metabolism	0.78
ribitol	Carbohydrate	Pentose Metabolism	0.85
14-HDoHE/17-HDoHE	Lipid	Docosanoid	0.48
3-decenoylcarnitine	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Monounsaturated)	0.61
methylmalonate(MMA)	Lipid	Fatty Acid Metabolism (also BCAA)	0.54
propionylglycine	Lipid	Fatty Acid Metabolism (also BCAA)	0.76
malonate	Lipid	Fatty Acid Synthesis	0.27
3-hydroxyadipate*	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate	0.47
trans-4-hydroxycrotonicacid	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy	0.85
glycosyl-N-behenoyl-sphingadienine(d18:2/22:0)*	Lipid	Hexosylceramides (HCER)	0.86
glycosylceramide(d18:2/24:1,d18:1/24:2)*	Lipid	Hexosylceramides (HCER)	0.84
glycosyl-N-stearoyl-sphingosine(d18:1/18:0)	Lipid	Hexosylceramides (HCER)	0.89
glycosylceramide(d18:1/20:0,d16:1/22:0)*	Lipid	Hexosylceramides (HCER)	0.88
1-lignoceroyl-GPC(24:0)	Lipid	Lysophospholipid	0.81
1-cerotoyl-GPC(26:0)*	Lipid	Lysophospholipid	0.54
caprate(10:0)	Lipid	Medium Chain Fatty Acid	1.36
1-palmitoyl-2-stearoyl-GPC(16:0/18:0)	Lipid	Phosphatidylcholine (PC)	0.89
sphingadienine	Lipid	Sphingolipid Synthesis	0.55
sphingomyelin(d18:1/24:1,d18:2/24:0)*	Lipid	Sphingomyelins	0.91
N-acetyl-beta-alanine	Nucleotide	Pyrimidine Metabolism, Uracil containing	0.81
3-ureidopropionate	Nucleotide	Pyrimidine Metabolism, Uracil containing	0.64
GlcNAcsulfateconjugateofC21H34O2steroid**	Partially Charact.	Partially Characterized Molecules	1.61

Metabolitos diferenciales entre los grupos de respuesta, identificados mediante el predictor de clase.

Anexo III. Pacientes con tumores TNBC

Actividades de los nodos de modelo gráfico



Gráficos de la actividad de los nodos funcionales del modelo gráfico probabilístico.

Metabolitos diferenciales entre grupos de respuesta

METABOLITE	SUPER-PATHWAY	SUB-PATHWAY	FOLD-CHANGE
16-hydroxypalmitate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy	0.56
3beta-hydroxy-5-cholestenoate	Lipid	Sterol	0.53
(14or15)-methylpalmitate(a17:0ori17:0)	Lipid	Fatty Acid, Branched	0.51
myristate(14:0)	Lipid	Long Chain Saturated Fatty Acid	0.46
tetradecadienedioate(C14:2-DC)*	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate	0.43
docosahexaenoate(DHA;22:6n3)	Lipid	Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid (n3 and n6)	0.39
10-heptadecenoate(17:1n7)	Lipid	Long Chain Monounsaturated Fatty Acid	0.36
hexadecadienoate(16:2n6)	Lipid	Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid (n3 and n6)	0.36
myristoleate(14:1n5)	Lipid	Long Chain Monounsaturated Fatty Acid	0.34
stearidonate(18:4n3)	Lipid	Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid (n3 and n6)	0.3
palmitoleate(16:1n7)	Lipid	Long Chain Monounsaturated Fatty Acid	0.27

Metabolitos diferenciales identificados mediante el análisis SAM entre los dos grupos de respuesta en las pacientes con tumores triple negativo.

METABOLITE	SUPER_PATHWAY	SUB_PATHWAY
16a-hydroxyDHEA3-sulfate	Lipid	Androgenic Steroids
androsteroidmonosulfateC19H28O6S(1)*	Lipid	Androgenic Steroids
methylmalonate(MMA)	Lipid	Fatty Acid Metabolism (also BCAA Metabolism)
propionylcarnitine(C3)	Lipid	Fatty Acid Metabolism (also BCAA Metabolism)
stearate(18:0)	Lipid	Long Chain Saturated Fatty Acid
tetradecanedioate(C14-DC)	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
pentadecanoate(15:0)	Lipid	Long Chain Saturated Fatty Acid
oleoylethanolamide	Lipid	Endocannabinoid
eicosenoate(20:1)	Lipid	Long Chain Monounsaturated Fatty Acid
N-oleoyltaurine	Lipid	Endocannabinoid
(16or17)-methylstearate(a19:0ori19:0)	Lipid	Fatty Acid, Branched
palmitate(16:0)	Lipid	Long Chain Saturated Fatty Acid

Anexos

docosapentaenoate(n3DPA;22:5n3)	Lipid	Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid (n3 and n6)
eicosapentaenoate(EPA;20:5n3)	Lipid	Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid (n3 and n6)
margarate(17:0)	Lipid	Long Chain Saturated Fatty Acid
linolenate[alphaomega;(18:3n3or6)]	Lipid	Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid (n3 and n6)
10-nonadecenoate(19:1n9)	Lipid	Long Chain Monounsaturated Fatty Acid
oleate/vaccenate(18:1)	Lipid	Long Chain Monounsaturated Fatty Acid
nonadecanoate(19:0)	Lipid	Long Chain Saturated Fatty Acid
hexadecadienoate(16:2n6)	Lipid	Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid (n3 and n6)
10-heptadecenoate(17:1n7)	Lipid	Long Chain Monounsaturated Fatty Acid
myristate(14:0)	Lipid	Long Chain Saturated Fatty Acid
palmitoleate(16:1n7)	Lipid	Long Chain Monounsaturated Fatty Acid
tetradecadienedioate(C14:2-DC)*	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate
3beta-hydroxy-5-cholestenoate	Lipid	Sterol
16-hydroxypalmitate	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
(14or15)-methylpalmitate(a17:0ori17:0)	Lipid	Fatty Acid, Branched
stearidonate(18:4n3)	Lipid	Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid (n3 and n6)
myristoleate(14:1n5)	Lipid	Long Chain Monounsaturated Fatty Acid
docosahexaenoate(DHA;22:6n3)	Lipid	Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid (n3 and n6)

Metabolitos diferenciales identificados mediante el predictor de clase en las pacientes con tumores triple negativo.

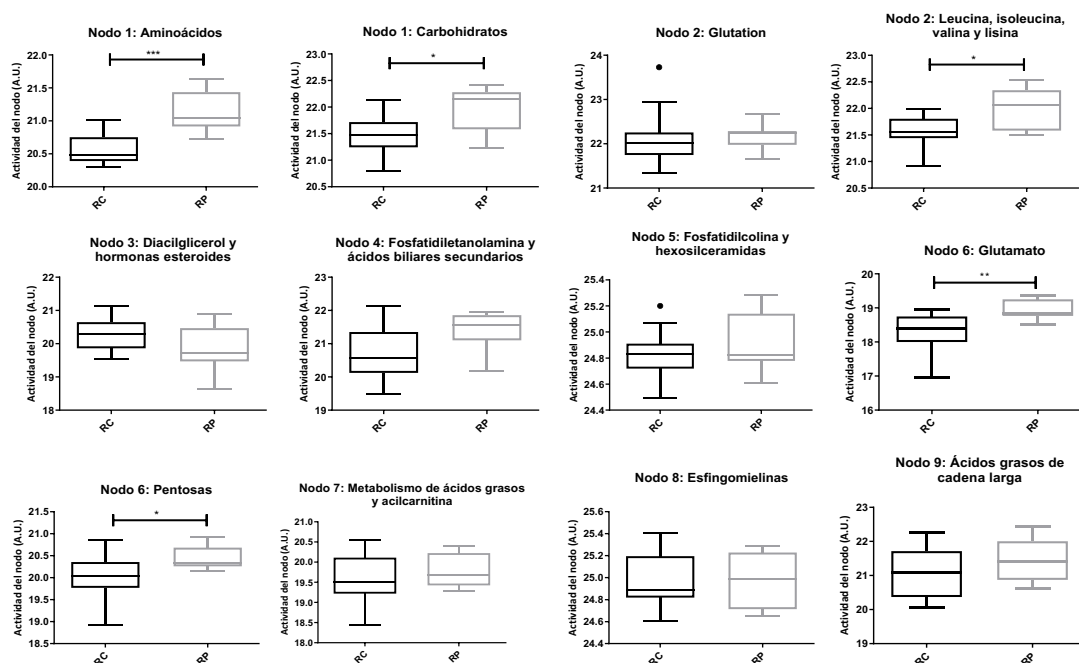
Predicción de recaída tras la cirugía

Patient	Pathological Resp	Estatus	Risk Predicted	Patient	Pathological Resp	Estatus	Risk Predicted
M0232	MP2	EXITUS	low	M0357	MP5	VSE	low
M0371	MP2	EXITUS	low	M0363	MP5	VSE	low
M0010	MP3	VSE	low	M0370	MP3	VSE	low
M0278	MP5	VSE	low	M0016	MP1	EXITUS	high
M0291	MP4	VSE	low	M0264	MP3	EXITUS	high
M0304	MP5	VSE	low	M0268	MP4	EXITUS	high
M0308	MP4	VSE	low	M0271	MP3	EXITUS	high
M0314	MP5	VSE	low	M0285	MP5	EXITUS	high
M0320	MP1	VSE	low	M0233	MP5	VSE	high
M0336	MP4	VSE	low	M0335	MP5	VSE	High

Respuesta patológica, estatus y grupo de riesgo asignado a las pacientes con tumores TNBC.

Anexo IV. Pacientes con tumores HER2+

Actividad de los nodos del modelo gráfico



Gráficos de la actividad de los nodos funcionales del modelo gráfico probabilístico.

Metabolitos diferenciales entre grupos de respuesta

METABOLITE	SUPER-PATHWAY	SUB-PATHWAY	FOLD-CHANGE
picolinoylglycine	Lipid	Fatty Acid Metabolism (Acyl Glycine)	4.30
p-cresolglucuronide*	Amino Acid	Tyrosine Metabolism	3.41
N-acetyl-1-methylhistidine*	Amino Acid	Histidine Metabolism	2.99
2-hydroxy-3-methylvalerate	Amino Acid	Leucine, Isoleucine and Valine Metabolism	2.84
glucuronate	Carbohydrate	Aminosugar Metabolism	2.82
N-acetyltaurine	Amino Acid	Methionine, Cysteine, SAM and Taurine Metabolism	2.37
pro-hydroxy-pro	Amino Acid	Urea cycle; Arginine and Proline Metabolism	2.13
hypotaurine	Amino Acid	Methionine, Cysteine, SAM and Taurine Metabolism	2.11
N-acetylglutamine	Amino Acid	Glutamate Metabolism	1.91
cystathionine	Amino Acid	Methionine, Cysteine, SAM and Taurine Metabolism	1.89
arabitol/xylitol	Carbohydrate	Pentose Metabolism	1.56
3-hydroxy-2-ethylpropionate	Amino Acid	Leucine, Isoleucine and Valine Metabolism	1.54
N-formylmethionine	Amino Acid	Methionine, Cysteine, SAM and Taurine Metabolism	1.33

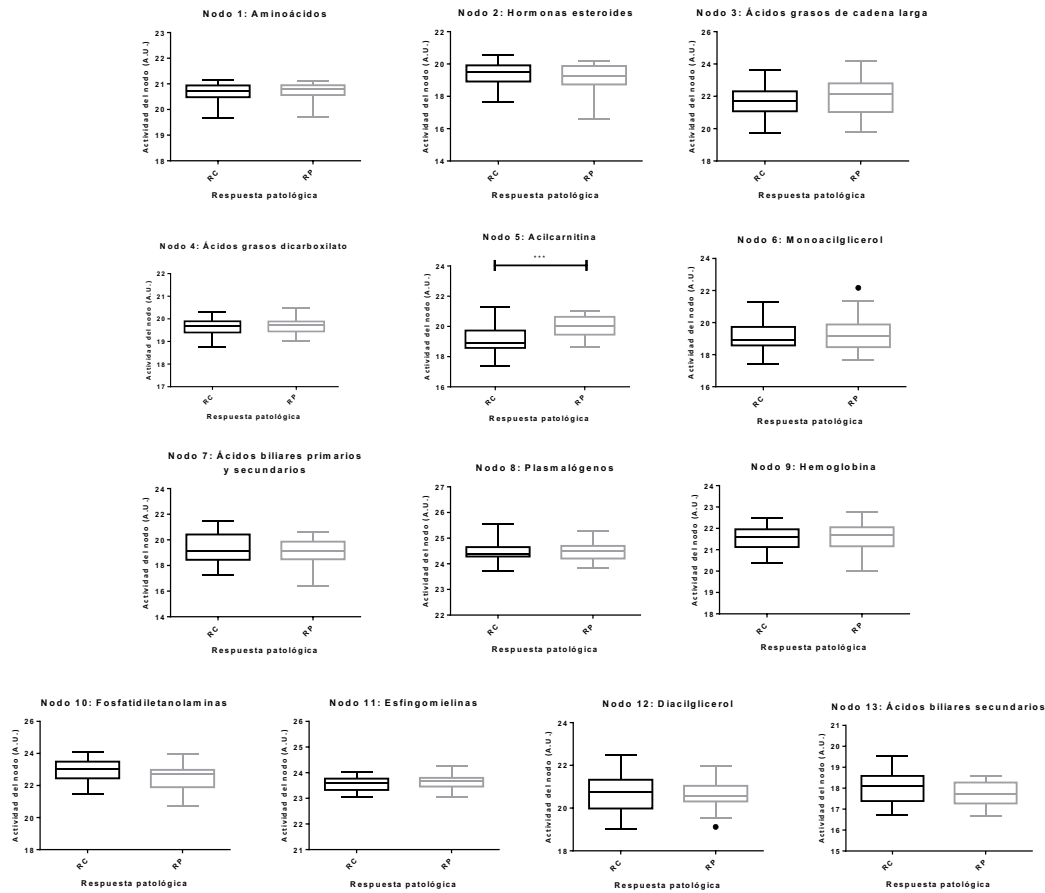
Metabolitos diferenciales entre los dos grupos de respuesta de las pacientes con tumores HER2+, identificados mediante el análisis SAM.

METABOLITE	SUPER-PATHWAY	SUB-PATHWAY	FOLD-CHANGE
3-hydroxy-2-ethylpropionate	Amino Acid	Leucine, Isoleucine and Valine Metabolism	0.65
N-acetylvaline	Amino Acid	Leucine, Isoleucine and Valine Metabolism	0.73
N-acetyltaurine	Amino Acid	Methionine, Cysteine, SAM and Taurine Metabolism	0.45
N-formylmethionine	Amino Acid	Methionine, Cysteine, SAM and Taurine Metabolism	0.75
pro-hydroxy-pro	Amino Acid	Urea cycle; Arginine and Proline Metabolism	0.47
arabitol/xylitol	Carbohydrate	Pentose Metabolism	0.64

Metabolitos diferenciales entre los dos grupos de respuesta, identificados mediante el predictor de clase.

Anexo V. Pacientes con tumores luminales B

Actividades de los nodos del modelo gráfico



Gráficos de la actividad de los nodos funcionales del modelo gráfico probabilístico.

Metabolitos diferenciales entre grupos de respuesta

METABOLITE	SUPER-PATHWAY	SUB-PATHWAY	FOLD-CHANGE
decadienedioicacid(C10:2-DC)**	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate	3.03
5-dodecenoylcarnitine(C12:1)	Lipid	FAM (Acyl Carnitine, Monounsaturated)	2.30
glycosylceramide(d18:2/24:1,d18:1/24:2)*	Lipid	Hexosylceramides (HCER)	1.38
1,2-dilinoleoyl-GPE(18:2/18:2)*	Lipid	Phosphatidylethanolamine (PE)	0.39

Metabolitos diferenciales entre los dos grupos de respuesta de las pacientes con tumores luminales B, identificados mediante el análisis SAM.

METABOLITE	SUPERPATHWAY	SUB-PATHWAY	FOLD-CHANGE
dimethylarginine(SDMA+ADMA)	Amino Acid	Urea cycle; Arginine and Proline Metabolism	0.85
decadienedioicacid(C10:2-DC)**	Lipid	Fatty Acid, Dicarboxylate	0.3
glycosylceramide(d18:2/24:1,d18:1/24:2)*	Lipid	Hexosylceramides (HCER)	0.72
1,2-dilinoleoyl-GPE(18:2/18:2)*	Lipid	Phosphatidylethanolamine (PE)	4.36
sphingomyelin(d18:1/24:1,d18:2/24:0)*	Lipid	Sphingomyelins	0.84
sphingomyelin(d18:2/24:1,d18:1/24:2)*	Lipid	Sphingomyelins	0.82

Metabolitos diferenciales entre los dos grupos, identificados mediante el predictor de clase.

Anexo VI. Artículos relacionados

Garcia-Adrian S, Trilla-Fuertes L, Gámez-Pozo A, Chiva C, Lopez-Vacas R, Lopez-Camacho E, Prado-Vazquez G, Zapater-Moros A, Lumbreras-Herrera MI, Hardisson D, Yebenes L. Molecular characterization of triple negative breast cancer formaldehyde-fixed paraffin-embedded samples by data independent acquisition proteomics. *Proteomics*. 2021 Oct 8:e2100110.1.

Trilla-Fuertes L, Gámez-Pozo A, Arevalillo JM, López-Vacas R, López-Camacho E, Prado-Vázquez G, Zapater-Moros A, Díaz-Almirón M, Ferrer-Gómez M, Navarro H, Nanni P. Bayesian networks established functional differences between breast cancer subtypes. *PLoS one*. 2020 Jun 11;15(6):e0234752.

Trilla-Fuertes L, Gámez-Pozo A, López-Camacho E, Prado-Vázquez G, Zapater-Moros A, López-Vacas R, Arevalillo JM, Díaz-Almirón M, Navarro H, Maín P, Espinosa E. Computational models applied to metabolomics data hints at the relevance of glutamine metabolism in breast cancer. *BMC cancer*. 2020 Dec;20(1):1-1.

Prado-Vázquez G, Gámez-Pozo A, Trilla-Fuertes L, Arevalillo JM, Zapater-Moros A, Ferrer-Gómez M, Díaz-Almirón M, López-Vacas R, Navarro H, Maín P, Feliú J. A novel approach to triple-negative breast cancer molecular classification reveals a luminal immune-positive subgroup with good prognoses. *Scientific reports*. 2019 Feb 7;9(1):1-2

Trilla-Fuertes L, Gámez-Pozo A, Díaz-Almirón M, Prado-Vázquez G, Zapater-Moros A, López-Vacas R, Nanni P, Zamora P, Espinosa E, Fresno Vara JÁ. Computational metabolism modeling predicts risk of distant relapse-free survival in breast cancer patients. *Future Oncology*. 2019 Oct;15(30):3483-90.

Trilla-Fuertes L, Gámez-Pozo A, Arevalillo JM, Díaz-Almirón M, Prado-Vázquez G, Zapater-Moros A, Navarro H, Aras-López R, Dapía I, López-Vacas R, Nanni P. Molecular characterization of breast cancer cell response to metabolic drugs. *Oncotarget*. 2018 Feb 9;9(11):9645.

Zapater-Moros A, Gámez-Pozo A, Prado-Vázquez G, Trilla-Fuertes L, Arevalillo JM, Díaz-Almirón M, Navarro H, Maín P, Feliú J, Zamora P, Espinosa E. Probabilistic graphical models relate immune status with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Oncotarget*. 2018 Jun 12;9(45):27586.

Gámez-Pozo A, Trilla-Fuertes L, Berges-Soria J, Selevsek N, López-Vacas R, Díaz-Almirón M, Nanni P, Arevalillo JM, Navarro H, Grossmann J, Moreno FG. Functional proteomics outlines the complexity of breast cancer molecular subtypes. *Scientific Reports*. 2017 Aug 30;7(1):1-3.

Anexo VI. Otros artículos

Trilla-Fuertes L, Ghanem I, Maurel J, Laura G, Mendiola M, Peña C, López-Vacas R, Prado-Vázquez G, López-Camacho E, Zapater-Moros A, Heredia V. Comprehensive characterization of the mutational landscape in localized anal squamous cell carcinoma. *Translational oncology*. 2020 Jul 1;13(7):100778.

Trilla-Fuertes L, Ghanem I, Gámez-Pozo A, Maurel J, Laura G, Mendiola M, Peña C, López-Vacas R, Prado-Vázquez G, López-Camacho E, Zapater-Moros A. Genetic profile and functional proteomics of anal squamous cell carcinoma: proposal for a molecular classification. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2020 Apr 1;19(4):690-700.

Trilla-Fuertes L, Gámez-Pozo A, Prado-Vázquez G, Zapater-Moros A, Díaz-Almirón M, Fortes C, Ferrer-Gómez M, López-Vacas R, Blanco VP, Márquez-Rodas I, Soria A. Melanoma proteomics suggests functional differences related to mutational status. *Scientific reports*. 2019 May 10;9(1):1-7.

Trilla-Fuertes L, Ghanem I, Gámez-Pozo A, Maurel J, Laura G, Mendiola M, Peña C, López-Vacas R, Prado-Vázquez G, López-Camacho E, Zapater-Moros A. Genetic profile and functional proteomics of anal squamous cell carcinoma: proposal for a molecular classification. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2020 Apr 1;19(4):690-700.

Trilla-Fuertes L, Miranda N, Castellano D, López-Vacas R, Farfán Tello CA, de Velasco G, Villacampa F, López-Camacho E, Prado-Vázquez G, Zapater-Moros A, Espinosa E. miRNA profiling in renal carcinoma suggest the existence of a group of pro-angiogenic tumors in localized clear cell renal carcinoma. *PloS one*. 2020 Feb 28;15(2):e0229075.

Trilla-Fuertes L, Gámez-Pozo A, Prado-Vázquez G, Zapater-Moros A, Díaz-Almirón M, Arevalillo JM, Ferrer-Gómez M, Navarro H, Maín P, Espinosa E, Pinto Á. Biological molecular layer classification of muscle-invasive bladder cancer opens new treatment opportunities. *BMC cancer*. 2019 Dec;19(1):1-9.

Anexos

Rojas K, Trilla-Fuertes L, Gámez-Pozo A, Chiva C, Sepúlveda J, Manso L, Prado-Vázquez G, Zapater-Moros A, López-Vacas R, Ferrer-Gómez M, Mendiola C. Proteomics characterisation of central nervous system metastasis biomarkers in triple negative breast cancer. *ecancermedicalscience*. 2019;13.

de Velasco G, Trilla-Fuertes L, Gamez-Pozo A, Urbanowicz M, Ruiz-Ares G, Sepúlveda JM, Prado-Vazquez G, Arevalillo JM, Zapater-Moros A, Navarro H, Lopez-Vacas R. Urothelial cancer proteomics provides both prognostic and functional information. *Scientific reports*. 2017 Nov 17;7(1):1-8.

Probabilistic graphical models relate immune status with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer

Andrea Zapater-Moros¹, Angelo Gámez-Pozo^{1,2}, Guillermo Prado-Vázquez¹, Lucía Trilla-Fuertes², Jorge M. Arevalillo³, Mariana Díaz-Almirón⁴, Hilario Navarro³, Paloma Maín⁵, Jaime Feliú^{6,7}, Pilar Zamora⁶, Enrique Espinosa^{6,7} and Juan Ángel Fresno Vara^{1,2,7}

¹ Molecular Oncology & Pathology Laboratory, Institute of Medical and Molecular Genetics-INGEMM, La Paz University Hospital-IdiPAZ, Madrid, Spain

² Biomedica Molecular Medicine SL, Madrid, Spain

³ Operational Research and Numerical Analysis, National Distance Education University, Madrid, Spain

⁴ Biostatistics Unit, La Paz University Hospital-IdiPAZ, Madrid, Spain

⁵ Department of Statistics and Operations Research, Faculty of Mathematics, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

⁶ Medical Oncology Service, La Paz University Hospital-IdiPAZ, Madrid, Spain

⁷ CIBERONC, Madrid, Spain

Correspondence to: Juan Ángel Fresno Vara, *email:* juanangel.fresno@salud.madrid.org

Keywords: breast cancer; neoadjuvant chemotherapy; molecular subtypes; probabilistic graphical models; immune status; Immunology

Received: December 21, 2017

Accepted: May 08, 2018

Published: June 12, 2018

Copyright: Zapater-Moros et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent tumor in women and its incidence is increasing. Neoadjuvant chemotherapy has become standard of care as a complement to surgery in locally advanced or poor-prognosis early stage disease. The achievement of a complete response to neoadjuvant chemotherapy correlates with prognosis but it is not possible to predict who will obtain an excellent response. The molecular analysis of the tumor offers a unique opportunity to unveil predictive factors. In this work, gene expression profiling in 279 tumor samples from patients receiving neoadjuvant chemotherapy was performed and probabilistic graphical models were used. This approach enables addressing biological and clinical questions from a Systems Biology perspective, allowing to deal with large gene expression data and their interactions. Tumors presenting complete response to neoadjuvant chemotherapy had a higher activity of immune related functions compared to resistant tumors. Similarly, samples from complete responders presented higher expression of lymphocyte cell lineage markers, immune-activating and immune-suppressive markers, which may correlate with tumor infiltration by lymphocytes (TILs). These results suggest that the patient's immune system plays a key role in tumor response to neoadjuvant treatment. However, future studies with larger cohorts are necessary to validate these hypotheses.

INTRODUCTION

Breast cancer is the most common neoplasm and the fifth cause of cancer-associated death among women [1]. Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)

provide a system of classification and clinical diagnosis. Seventy percent of the tumors are hormonal receptor positive, and HER2 overexpression is observed in 15% of cases. ER+ and PR+ tumors respond to endocrine therapy, whereas tumors overexpressing HER2 respond to targeted therapies such as trastuzumab [2, 3]. Tumors negative for

ER, PR and HER2 are known as Triple Negative Breast Cancer (TNBC) and do not respond to the aforementioned therapies.

A molecular classification of breast cancer defined four intrinsic subtypes [4]. Luminal A disease, which accounts for 67% of all tumors, shows high expression of genes related to hormone receptors and low expression of genes related to cell proliferation. Luminal B, HER2-enriched and Basal-like subtypes have a more aggressive phenotype [5] [6, 7].

Neoadjuvant chemotherapy has been increasingly administered to reduce the size of primary tumor, thus increasing the likelihood of breast conservation and enhancing survival [8]. Currently, there is no clinically useful molecular predictor of response to cytotoxic drugs in the neoadjuvant setting. Clinical parameters or the expression of single molecular markers (ie, Bcl-2, p53, MDR-1, and so on) show weak association with response and are not regimen-specific. Molecular subtyping may offer some help, as Luminal B and Basal-like tumors respond better than Luminal A tumors [9], but this is not accurate enough to make clinical decisions. As a consequence, many patients suffer the toxicity of useless neoadjuvant chemotherapy.

This study has been carried out using probabilistic graphical models, providing insights into the molecular biology of tumor response, allowing its use as a predictive model for response. These statistically inferred networks provide a deeper level of biological understanding in two main directions: giving support to previously identified

biological observations, and giving new insights regarding novel biological interactions. Moreover, the transcriptional network approach has proven to be useful to unveil transcriptional regulation in breast cancer [10, 11]. The objective of this study was to evaluate differences in gene expression patterns of breast cancer tumors from patients who had undergone neoadjuvant chemotherapy through a Systems Biology perspective.

RESULTS

Patient's characteristics

279 patients with histologically-confirmed primary non-metastatic breast adenocarcinoma from phase II trial (NCT00455533) [12] were included. They all had untreated tumors of at least 2 cm in size (T2-3, N0-3) regardless of hormone receptor or HER2 expression status. Clinical data were obtained from phase II trial (NCT00455533). Patient's clinical characteristics are provided in Table 1. On the basis of ER, PR and HER2 status, 111 tumors patients (39.78%) were ER+ or PR+ and Her2- (ER+ for now on), 28 (10.04%) were HER2+ and 140 (50.18%) were classified as TNBC. Patients received sequential neoadjuvant therapy starting with 4 cycles of doxorubicin/cyclophosphamide (AC), followed by 1:1 randomization to either ixabepilone or paclitaxel. All patients underwent definitive breast surgery 4 to 6

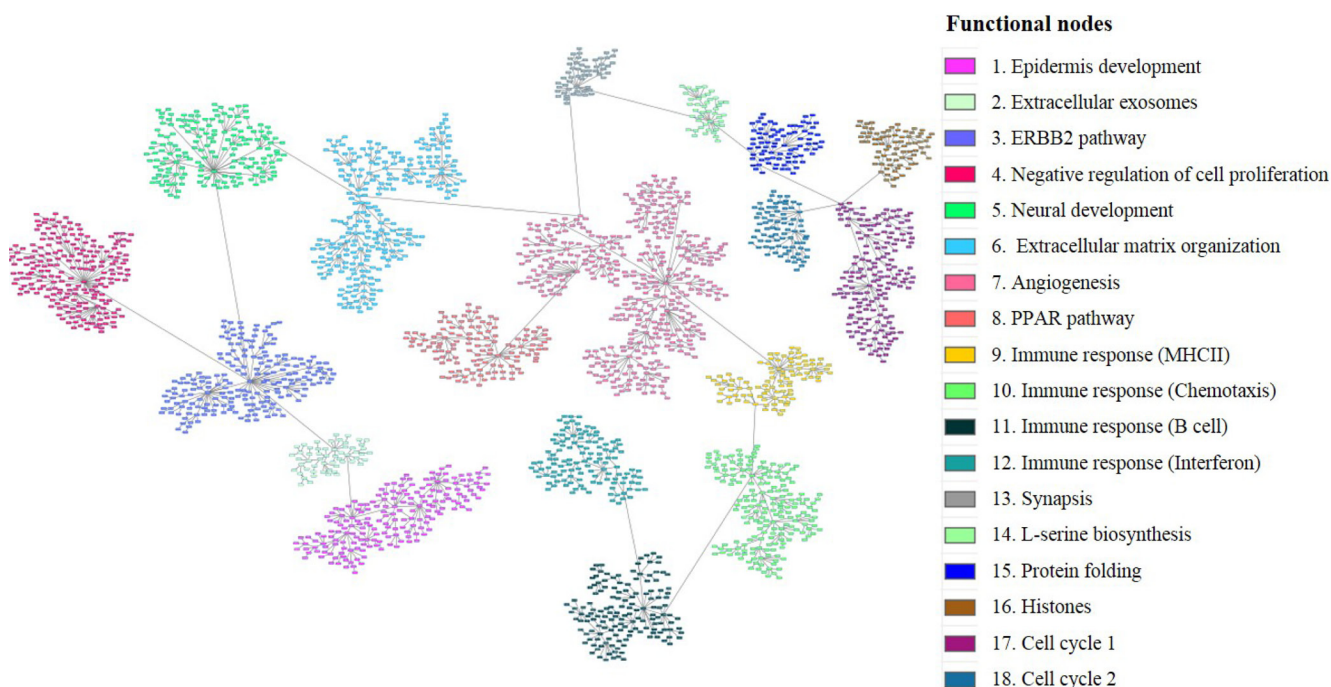


Figure 1: Breast cancer network. Probabilistic graphical model from 279 tumors gene expression data divided in eighteen functional nodes harboring one or two predominant biological functions. Each node (box) represents one gene and each grey line (edges) connects genes with correlated expression.

Table 1: Patient’s clinical characteristics

Characteristic	Patients (n)	Patients (%)	Characteristics	Patients (n)	Patients (%)
Age			Pathological response		
Mean age	48.63		CR	40	14.34%
≤50	166	59.50%	PR	161	57.71%
>50	113	40.50%	PD	5	1.79%
Tumor size (T)			SD	64	22.94%
< 2 cm	3	1.08%	Unassigned	9	3.23%
2 - 5 cm	174	62.37%	ER status		
> 5 cm	99	35.48%	ER+	108	38.71%
Unassigned	3	1.08%	ER-	171	61.29%
Nodal classification (N)			PR status		
N0	122	41.40%	PR+	99	35.48%
N1	136	46.10%	PR-	179	64.16%
N2	30	10.20%	Unknown	1	0.36%
N3	7	2.40%	HER2 status		
Neoadjuvant treatment			HER2+	28	10.04%
Ixabepilone	138	49.46%	HER2-	251	89.96%

weeks after the last dose of ixabepilone or paclitaxel, consisting of either a lumpectomy with axillary dissection or modified radical mastectomy. Regarding pathological response, 40 (14.34%) patients achieved a complete response (CR), 161 (57.71%) achieved a partial response (PR), 64 (22.94%) had stable disease (SD) and 5 (1.79%) had progressive disease (PD).

Molecular stratification of tumors

Molecular subtypes were defined by PAM50 assignment [13]. Of the initial 279 patients, 116 (41.58%) patients were classified as Basal-like subtype, 15 patients (5.38%) as HER2+, 66 (23.66%) as Luminal A, 62 (22.22%) as Luminal B, and 15 (5.38%) as Normal-like. Five patients could not be assigned due to Spearman’s rank correlation were not statistically significant for neither of the molecular subgroup centroids. A sub-classification of TNBCs was performed based on Lehmann’s classification as previously described [14]; 25 (8.96%) TNBC tumors were Basal-like 1, 83 (29.75%) Basal-like 2 subgroup, 6 (2.15%) Luminal Androgen Receptor, and 26 (9.32%) Mesenchymal.

Breast cancer systems biology

Gene expression data from all tumor samples were used to build a probabilistic graphical model, with no other *a priori* information. The resulting graph was divided in eighteen branches (functional nodes) and a main function was assigned to each node by gene ontology analysis. The structure of the probabilistic graphical model clearly reflected different biological functions (Figure 1) Functional node activities were then calculated as

previously showed [10, 15].

Functional structure of response to neoadjuvant chemotherapy

Patients were classified according to pathological response regardless of their tumor molecular subtype to study the response to neoadjuvant chemotherapy. Significant differences between functional node activities were observed in “Immune response (MHCII)” (node 9), “Immune response (B cell)” (node 11) and “Immune response (Interferon)” (node 12) nodes, in which, tumors attaining a complete response had higher activation (Figure 2). Blown up pictures of the genes in the red boxes are provided in Supplementary Figures 1-5. A progressive decrease in the activity of immune functional nodes was seen depending on the response, being higher in tumors obtaining a CR and absent in those having a progression. Additionally, the relationship of immune nodes activities with the pathological response was evaluated using an ordinal logistic regression analysis. This analysis revealed that an increment of one unit in node 9, 11 and 12 activities increased the probability of a favorable response 1.739, 1.435 and 1.629 times respectively. By contrast, one unit increase in the activity of node 10 increased 0.519 times the probability of having an unfavorable response. On the other hand, PD tumors showed higher functional activity in “Cell cycle 1” (node 17) and “Cell cycle 2” (node18), followed by CR tumors.

Functional characterization of molecular subtypes

Patients in the network were further classified according to their molecular subtype (Basal-like, Luminal

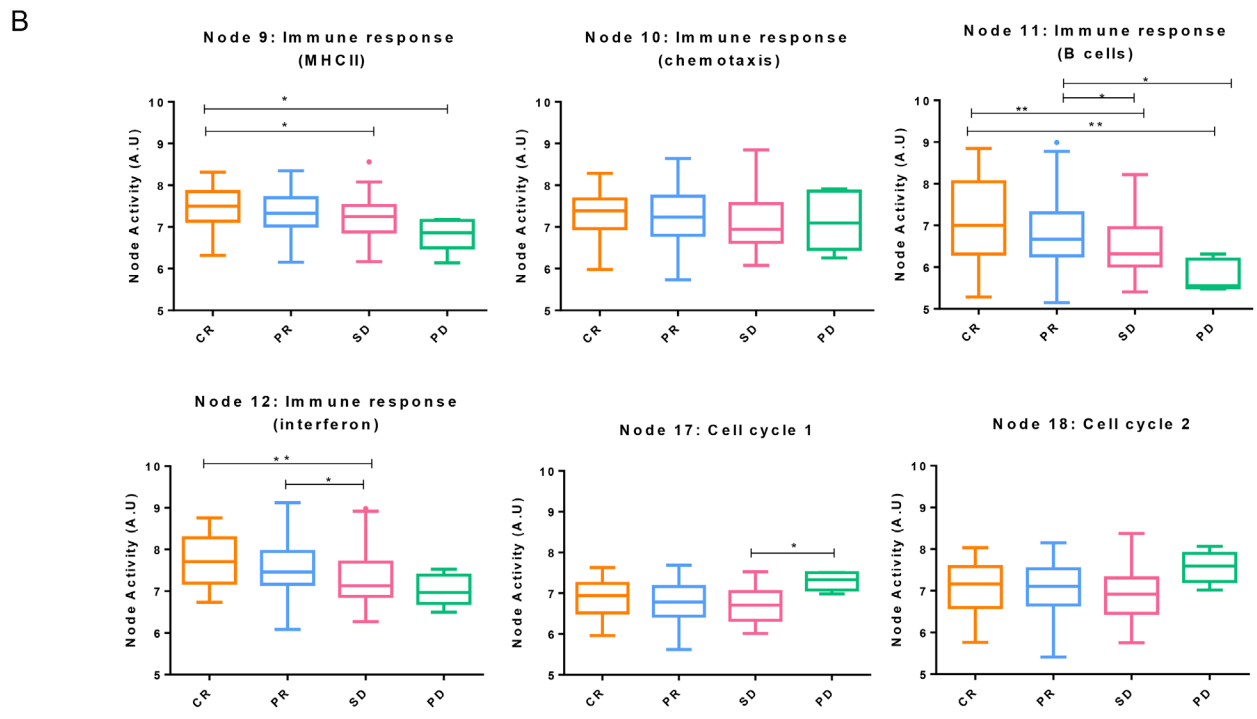
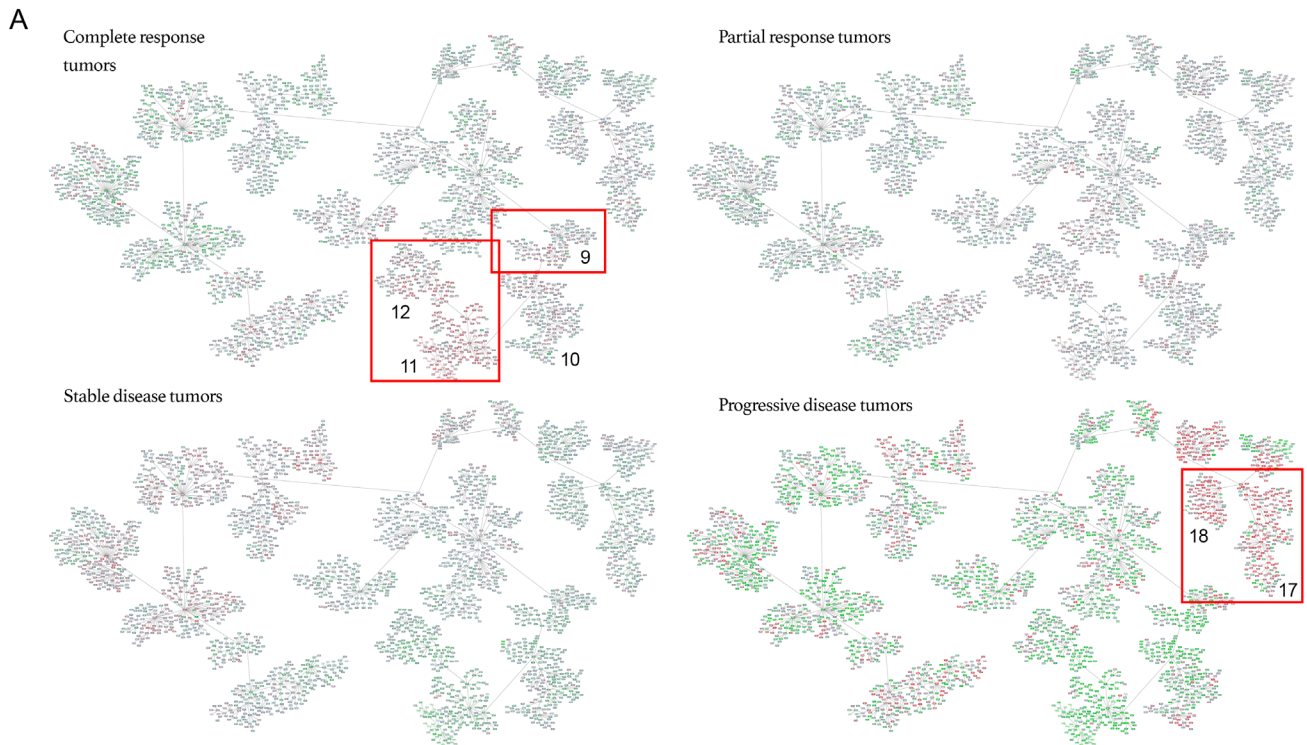


Figure 2: Breast cancer network by pathological response groups. **A.** Detail of nodes with the highest activity in each of the subgroups. Genes with an expression below 0 were represented in green; genes with an expression around 0 were represented in grey and genes with an expression above zero were represented in red. **B.** Functional node activities differences between pathological response groups: Box-and-whisker plots are Tukey boxplots. All p -values were two-sided and $p < 0.05$ was considered statistically significant. P -value < 0.05 (*); p -value < 0.01 (**). A.U: arbitrary units.

A, Luminal B, HER2+ and Normal-like). Basal-like tumors were also classified according to Lehmann's subtypes. "Immune response (MHCII)" (node 9) node activity was higher in Luminal A and Normal-like subtypes while Basal-like tumors showed higher functional node activity in "Immune response (chemotaxis)" (node 10), "Immune response (B cell)" (node 11) and "Immune response (Interferon)" (node 12), as well as in "Cell cycle 1 and 2" (nodes 17 and 18) nodes (Figure 3).

Concerning TNBCs sub-classification, BL2 subtype showed a higher functional activity in "Immune response" (nodes 9, 10, 11 and 12) nodes whereas it was observed higher "Cell cycle 1 and 2" (nodes 17 and 18) nodes

activities in BL1 tumors.

In order to evaluate the functional implications between molecular subtypes and response to neoadjuvant therapy, data from patients of the same molecular subtype were mean centred and analysed independently. Luminal A group included no PD, whereas only one PD was found in Luminal B group, and was excluded from this analysis. Normal-like and HER2+ tumors were insufficient to perform subsequent analyses.

Concerning Luminal A and Luminal B subtypes, "Immune response (MHCII)" (node 9), "Immune response (chemotaxis)" (node 10), "Immune response (B cell)" (node 11) and "Immune response (Interferon)"

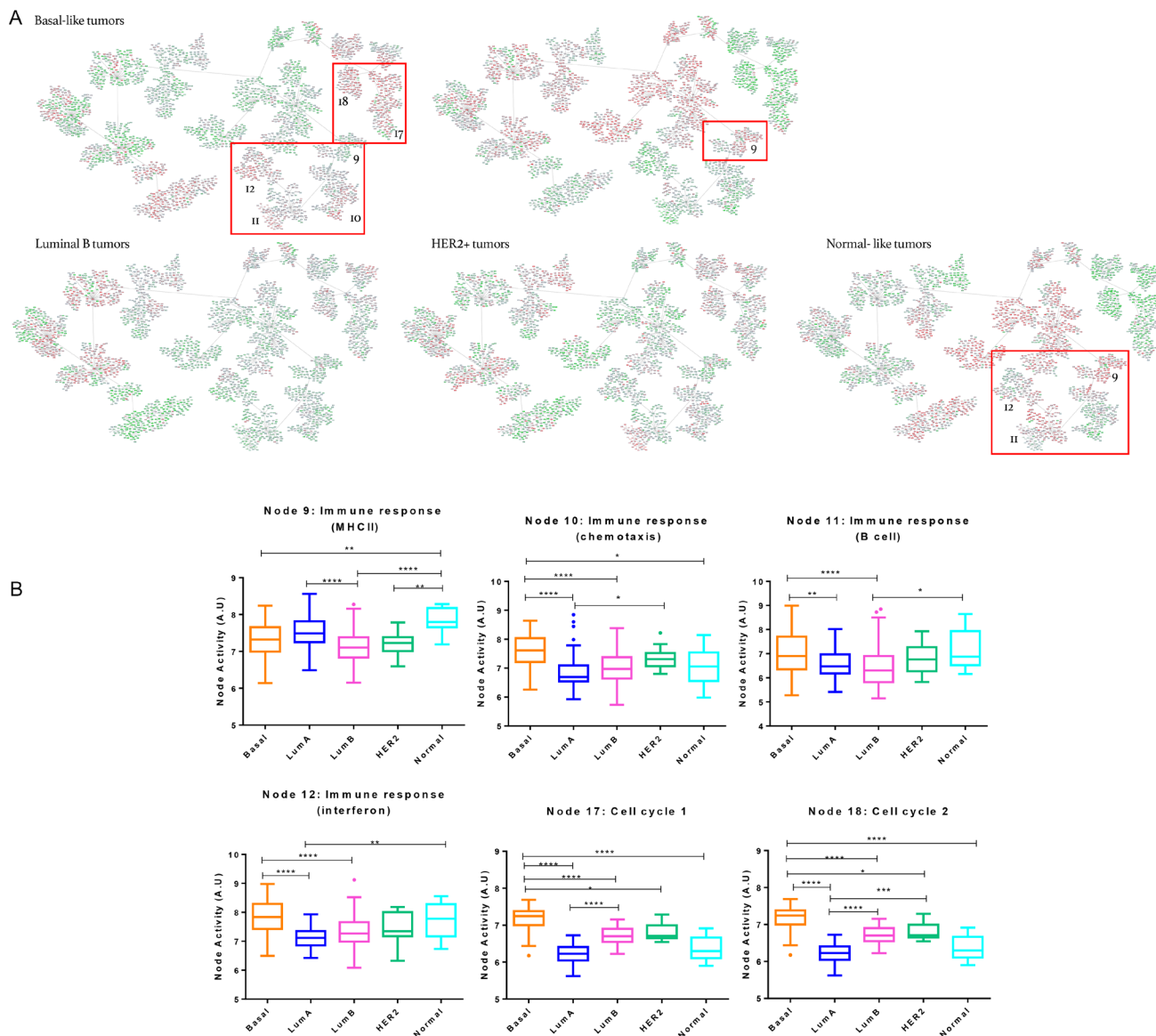


Figure 3: Breast cancer network by breast cancer molecular subtypes. **A.** Detail of nodes with the highest activity in each of the subgroups. Genes with an expression below 0 were represented in green; genes with an expression around 0 were represented in grey and genes with an expression above zero were represented in red. **B.** Functional node activities differences between molecular subtypes: Box-and-whisker plots are Tukey boxplots. All *p*-values were two-sided and *p* < 0.05 was considered statistically significant. *P*-value < 0.05 (*); *p*-value < 0.01 (**); *P*-value < 0.001 (***) ; *P*-value < 0.0001 (****). A.U: arbitrary units.

(node 12) functional nodes activities were higher in tumors attaining a CR, although differences were not statistically significant. As in the case of Basal-like tumors, a progressive decrease of activity in these nodes was observed from CR to SD.

In Basal-like subtype, tumors attaining a CR showed significant differences in “Immune response (B cell)” (node 11) and “Immune response (Interferon)” (node 12) nodes activities while “Immune response (MHCII)” (node 9) node activity was higher in tumors showing a PR. PD tumors showed a higher functional node activity in Cell cycle 1” (node 17) and Cell cycle 2” (node 18). Regarding TNBC, in the BL1 subtype, the activity of nodes “Immune response (B cell)” (node 11) and “Immune response (Interferon)” (node 12) was higher in CR than in PR. “Immune response (MHCII)” (9), “Immune response (chemotaxis)” (node 10) node activities also were higher in CR tumors but without statistics differences. In the BL2 subtype, CR tumors showed a significant higher activity in “Immune response (MHCII)” (node 9) and “Immune response (B cell)” (node 11). However, SD tumors showed a higher activity in “Immune response (chemotaxis)” (node 10). In Mesenchymal subtype, CR tumors showed higher activity in “Immune response (MHCII)” (node 9) and “Immune response (B cell)” (node 11) nodes but

without being statistically significant.

Three separate probabilistic graphical models were built for Basal-like, Luminal-A and Luminal-B subtypes. As in the global network, tumors experiencing a CR had an increased activity of immune response-related nodes, although differences were not statistically significant.

Immunological markers

Markers of tumor-infiltrating lymphocytes were analysed to further characterize response according to the immune status. For that, patients were separated according to their pathological response and marker gene expression levels were compared between groups. Tumors obtaining a CR showed significantly higher expression levels of cell lineage markers (CD4, CD8 and CD20) as well as immune-activating (IGKC, CXCL9, CCL5, CXCL13) and immunosuppressive markers (IDO1, PD1) compared to the rest of tumors (Figure 4).

DISCUSSION

In this work, a gene expression-based probabilistic graphical model analysis of breast cancer showed that

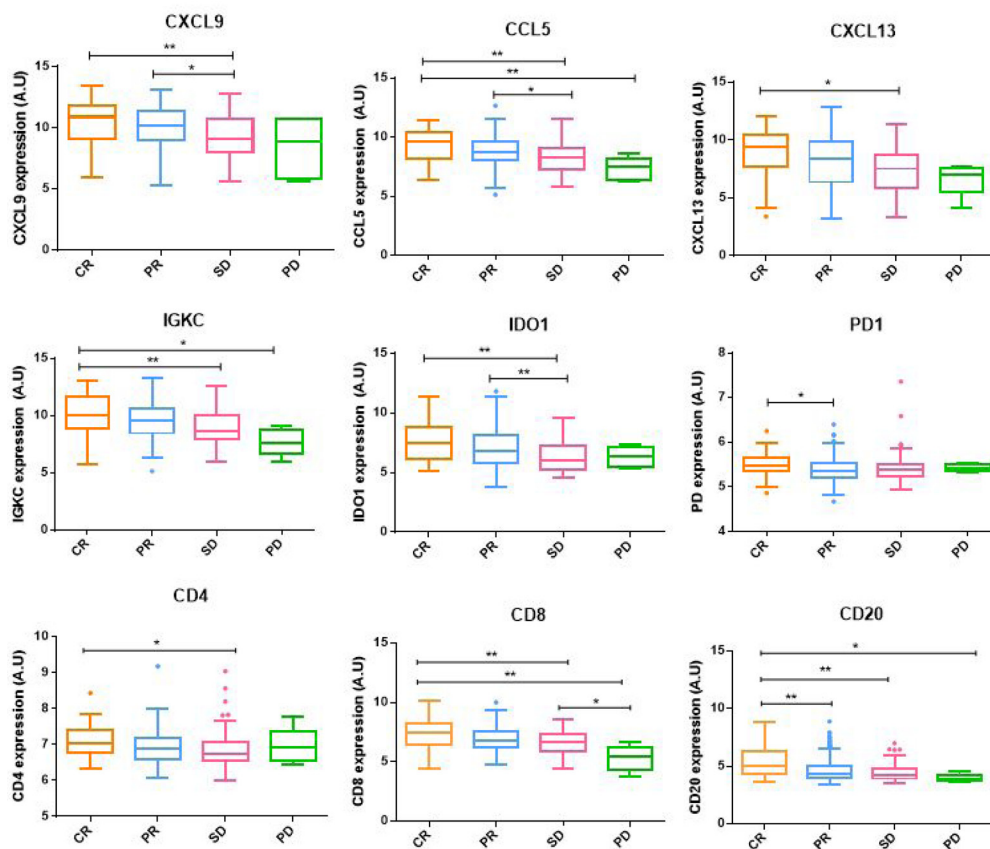


Figure 4: Immunological markers expression. Immune-activating, immunosuppressive and cell lineage markers gene expression between pathological response groups. Box-and-whisker plots are Tukey boxplots. All p -values were two-sided and $p < 0.05$ was considered statistically significant. P -value < 0.05 (*); p -value < 0.01 (**); p -value < 0.001 (***) ; p -value < 0.0001 (****). A.U: arbitrary units.

immune functional nodes were related to pathological response to neoadjuvant chemotherapy. This correlation did not depend on the molecular subtype, indicating that a Systems Biology approach complements knowledge obtained from other research methods. Non-directed probabilistic graphical models allow managing large gene datasets and underscoring lots of gene interactions, many of which have not been previously described.

The activity of immune nodes was higher in tumors attaining a CR and decreased with the intensity of response. Tumors progressing on chemotherapy also showed increased activity in the nodes “Cell division 1” (node 17) and “Cell division 2” (node 18). These results suggest that the patient’s immune system plays a crucial role in the response to neoadjuvant chemotherapy. Previous studies suggest that conventional therapies are effective in patients exhibiting some degree of immune activation in the tumor [16], supporting our findings. Chemotherapy may mediate the “immunogenic” death of tumor cells, thus facilitating an immune response against the disease [17].

As expected, all tumors attaining a CR- regardless of molecular subtype- showed significantly higher levels of cell lineage markers (CD4, CD8 and CD20) as well as immune-activating (IGKC, CXCL9, CCL5, CXCL13) and immunosuppressive markers (IDO1, PD1), suggesting a greater infiltration of immune cells. High tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) levels have been associated with increased CR rates in ER+ HER2+/- tumors [18] and also in TNBC [19]. However, high levels of PD-1+ TILs or Foxp3+ TILs have been related with poor prognosis [18]. Therefore, immune cell subpopulation profiles could help to predict response to neoadjuvant chemotherapy.

Basal-like and HER2+ subgroups have been associated with highest CR rates as opposed to Luminal and Normal-like tumors. However, the genes that were associated with CR in Basal-like subgroup were not associated with CR in the HER2+ subgroup, suggesting that different sets of genes are associated with CR in the different molecular subtypes [20, 21]. In the present cohort, Basal-like tumors had the highest CR rate, as expected. However, the CR rate was poor in HER2+ tumors, probably because these patients did not receive anti-HER2 targeted therapy. On the other hand, BL1 tumors achieved a CR more commonly than other TNBC subtypes, as previously described [22]. Although node “Immune response (MHCII)” (node 9) had higher activity in Luminal A and Normal subtypes, the remaining nodes related to immune response showed increased activity in Basal-like tumors. This agrees with the fact that, in general, there are far fewer TILs in luminal disease than in HER2 or TNBC subtypes [23]. In fact, even though increased TILs concentrations are associated with increased frequency of response to neoadjuvant chemotherapy in all breast cancer subtypes, there is a different effect of TILs on survival in TNBC and luminal

breast cancer. Increased TILs concentrations are associated with longer survival in TNBC and HER2+ disease, but not in luminal-HER2-negative tumours [24], suggesting again a differences in the biology of the immunological infiltrate across molecular subtypes.

One possible explanation of the higher “Immune response (MHCII)” (node 9) activity in Luminal A subtype could be the contribution of different immune cell types. Most types of immune cells were increased in TNBC compared with luminal-HER2- negative breast cancer. In TNBC, the presence of many immune cell subtypes, including B cells, T cells, and macrophages, were linked to improved survival [24]. By contrast, in luminal-HER2-negative breast cancer, the presence of T cells was not prognostic for survival and the only cell types linked to improved prognosis were B and myeloid dendritic cells [24], which are MHCII presenting cells. Taking this into account, it would be interesting to perform further studies about MHCII presenting cells infiltration in luminal subtypes.

On the other hand, Basal-like tumors also had the highest activity in the node “Cell cycle” (nodes 17 and 18), which is in accordance with the fact proliferation renders tumor cells more sensitive to chemotherapy [6].

The neoadjuvant setting is appealing in the field of drug development because it allows early evaluation of efficacy. However, not all patients benefit from this approach, so markers predicting response to neoadjuvant chemotherapy are clearly necessary, as neoadjuvant therapy may have some drawbacks, such as promoting metastasis in some cases [25]. Our results suggest that immune activation in the tumor may identify responders. Although validation is needed, the use of these markers can help to determine the future use of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.

MATERIALS AND METHODS

Patient’s and samples origin and characteristics

A breast cancer tumor dataset, including gene expression and clinical data, was obtained from the Gene Expression Omnibus (GSE41998) and from a phase II trial (NCT00455533). Gene expression profiling was measured using an Affymetrix GeneChip, normalized and log2 transformed. Surgical specimens were evaluated by a pathologist at each study site. The pathological response was evaluated as the primary endpoint. A pathological complete response (CR) was defined by no histologic evidence of residual invasive adenocarcinoma in the breast and axillary lymph nodes, with or without the presence of ductal carcinoma in situ [12]. Responses were categorized as complete, partial, stabilization or progression.

Gene expression data preprocessing

The PAM50 method was used as previously described to assign a molecular subtype to each sample [13]. Lehmann subtypes for TNBC were assigned in two steps [14]. First, samples were assigned to Lehmann's seven subtypes using centroids constructed from 77 previously assigned tumors in GSE31519 dataset. Then, the IM and MSL groups were redefined as previously described [14].

Probabilistic graphical models construction

A functional structure was developed using undirected probabilistic graphical models (PGMs) as previously described [10]. Briefly, PGMs compatible with high-dimensionality were chosen. The result is an undirected graphical model with local minimum Bayesian Information Criterion. DAVID 6.8 was used to assign a biological function to each node in the networks, using "homo sapiens" as background list and selecting only GOTERM-FAT and Biocarta and KEGG pathways categories. Functional activity of each node was calculated by the mean expression of the genes in each node. To visualize node activities, data from all tumors used to construct the network were mean centred prior to its inclusion into the network.

Statistics and software suites

Differences between groups were assessed using Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney test and Dunn's multiple comparisons test using GraphPad Prism 6. Box-and-whisker plots are Tukey boxplots. All p-values were two-sided and $p < 0.05$ was considered statistically significant. Ordinal logistic regression analysis was performed in SAS using logistic procedure. Network analyses were performed in MeV and Cytoscape 3.2.1 software suites.

Abbreviations

AC: doxorubicin/cyclophosphamide; BL1: Basal-like 1; BL2: Basal-like 2; CR: complete response; ER: Estrogen receptor; HER2: Human epidermal growth factor receptor 2; IM: immunomodulatory; MSL: mesenchymal stem-like; PD: progressive disease; PGMs: probabilistic graphical models; PR: Partial response; PR: Progesterone receptor; SD: stable disease; TNBC: Triple Negative Breast Cancer.

Author contributions

All the authors have directly participated in the preparation of this manuscript and have approved the final version submitted. JMA, HN and PM contributed the probabilistic graphical models. MD-A contributed the GPR rule calculation. AZ-M, LT-F and GP-V performed the statistical analysis, the probabilistic graphical model interpretation and the gene ontology analyses. AZ-M drafted the manuscript. AZ-F, AG-P, JAFV, JF and EE conceived of the study and participated in its design and interpretation. AG-P, JAFV, PZ and EE supported the manuscript drafting. AG-P and JAFV coordinated the study. All the authors have read and approved the final manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

JAFV, EE and AG-P are shareholders in Biomedica Molecular Medicine SL. LT-F is an employee of Biomedica Molecular Medicine SL. The other authors declare no potential conflicts of interest.

FUNDING

This study was supported by Instituto de Salud Carlos III, Spanish Economy and Competitiveness Ministry, Spain and co-funded by the FEDER program, "Una forma de hacer Europa" (PI15/01310). LT-F is supported by the Spanish Economy and Competitiveness Ministry (DI-15-07614). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

REFERENCES

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136:E359-86.
2. Dawson SJ, Rueda OM, Aparicio S, Caldas C. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *EMBO J*. 2013; 32:617-28.
3. Honrado E, Benítez J, Palacios J. The pathology of hereditary breast cancer. *Hered Cancer Clin Pract*. 2004; 2:131-38.
4. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406:747-52.
5. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K. Metastatic behavior

- of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol.* 2010; 28:3271-77.
6. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 2002; 347:1999-2009.
 7. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Rakha EA, Richardson AL, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol.* 2011; 24:157-67.
 8. Smith IC, Heys SD, Hutcheon AW, Miller ID, Payne S, Gilbert FJ, Ah-See AK, Eremin O, Walker LG, Sarkar TK, Eggleton SP, Ogston KN. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel. *J Clin Oncol.* 2002; 20:1456-66.
 9. Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev.* 2012; 38:698-707.
 10. Gámez-Pozo A, Berges-Soria J, Arevalillo JM, Nanni P, López-Vacas R, Navarro H, Grossmann J, Castaneda CA, Main P, Díaz-Almirón M, Espinosa E, Ciruelos E, Fresno Vara JÁ. Combined label-free quantitative proteomics and microRNA expression analysis of breast cancer unravel molecular differences with clinical implications. *Cancer Res.* 2015; 75:2243-53.
 11. de Anda-Jáuregui G, Velázquez-Caldelas TE, Espinal-Enríquez J, Hernández-Lemus E. Transcriptional Network Architecture of Breast Cancer Molecular Subtypes. *Front Physiol.* 2016; 7: 568.
 12. Horak CE, Pusztai L, Xing G, Trifan OC, Saura C, Tseng LM, Chan S, Welcher R, Liu D. Biomarker analysis of neoadjuvant doxorubicin/cyclophosphamide followed by ixabepilone or Paclitaxel in early-stage breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2013; 19:1587-95.
 13. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009; 27:1160-67.
 14. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, Moses HL, Sanders ME, Pietenpol JA. Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection. *PLoS One.* 2016; 11:e0157368.
 15. Gámez-Pozo A, Trilla-Fuertes L, Berges-Soria J, Selevsek N, López-Vacas R, Díaz-Almirón M, Nanni P, Arevalillo JM, Navarro H, Grossmann J, Gayá Moreno F, Gómez Rioja R, Prado-Vázquez G, et al. Functional proteomics outlines the complexity of breast cancer molecular subtypes. *Sci Rep.* 2017; 7:10100.
 16. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, Budczies J, Darb-Esfahani S, Kronenwett R, Hanusch C, von Törne C, Weichert W, Engels K, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28:105-13.
 17. Ghiringhelli F, Apetoh L. The interplay between the immune system and chemotherapy: emerging methods for optimizing therapy. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014; 10:19-30.
 18. Yu X, Zhang Z, Wang Z, Wu P, Qiu F, Huang J. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Transl Oncol.* 2016; 18:497-506.
 19. Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R, Pfitzner BM, Salat C, Loi S, Schmitt WD, Schem C, Fisch K, Darb-Esfahani S, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J Clin Oncol.* 2015; 33:983-91.
 20. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK, Dhingra K, Theriault RL, Singh G, Binkley SM, Sneige N, Buchholz TA, Ross MI, McNeese MD, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1999; 17:460-69.
 21. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, Hess KR, Stec J, Ayers M, Wagner P, Morandi P, Fan C, Rabiul I, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:5678-85.
 22. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, Valero V, Lehmann BD, Pietenpol JA, Hortobagyi GN, Symmans WF, Ueno NT. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res.* 2013; 19:5533-40.
 23. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, Loi S. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016; 13:228-41.
 24. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, Budczies J, Huober J, Klauschen F, Furlanetto J, Schmitt WD, Blohmer JU, Karn T, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* 2018; 19:40-50.
 25. Karagiannis GS, Pastoriza JM, Wang Y, Harney AS, Entenberg D, Pignatelli J, Sharma VP, Xue EA, Cheng E, D'Alfonso TM, Jones JG, Anampa J, Rohan TE, et al. Neoadjuvant chemotherapy induces breast cancer metastasis through a TMEM-mediated mechanism. *Sci Transl Med.* 2017; 9.