



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**



**Avaliação de assinaturas moleculares relacionadas à
processos redox em mulheres com câncer de mama**

Aluna: Letícia Lopes Dantas Santos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Yara Cristina de Paiva Maia

UBERLÂNDIA - MG

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**



**Avaliação de assinaturas moleculares relacionadas à
processos redox em mulheres com câncer de mama**

Aluna: Letícia Lopes Dantas Santos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Yara Cristina de Paiva Maia

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte
dos requisitos para obtenção do
Título de Doutora em Genética e
Bioquímica.**

UBERLÂNDIA - MG

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S237a Santos, Letícia Lopes Dantas, 1992-
2024 Avaliação de assinaturas moleculares relacionadas à [recurso eletrônico] processos redox em mulheres com câncer de mama / Letícia Lopes Dantas Santos. - 2024.

Orientadora: Yara Cristina de Paiva Maia.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.7072>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Maia, Yara Cristina de Paiva, 1975-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 575

Glória Aparecida
Bibliotecária Documentalista - CRB-6/2047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**Avaliação de assinaturas moleculares relacionadas à
processos redox em mulheres com câncer de mama**

ALUNA: Letícia Lopes Dantas Santos

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^a. Dr^a. Yara Cristina de Paiva Maia (Orientadora)

Examinadores: Dr^a. Carmen Silvia Passos Lima (Membro Externo)
Dr. Rafael Malagoli Rocha (Membro Externo)
Dr^a. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila (Membro Interno)
Dr^a. Vivian Alonso Goulart (Membro Interno)
Dr. Robson Francisco Carvalho (Suplente Membro Externo)
Dr^a Luciana Machado Bastos (Suplente Membro Interno)

Data da Defesa: 26 / 01 / 2024

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PPGGB para o formato da Tese foram contempladas.

YARA CRISTINA DE PAIVA MAIA



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica - PPGGB				
Defesa de:	Doutorado Acadêmico				
Data:	Vinte e seis de janeiro de dois mil e vinte e quatro	Hora de início:	13:00h	Hora de encerramento:	17:25
Matrícula do Discente:	11923GBI008				
Nome do Discente:	Letícia Lopes Dantas Santos				
Título do Trabalho:	Avaliação de assinaturas de biologia redox e prognóstico em mulheres com câncer de mama				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Tecnologias convergentes aplicadas a saúde e bem estar – Técnicas de precisão prognóstica (SMART PROGNOSTIC) em pacientes com tumores sólidos metastáticos.				

Aos vinte e seis dias do mês de janeiro de dois mil e vinte e quatro, às 13:00 horas, reuniu-se via web conferência pela Plataforma *Cisco Webex*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Resolução de nº 06/2020 e Resolução nº 19/2022 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Dr^a. Carmen Silvia Passos Lima, Dr. Rafael Malagoli Rocha, Dr^a. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, Dr^a. Vivian Alonso Goulart e Dr^a. Yara Cristina de Paiva Maia, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, Dr^a. Yara Cristina de Paiva Maia apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato (a):

APROVADA

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do

Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Yara Cristina de Paiva Maia, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/01/2024, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Veridiana de Melo Rodrigues Avila, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/01/2024, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Alonso Goulart, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/01/2024, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Malagoli Rocha, Usuário Externo**, em 26/01/2024, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carmen Silvia Passos Lima, Usuário Externo**, em 26/01/2024, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5014689** e o código CRC **BDF3714B**.

Dedicado à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais uma etapa concluída. Creio que desde o início da minha jornada acadêmica Ele preparou todos os recursos para que eu chegasse até aqui e além. Sou grata pelos dias bons e pelos dias difíceis, pois Jesus nunca me faltou. Como é bom tê-lo como meu melhor amigo!

Sou grata a todos os meus familiares, pois fazem parte dessa história. Em especial aos meus pais, Adriana e Maurício, os quais amo de todo o coração, e ao meu esposo Kelrison, que participou de todos os momentos do doutoramento ao meu lado. Minha mãe cultivou em mim o desejo de estudar e desenvolver minha vocação, por isso sou imensamente grata. Agradeço também à minha querida irmã Jéssica, que ocupa um lugar especial em meu coração.

Agradeço aos meus avós por sempre acreditarem em mim e por todo o amor e dedicação. Infelizmente, meu avô Espedito faleceu antes que a tese fosse concluída, mas ele sempre estará em nosso coração e em nossa memória.

Meus agradecimentos não estariam completos sem estendê-los à Professora Dr^a. Yara, que me apresentou à carreira científica. Sua orientação fez toda a diferença para que esse percurso fosse possível. Ao longo das iniciações científicas, mestrado e doutorado me ensinou a valorizar cada resultado e a ter um olhar mais humanizado para todos que estão ao meu redor, sejam colegas de trabalho ou pacientes. Obrigada pelas valiosas lições!

Agradeço a todos os membros do grupo de pesquisa em Biologia Molecular e Nutrição (BioNut) por todas as contribuições ao longo desses anos. Em especial, agradeço à Dr^a. Alinne Tatiane e à MSc. Izabella Cristina por tantos anos de amizade e colaboração.

Agradeço aos amigos que fiz ao longo dos anos que estive morando em Uberlândia, em especial à 5^a turma de Biomedicina da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e aos queridos amigos que conheci na Igreja Assembleia de Deus Missão aos Povos de Uberlândia.

Agradeço à Professora Tisbe Franco, pelas aulas de inglês e por sua amizade. Agradeço ao Laboratório de Nanobiotecnologia Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, em especial à Dr^a. Luciana Bastos e à Dr^a. Natássia Resende, por todo o suporte para que os experimentos fossem realizados.

Agradeço ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial ao Professor Dr. Foued Espíndola pela parceria e por cada ensinamento ao longo

desses anos.

Agradeço aos Professores Dr. Carlos Eduardo Paiva e Dr. Marcelo Maia pelas importantes contribuições e sugestões, tornando o estudo ainda mais relevante e consistente.

Agradeço ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) pelo financiamento dos experimentos realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) na estação de luz IMBUIA-micro. Em especial, agradeço aos pesquisadores Dr. Raul Freitas e Dr^a. Ohanna Menezes por viabilizarem a obtenção dos resultados com tamanha dedicação e profissionalismo.

Finalmente, agradeço aos pacientes e funcionários do Hospital de Clínicas de Uberlândia que participaram e aos setores de Ginecologia, Obstetrícia e Oncologia. Os agradecimentos se estendem aos queridos Dr. Donizetti William Santos e Dr^a. Paula Lajolo, por serem nossos parceiros e colaboradores. Agradeço aos professores e servidores do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica (PPGGB).

Agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG.

“Temos, porém, este tesouro em vasos de barro, para que se veja que a excelência do poder provém de Deus, não de nós.”

(2 Coríntios 4.7 NAA)

SUMÁRIO

Apresentação.....	1
Introdução	2
Objetivos	5
Objetivo Geral.....	5
Objetivos Específicos	5
I. Capítulo 1: Fundamentação Teórica	6
I.I Aspectos gerais: tumores malignos e benignos de mama.....	7
I.II Prognóstico para mulheres com câncer de mama	9
I.III Biologia redox e câncer de mama	13
I.IV Reconfiguração metabólica dos tumores relacionada ao estado redox...	20
I.V Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	24
II. Capítulo 2: <i>A Lower Serum Antioxidant Capacity as a Distinctive Feature for Women with HER2+ Breast Cancer: A Preliminary Study</i>	36
III. Capítulo 3: <i>Analysis of R-SH Quantification Unveils Redox Imbalance Signatures in Advanced Metastatic Breast Cancer</i>	52
Conclusão.....	69
Perspectivas.....	70
Anexos.....	71

RESUMO

O tipo de câncer que mais acomete a população feminina mundialmente é o de mama, despontando como uma das principais causas de morte entre mulheres. Nesse contexto, dados clínicos, patológicos e biológicos são usados por profissionais de saúde para prever desfechos clínicos. No entanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias para casos de câncer de mama (CM) com prognóstico desfavorável. A presente tese destaca que o desbalanço redox pode ser abordado como uma assinatura molecular prognóstica para mulheres com CM. Esta tese é composta por três capítulos e tem como objetivo avaliar as assinaturas moleculares relacionadas à processos redox em mulheres com CM. O primeiro capítulo da tese apresenta uma revisão da literatura dos principais tópicos relacionados ao objetivo proposto. O segundo capítulo é composto por um artigo científico que investiga os números de onda do espectro infravermelho obtidos por ATR-FTIR e sua relação com os níveis de marcadores de status redox no sangue de mulheres com CM HER2+, HER2- e doença benigna da mama (DBM). Os resultados indicam que os casos de CM HER2+ se diferem dos casos HER2- e DBM pela capacidade antioxidante do soro [CM HER2+ vs. CM HER2- (AUC = 0,818; especificidade = 81,82%; sensibilidade = 66,67%); CM HER2+ vs. DBM (AUC = 0,875; especificidade = 75%; sensibilidade = 83,33%)]. Além disso, alterações em termos bioquímicos que ocorrem no soro devido à escassez de antioxidantes estão relacionadas a uma impressão digital peculiar no espectro infravermelho obtido por ATR-FTIR. O terceiro capítulo é composto por um artigo científico que avalia a quantificação de tiol livre (sulfidril, R-SH livre) utilizando amostras de soro de mulheres com CM metastático, não metastático, DBM e controles saudáveis. A quantificação de R-SH livre demonstrou uma redução notável em mulheres com CM metastático ($p = 0,018$). Em síntese, foi possível concluir que a análise do status redox sistêmico em amostras de sangue demonstra-se de grande valor para o desenvolvimento de novas ferramentas menos invasivas para triagem, monitoramento e prognóstico do CM.

Palavras-chave: câncer de mama; desbalanço redox; marcadores de estado redox; HER2; capacidade antioxidante; tiol livre; ATR-FTIR.

ABSTRACT

The most prevalent type of cancer affecting the global female population is breast cancer, emerging as one of the leading causes of death among women. In this context, clinical, pathological, and biological data are employed by healthcare professionals to predict clinical outcomes. However, the development of new strategies for cases of breast cancer (BC) with unfavorable prognosis is imperative. This thesis highlights that redox imbalance can be addressed as a molecular prognostic signature for women with BC. Comprising three chapters, this thesis aims to evaluate molecular signatures related to redox processes in women with BC. The first chapter of the thesis provides a literature review on the key topics related to the proposed objective. The second chapter consists of a scientific article investigating the wavenumbers of the infrared spectrum obtained by ATR-FTIR and their relationship with the levels of redox status markers in the blood of women with HER2+, HER2- BC, and benign breast disease (BBD). The results indicate that HER2+ BC cases differ from HER2- BC and BBD cases based on serum antioxidant capacity [HER2+ BC vs. HER2- BC (AUC = 0.818; specificity = 81.82%; sensitivity = 66.67%); HER2+ BC vs. BBD (AUC = 0.875; specificity = 75%; sensitivity = 83.33%)]. Furthermore, biochemical alterations in the serum due to antioxidant deficiency are linked to a distinctive fingerprint in the infrared spectrum obtained by ATR-FTIR. The third chapter comprises a scientific article evaluating the quantification of free thiol (sulfhydryl, R-SH) using serum samples from women with metastatic BC, non-metastatic BC, BBD, and healthy controls. The quantification of free R-SH demonstrated a notable reduction in women with metastatic BC ($p = 0.018$). In summary, it was possible to conclude that the analysis of systemic redox status in blood samples proves to be of great value for the development of less invasive tools for screening, monitoring, and prognostication of BC.

Keywords: breast cancer; redox imbalance; redox status markers; HER2; antioxidant capacity; free thiol; ATR-FTIR.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1. Modelo hipotético do estudo.....	4
--	---

Capítulo I

Figura 2. Ciclo de oxido-redução da glutathiona (GSH).....	16
---	----

Capítulo II

Figure 1. Study flowchart.....	39
--------------------------------	----

Figure 2. Graph of the second derivative ATR-FTIR. A) Infrared spectrum HER2+ vs. BBD; (B) Infrared spectrum HER2+ vs. HER2-; (C) Infrared spectrum BBD vs. BC.....	41
---	----

Figure 3. ROC Curve for HER2+ vs. BBD. (A) 3874 cm ⁻¹ ; (B) 3876 cm ⁻¹ ; (C) 3878 cm ⁻¹	42
--	----

Figure 4. Redox status biomarkers levels in BC, HER2+, HER2- and BBD women. (A) GSH, SOD and FRAP levels in BC and BBD women; (B) GSH, SOD and FRAP levels in HER2+, HER2- and BBD women.....	44
---	----

Figure 5. ROC Curve for HER2+ vs. BBD, HER2+ vs. HER2- and HER2- vs. BBD. (A) FRAP differentiates the groups HER2+ and BBD; (B) FRAP differentiates the groups HER2+ and HER2-; (C) SOD differentiates the groups HER2- and BBD....	44
---	----

Capítulo III

Figure 1. Study flowchart.....	55
--------------------------------	----

Figure 2. Sulfhydryl levels in metastatic BC, non-metastatic BC, BBD and healthy control women.....	57
---	----

Figure 3. Glutathione system. Quantification of GSH and GR and GPx activity.....	58
--	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Table 1. Clinical and histopathological characteristics of women with breast cancer (n = 17).....	40
Table 2. Assignments and comparison between second derivative serological ATR-FTIR spectra of women with HER2+ BC (n = 6), HER2- BC (n = 11) and women with BBD (n = 8)	42
Table 3. Profile of redox status markers among women with breast cancer and benign breast disease at a university hospital in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil (n = 25).....	43
Table 4. Profile of redox status markers among women with breast cancer HER2+, HER2- and benign breast disease at a university hospital in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil (n = 25)	43

Capítulo III

Table 1. Clinical and histopathological characteristics of women with breast cancer (n = 53).....	56
Table 2. Characteristics regarding metastases in patients from the metastatic BC group (n = 20).....	57
Table 3. Profile of sulfhydryl among women with metastatic BC, non-metastatic BC, BBD and healthy control at a university hospital in Minas Gerais, Brazil (n = 108)...	57
Table 4. Profile of GSH, GPx and GR among women with metastatic BC, non-metastatic BC, BBD and healthy control at a university hospital in Minas Gerais, Brazil (n = 108)	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	Comitê Americano Conjunto sobre o Câncer (<i>American Joint Committee on Cancer</i>)
Akt	Proteína quinase B
ARE	Elemento responsivo a antioxidantes (<i>Antioxidant Responsive Element</i>)
ATR	Reflexão total atenuada (<i>Attenuated Total Reflectance</i>)
AUC	Área sob a curva (<i>Area Under the Curve</i>)
BIRADS	Sistema de relato e dados para imagens de mama (<i>Breast Imaging Reporting and Data System</i>)
BRCA1	Gene de suscetibilidade ao câncer de mama 1 (<i>Breast Cancer Gene 1</i>)
BRCA2	Gene de suscetibilidade ao câncer de mama 2 (<i>Breast Cancer Gene 2</i>)
CAT	Catalase
CD44	Proteína de superfície cluster de diferenciação 44 (<i>Cluster of Differentiation 44</i>)
CM	Câncer de mama
CUL3	Culina 3
DBM	Doença benigna da mama
DCIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
EGF	Fator de crescimento epidérmico (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial (<i>endotelial Nitric Oxide Synthase</i>)
ER	Receptor de estrogênio
ERBB2	Gene do receptor tirosina quinase 2 da família Erb-B2 (<i>Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2</i>)
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular (<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>)

FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina (<i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>)
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (<i>Fluorescence in situ Hybridization</i>)
FOXO	Família de fatores de transcrição “Caixa de Forkhead O” (<i>Forkhead box O</i>)
FRAP	Poder antioxidante redutor férrico (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)
FTIR	Espectroscopia infravermelha de transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared</i>)
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GCL	Glutamato-cisteína-ligase
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione reduzida
GSS	Glutathione sintetase
GSSG	Glutathione oxidada
HER2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HIF1	Fator 1 de transcrição indutível por hipóxia (<i>Hypoxia-Inducible Factor 1</i>)
IARC	Agência internacional de pesquisa em câncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IDH	Isocitrato desidrogenase
IF	Imunofluorescência
IHQ	Imuno-histoquímica
JAK	Proteína janus quinase (<i>Janus Kinase</i>)
KEAP1	Proteína Kelch-like 1 Associada à ECH (<i>Kelch-like ECH-Associated Protein 1</i>)
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
ME	Enzima málica
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos (<i>mammalian Target of Rapamycin</i>)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatado reduzido
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos (<i>Neutrophil</i>

Extracellular Traps)

NFκB	Fator nuclear kappa B (<i>Nuclear Factor Kappa B</i>)
NR	Não relatado
Nrf2	Fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2 (<i>Nuclear factor erythroid 2–related factor 2</i>)
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCA	Análise de componente principal (<i>Principal Component Analysis</i>)
PKD1	Proteína quinase-1 dependente de fosfoinositídeo (<i>3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1</i>)
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase (<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>)
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PPP	Via das pentoses fosfato (<i>Pentose Phosphate Pathway</i>)
PR	Receptor de progesterona
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados (<i>Poly Unsaturated Fatty Acids</i>)
ROC	Característica de operação do receptor (<i>Receiver Operating Characteristic</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
R-SH	Sulfidrila ou tiol livre
SOD	Superóxido dismutase
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição (<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>)
TNM	Tumor, Nódulo, Metástase
TPTZ	2,4,6–Tris(2-piridil)-s-triazina
TRIS	Trisaminometano
WHO	Organização mundial da saúde (<i>World Health Organization</i>)
XCT	Transportador de cistina / glutamato

Apresentação

A formatação desta tese seguiu o modelo estabelecido pelo Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. A organização da tese contempla três capítulos.

Capítulo I - fundamentação teórica, apresenta como forma de revisão da literatura os temas abordados na tese.

Capítulo II – artigo intitulado “*A Lower Serum Antioxidant Capacity as a Distinctive Feature for Women with HER2+ Breast Cancer: A Preliminary Study*”, o qual teve como objetivo investigar os números de onda do espectro infravermelho obtidos por ATR-FTIR e sua relação com os níveis de marcadores de status redox no sangue de mulheres com CM HER2+, HER2- e doença benigna da mama (DBM). Esse artigo foi publicado em 2 de dezembro de 2022 no periódico *Cancers* (Fator de impacto = 6,575). Referência: SANTOS, L. L. D. *et al.* A Lower Serum Antioxidant Capacity as a Distinctive Feature for Women with HER2+ Breast Cancer: A Preliminary Study. **Cancers**, v. 14, n. 23, p. 5973, 2022. doi: <https://doi.org/10.3390/cancers14235973>.

Capítulo III – artigo intitulado “*Analysis of R-SH Quantification Unveils Redox Imbalance Signatures in Advanced Metastatic Breast Cancer*”, o qual teve por objetivo explorar a quantificação de tiol livre (sulfidril, R-SH livre), GSH, GPx e GR utilizando amostras de soro de mulheres com CM metastático, CM não metastático, DBM e controles saudáveis. Este artigo será submetido para o periódico *Redox Biology* (Fator de Impacto = 11,4). Os autores são: Letícia L. D. Santos, Alinne T. F. Silva, Izabella C. C. Ferreira, Lara A. Marques, Allisson B. Justino, Maria Sol Penã, Renata R. Teixeira, Donizeti W. Santos, Paula P. Lajolo, Carlos Eduardo Paiva, Foued S. Espíndola and Yara C. P. Maia.

Por fim, será apresentada a conclusão da tese e suas perspectivas.

Introdução

Embora tenha sido objeto de estudo em todo o mundo, o câncer de mama (CM) persiste como um significativo desafio e ainda é um grande problema de saúde pública, despontando como o tipo de câncer mais comum entre mulheres (Sung *et al.*, 2021; Brasil, 2023). Adicionalmente, caracteriza-se como uma doença altamente heterogênea, com variações morfológicas e moleculares (Brasil, 2023).

As estimativas apontam que serão diagnosticados 3.025.471 novos casos de CM em 2040 mundialmente (Sung *et al.*, 2021). No Brasil, para o triênio de 2023 a 2025 são esperados 73.610 casos, com um risco aproximado de 66,54 novos casos a cada 100 mil mulheres (Brasil, 2023).

Os tumores malignos de mama são a segunda principal causa de morte entre a população feminina, principalmente após o desenvolvimento de metástases (Sung *et al.*, 2021; Brasil, 2023). Cerca de 90% das mortes associadas ao câncer são causadas pela doença metastática e não por tumores primários (Lambert; Pattabiraman; Weinberg, 2017).

Dentro dessa temática, diversos achados clínicos, patológicos e biológicos são utilizados para prever variáveis como a possibilidade de recorrência da doença ou a sobrevida (Piccart-Gebhart *et al.*, 2005). Sabe-se que os fatores prognósticos clássicos, como estadiamento tumoral, grau histológico e fatores genéticos, são essenciais para decisões sobre os objetivos terapêuticos e escolha de tratamento inicial (Krishnan *et al.*, 2013). A combinação desses parâmetros possui grande valor clínico, pois é possível classificar os pacientes em categorias de risco (Aydiner; Igci; Soran, 2019).

No entanto, quando se aborda o cuidado de pacientes com cânceres avançados, durante a prática clínica percebe-se a necessidade da utilização de outras estratégias para melhor atender a demanda do paciente, como a identificação de novos marcadores prognósticos ou a criação de novos modelos prognósticos precisos e aplicáveis para CM metastático (Hui *et al.*, 2019).

Um exemplo de biomarcador prognóstico é o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), pois sua superexpressão ou amplificação de seu gene em tumores de mama e ovário estão relacionadas à redução tanto da sobrevivência dos pacientes como do tempo até a recidiva (Slamon; Clark; Wong, 1987; Gschwind; Fischer; Ullrich, 2004).

Fatores como a superexpressão do HER2, dentre outros como envelhecimento e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Oxygen Reactive Species*) pelas mitocôndrias, podem contribuir para o desequilíbrio redox no sentido pró-oxidativo, também conhecido como estresse oxidativo, que está relacionado a danos e modificações estruturais em vários componentes celulares, como DNA, lipídios e proteínas (Devi *et al.*, 2014; Hecht *et al.*, 2016).

Devido ao papel crítico dos mecanismos de estresse oxidativo no tratamento do CM e potencialmente de metástases, foi proposto que o estresse oxidativo pode ser particularmente importante no prognóstico do câncer e ainda, pode ser considerado um fator de risco. No entanto, a literatura epidemiológica nesta área é limitada (He *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2017).

O desequilíbrio redox tem sido associado ao CM e leva a uma redução nos níveis séricos de sulfidrilas (também nominado R-SH livre ou tiol) (Mahalingaiah; Singh, 2014; Hecht *et al.*, 2016; Gào *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2020; Xing *et al.*, 2022). Esse grupo funcional desempenha um papel fundamental por sua capacidade redutora, atuando como antioxidante (Bourgonje *et al.*, 2021). O R-SH é encontrado no aminoácido cisteína e moléculas relacionadas dentro de sistemas biológicos, participando de reações bioquímicas ao doar um ou dois elétrons (Nagy; Winterbourn, 2010; Turell; Radi; Alvarez, 2013).

Atualmente, o potencial valor prognóstico do R-SH livre tem sido estudado para algumas doenças sabidamente impactadas pelo estresse oxidativo, como por exemplo câncer de pulmão e falência renal crônica (Dirican *et al.*, 2016; Sener *et al.*, 2020; Bourgonje *et al.*, 2021).

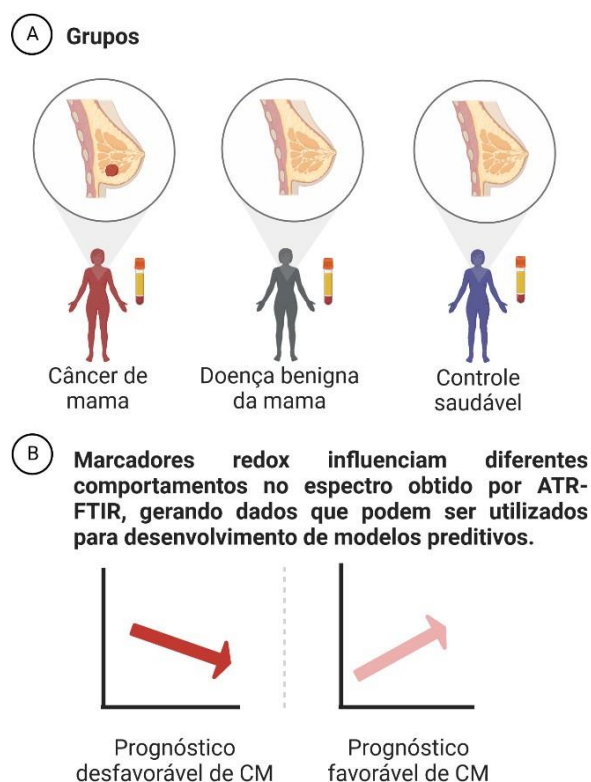
Uma forma de determinar a capacidade antioxidante total em uma amostra de sangue é o método conhecido como Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP, do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*) (Benzie; Devaki, 2017). Essa abordagem é simples e muito sensível (detecta < 2µM de poder redutor/antioxidante) (Zhong; Shahidi, 2015).

A oxidação de uma molécula impacta significativamente sua distribuição de densidade eletrônica, modificando assim seu espectro vibracional (Barth, 2007). A espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR) é uma técnica vibracional relativamente simples capaz de detectar mudanças na força de ligação, refletindo efetivamente a composição química da amostra analisada, à partir de um pequeno volume da amostra e sem o

uso de reagentes (Barth, 2007; Fadlelmoula *et al.*, 2022). Nesse sentido, pode retratar alterações decorrentes do estresse oxidativo em amostras de sangue de pacientes com CM (**Figura 1**).

Em síntese, a análise do status redox sistêmico por meio de métodos como FRAP e ATR-FTIR com amostras de sangue pode ser importante na pesquisa por novas ferramentas menos invasivas para triagem e prognóstico do CM. Além disso, a inteligência artificial surge como uma alternativa para o refinamento e melhor compreensão e simplificação dos dados obtidos.

Figura 1. Modelo hipotético do estudo.



Legenda: (A) Grupos de estudo: mulheres com câncer de mama, doença benigna da mama e controle saudável; (B) Comportamento do gráfico obtido por ATR-FTIR é influenciado por marcadores redox.
Fonte: autoria própria utilizando a ferramenta *BioRender*.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar assinaturas moleculares relacionadas à processos redox em mulheres com CM.

Objetivos Específicos

- Apresentar o estado da arte dos principais tópicos relacionados ao estado redox e CM (capítulo 1).
- Analisar os números de onda do espectro infravermelho obtidos por ATR-FTIR e sua correlação com os níveis dos marcadores redox GSH, SOD, CAT, FRAP e proteína carbonilada entre mulheres com CM HER2+, CM HER2- e DBM (capítulo 2).
- Investigar se a absorbância relativa aos números de onda espectro infravermelho obtido por ATR-FTIR são influenciadas pelos marcadores de status redox GSH, SOD, CAT, FRAP e proteína carbonilada entre mulheres com CM HER2+, CM HER2- e DBM (capítulo 2).
- Analisar a quantificação de sulfidril e sua correlação com o prognóstico e status redox de mulheres em diferentes condições de saúde, incluindo aquelas com CM metastático em cuidados paliativos, CM não metastático, DBM e controle saudável (capítulo 3).

I. Capítulo 1: Fundamentação Teórica

I.I Aspectos gerais: tumores malignos e benignos de mama

Diversos elementos estão envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama (CM), tais como mecanismos genéticos poligênicos, epigenéticos e ambientais (Tang *et al.*, 2014; Wagner *et al.*, 2019). Dessa forma, constitui-se como uma doença crônica não transmissível que possui grande heterogeneidade, observada em todos os níveis, desde macroscópico até molecular (Tang *et al.*, 2014; Wagner *et al.*, 2019).

O processo de carcinogênese ou oncogênese ocorre de forma geral em três estágios: iniciação, ocorrendo mutações e alterações epigenéticas relacionadas aos genes chamados proto-oncogenes e genes supressores tumorais; promoção, havendo ação de agentes oncopromotores sobre a célula alterada; e progressão, caracterizada pela proliferação descontrolada e irreversível da célula (You; Jones, 2012; Brasil, 2017). Adicionalmente, anormalidades numéricas e estruturais nos cromossomos são comuns em células cancerígenas, e podem desempenhar um papel crítico no seu desenvolvimento (Swierczynski, 2014).

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), a qual faz parte da Organização Internacional de Saúde (WHO), ocorreram 19,3 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo em 2020, uma quantidade alarmante (Sung *et al.*, 2021). As estimativas apontam que um em cada cinco indivíduos terá câncer ao longo da vida (Sung *et al.*, 2021).

Na população feminina, o CM é a neoplasia mais frequente mundialmente (Sung *et al.*, 2021). A incidência nas mulheres brasileiras também é a mais elevada, exceto o câncer de pele não melanoma, correspondendo a mais de 30% de todos os tumores que atingem a população feminina e mantendo ascendente taxa de mortalidade (Brasil, 2023). Na América do Sul, prevê-se um aumento de 30% de óbitos relacionados ao CM até 2030, atingindo um total de 54.163 óbitos (Sung *et al.*, 2021).

A glândula mamária é um órgão de origem ectodérmica, cuja estrutura reflete a sua função: a produção de leite para a lactação (Bistoni; Farhadi, 2015). Assim, as mamas são mais proeminentes nas mulheres após a puberdade e apenas rudimentares nos homens (Bazira; Ellis; Mahadevan, 2022).

A estrutura interna da mama é composta por componentes epiteliais que consistem em 15-20 lóbulos, ligados aos ductos conectados ao mamilo (Bistoni;

Farhadi, 2015; Bazira; Ellis; Mahadevan, 2022). Esses lóbulos e ductos estão localizados e espalhados por todo o tecido fibroso e tecido adiposo que formam a mama (Bistoni; Farhadi, 2015). O mamilo é circundado por uma área pigmentada da pele, a aréola (Bazira; Ellis; Mahadevan, 2022).

O formato e o tamanho das mamas dependem de fatores genéticos e dietéticos, além da idade, número de gestações e estado pré ou pós menopausa (Bistoni; Farhadi, 2015). A maior parte do tecido mamário geralmente está localizada em seu quadrante superior externo, onde é mais frequente o diagnóstico de CM e da maioria das doenças benignas da mama (DBM) (Bazira; Ellis; Mahadevan, 2022).

As DBMs incluem todas as condições não malignas da mama (Miltenburg; Speights, 2008). Assim, são o diagnóstico mais comum, compreendendo cerca de 75% dos resultados de biópsias mamárias (Pearlman; Griffin, 2010; Sherman *et al.*, 2023).

As lesões benignas são heterogêneas e é comum uma mesma mulher ter mais de uma DBM simultaneamente (Miltenburg; Speights, 2008). Caracterizam-se como massas palpáveis ou anormalidades observadas na mamografia e podem ser classificadas em três categorias: lesões inflamatórias; tumores e condições semelhantes a tumores que não são malignas e não indicam um risco aumentado para desenvolvimento subsequente de CM; e distúrbios proliferativos que indicam um risco aumentado para CM (Miltenburg; Speights, 2008). Além disso, dentre as desordens proliferativas, podem ser subdivididas em sem atipia (risco de CM entre 1,3-1,9) e com atipia (risco de CM entre 4,1-5,3) (Pearlman; Griffin, 2010).

As DBMs inflamatórias são basicamente necrose gordurosa, mastite e mastite granulomatosa (Miltenburg; Speights, 2008). Dentre as DBMs mais diagnosticadas estão os cistos, porém não conferem risco aumentado para CM (Miltenburg; Speights, 2008). Outras importantes DBMs são a adenose esclerosante, que possui risco duas vezes maior para CM, e as hiperplasias atípicas, as quais são consideradas lesões pré-neoplásicas, com risco entre quatro a cinco vezes maior para CM (Miltenburg; Speights, 2008).

Em linhas gerais, considerando os demais múltiplos fatores de risco para a ocorrência do CM, são considerados principais na etiologia do CM: menarca precoce (antes dos 12 anos); menopausa tardia (após os 55 anos); nuliparidade;

primeira gestação após os 30 anos; uso de alguns anticoncepcionais e terapia de reposição hormonal na menopausa; exposição à radiação ionizante; consumo de bebidas alcoólicas; dietas hipercalóricas; sedentarismo; e predisposição genética por mutações em determinados genes – principalmente por dois genes de risco elevado, *BRCA1* e *BRCA2* (Brasil, 2023).

Historicamente, houve um grande aumento na incidência de CM nos países desenvolvidos após a industrialização (Hanahan, 2014). O desenvolvimento econômico e a urbanização foram benéficos em diversos aspectos, porém também são acompanhados de maiores índices de obesidade, consumo de alimentos processados, sedentarismo e modificações nos padrões reprodutivos (Lukong, 2017). O posterior aumento da incidência nos países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, pode ser de forma semelhante devido aos fatores de risco associados às alterações nos hábitos de vida (Hanahan, 2014; Lukong, 2017).

Nesse contexto, a incidência primária do CM aumenta ano após ano, o que aliado aos avanços terapêuticos possibilita que este seja o maior grupo de sobreviventes de neoplasias malignas em todo o mundo (Skouroliahou *et al.*, 2018). No entanto, as sobreviventes têm risco cerca de duas a cinco vezes maiores de recidiva, necessitando de acompanhamento médico (Skouroliahou *et al.*, 2018).

I.II Prognóstico para mulheres com câncer de mama

O termo prognóstico é derivado do antigo grego e significa saber antecipadamente (Neto; Heinemann, 2016). No campo da ciência médica, destacam-se os fatores prognósticos, que são achados clínicos, patológicos e biológicos do paciente e do tumor que são utilizados para prever o comportamento clínico do paciente, como a possibilidade de recorrência da doença ou a sobrevida (Piccart-Gebhart *et al.*, 2005).

Primeiramente, para a definição do prognóstico do CM recém-diagnosticado é necessário investigar o subtipo molecular por meio de exame histopatológico (Aydiner; Igci; Soran, 2019). As principais ferramentas utilizadas são a imuno-histoquímica (IHQ), os métodos de imunofluorescência (IF) e a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (Aydiner; Igci; Soran, 2019). Busca-se identificar nas amostras de biópsias de mama receptores tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), receptores de estrogênio (ER), receptores de progesterona (PR) e o

marcador de proliferação celular Ki-67, características essenciais para a escolha do tratamento a ser adotado posteriormente (Aydiner; Igci; Soran, 2019).

O HER2 é uma proteína transmembrana codificada pelo gene *ERBB2*, o qual está localizado no cromossomo 17q21 (Slamon; Clark; Wong, 1987). A superexpressão ou amplificação de seu gene em tumores de mama serve como biomarcador de câncer agressivo e com prognóstico desfavorável, o que ocorre em cerca de 15-25% dos casos (Stival; Prestes; Mansani, 2014; Li *et al.*, 2015; DeSantis *et al.*, 2019). Esse receptor faz parte da família ErbB (proteínas tirosino quinases transmembranares que se ligam ao fator de crescimento epidérmico – EGF - e outras moléculas semelhantes) (Aydiner; Igci; Soran, 2019). Após a formação de homodímeros ou heterodímeros, sua função intracelular de tirosino quinase é ativada, levando, em última instância, a proliferação e sobrevivência celular, divisão e capacidade de migração (Eroles *et al.*, 2012). O HER2 é um receptor que pode desencadear três vias de sinalização principais: Ras/Raf/MAPK, JAK/Stat e PI3K/AKT/mTOR, que favorecem a proliferação celular (Eroles *et al.*, 2012).

A introdução de anticorpos monoclonais humanizados com um alvo específico para o HER2 na clínica (trastuzumabe e pertuzumabe), assim como de inibidores de tirosina quinase (lapatinibe, tucatinibe) e de anticorpos conjugados a medicamentos (ado-trastuzumabe emtansina e trastuzumabe deruxtecano), reduziram o risco de recidivas de tumores HER2+ em 50% e melhoraram a sobrevida em mais de 33% dos casos (Ferrario *et al.*, 2022).

O ER é um fator de transcrição nuclear que tem papel na proliferação, crescimento e diferenciação das células do epitélio mamário (Aydiner; Igci; Soran, 2019). Esse biomarcador possui valor prognóstico, sendo o mais importante para que ocorra resposta clínica à terapias hormonais (Aydiner; Igci; Soran, 2019).

O PR é um determinante crítico da função do ER devido ao crosstalk entre esses dois biomarcadores (Mohammed *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2022). Isso se deve ao gene do PR ser regulado positivamente por estrógeno, indicando uma via de ER funcional quando expresso (Mohammed *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2022).

O antígeno Ki-67 é o marcador imuno-histoquímico de proliferação celular mais utilizado na prática pelos patologistas com valor prognóstico, expresso nas fases tardias G1, S e G2/M do ciclo celular (Sahoo *et al.*, 2022). Assim, é de suma importância para diferenciar fenótipos menos agressivos, como tumores luminal A

no contexto de elevado conteúdo de ER e PR (pois o índice Ki-67 é muito baixo); fenótipo luminal B, independente da porcentagem de conteúdo ER/PR (pois o índice Ki-67 é acima ou igual à 14%); e quase todos os tumores triplo-negativos de alto grau possuem um índice Ki-67 > 50% (Aydiner; Igci; Soran, 2019).

Os subtipos moleculares do CM são classificados de acordo com a expressão dos quatro marcadores: luminal A (ER e/ou PR positivo / HER-2 negativo / baixo Ki-67), luminal B (ER e/ou PR positivo / HER2-negativo / elevado Ki-67), HER-2 positivo luminal B (ER e/ou PR positivo/HER2 superexpresso / qualquer Ki-67), HER2-positivo não-luminal (ER e PR ausentes /HER2 superexpresso), e triplo negativo (ER e PR ausentes/HER2-negativo) (Goldhirsch *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015).

Entretanto, para uma melhor definição do prognóstico do CM, informações sobre grau do tumor e, em alguns casos, perfis genômicos são necessárias, além dos biomarcadores mencionados acima (Edge; Hortobagyi; Giuliano, 2019). Adicionalmente, é importante destacar que o estadiamento clínico é realizado a partir dos dados clínicos e exames de imagem antes do início do tratamento e o estadiamento patológico somente é possível após dados histopatológicos e informações cirúrgicas (Edge; Hortobagyi; Giuliano, 2019).

O sistema de classificação mais utilizado é baseado no de Bloom e Richardson, modificado por Elston e Ellis, o qual avalia a proporção de formação de glândulas ou túbulos, grau de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica (Elston; Ellis, 1991, 1993). Cada um dos 3 fatores recebe uma pontuação de 1 a 3 (Giuliano *et al.*, 2017). De acordo com o escore tumoral combinado, o tumor é incluído em grau 1 ou bem diferenciado (escore 3 a 5), grau 2 ou diferenciação intermediária (escore 6 ou 7) e grau 3 (escore 8 ou 9) ou pouco diferenciado (Giuliano *et al.*, 2017). Casos de alto grau tendem à recorrência e à metástase precoce, enquanto casos de baixo grau geralmente apresentam um desfecho clínico melhor (Giuliano *et al.*, 2017).

Descrito pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) desde a década de 1940, o sistema de estadiamento TNM (dimensão do tumor primário [T], extensão de disseminação para linfonodos regionais [N], presença ou ausência de metástase distante [M]) é uma ferramenta padrão de avaliação prognóstica para pacientes com câncer (Edge; Hortobagyi; Giuliano, 2019).

De acordo com este sistema, T compreende: TX, tumor primário não pode ser avaliado; T0, não há evidências de tumor primário; Tis (DCIS), carcinoma ductal in situ; Tis (Paget), doença de Paget do mamilo não associada a carcinoma invasivo e/ou carcinoma ductal in situ no parênquima mamário subjacente; T1, tumor $\leq$ 20mm em sua maior dimensão; T2, tumor $>$ 20mm mas $\leq$ 50mm em sua maior dimensão; T3, tumor $>$ 50mm em sua maior dimensão; e T4, tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica e/ou à pele (nódulos macroscópicos) (Giuliano *et al.*, 2017).

Quanto à letra N: NX; linfonodo regional não pode ser avaliado; N0, linfonodo regional não tem metástase; N1, micro metástase ou metástase nos linfonodos axilares 1-3, e/ou linfonodos mamários internos clinicamente negativos com micrometástases ou macrometástases por biópsia de linfonodo sentinela; N2; metástase nos linfonodos axilares 4-9, ou linfonodos mamários internos ipsilaterais positivos na ausência de metástases linfonodais axilares; N3, metástase em 10 ou mais linfonodos axilares, ou em linfonodos infraclaviculares (axilares nível III), ou linfonodos mamários internos ipsilaterais positivos por exames de imagem na presença de um ou mais linfonodos axilares positivos de nível I e II, ou em mais de 3 linfonodos axilares e micrometástases ou macrometástases por biópsia de linfonodo sentinela em linfonodos mamários internos ipsilaterais clinicamente negativos ou em linfonodos supraclaviculares ipsilaterais (Giuliano *et al.*, 2017).

A letra M refere-se: M0, sem evidência clínica ou radiográfica de metástases à distância; M1, metástases à distância detectadas por meios clínicos e radiográficos e/ou metástases histologicamente comprovadas maiores que 0,2mm (Giuliano *et al.*, 2017).

Atualmente, o sistema TNM está em sua nona edição, e classifica em estadiamentos de I a IV o CM, de acordo com as combinações T, N e M (0: carcinoma “in situ”; I: invasão local inicial; II: tumor primário limitado ou invasão linfática regional mínima; III: tumor local extenso ou invasão linfática regional extensa; IV: tumor localmente avançado ou presença de metástases) (Edge; Hortobagyi; Giuliano, 2019).

No entanto, um estudo que analisou pacientes com CM que tinham metástases no momento do diagnóstico inicial (metástase *de novo*) indicou que os resultados sobre taxa de sobrevida obtidos após o seguimento das mulheres por três anos

foram muito heterogêneos (Plichta *et al.*, 2023). Usando como base o total de três anos, a sobrevida variou entre 73,5% a 5,7% (Plichta *et al.*, 2023). Com isso, os pesquisadores afirmam serem necessárias futuras revisões das atuais diretrizes de estadiamento do AJCC para CM em estadiamento IV recém-diagnosticado (Plichta *et al.*, 2023).

Portanto, atualmente ainda não existem ferramentas prognósticas acuradas específicas para pacientes com CM avançado. O desenvolvimento de tais ferramentas depende do estudo aprofundado das características que mantêm o desenvolvimento tumoral.

I.III Biologia redox e câncer de mama

Uma reação de oxido-redução, ou reação redox, envolve a transferência de elétrons (Walz, 1979). Em sistemas bioquímicos, tais reações consistem na remoção de um ou vários elétrons de uma primeira molécula, uma etapa chamada oxidação, e uma subsequente doação desses elétrons para uma segunda molécula, uma etapa chamada redução (Walz, 1979). Assim, tanto uma oxidação como uma redução ocorrem simultaneamente nas reações redox (Walz, 1979).

As ROS são extremamente reativas por extraírem um elétron de uma molécula próxima para completar seus próprios orbitais, iniciando reações em cadeia (Smith *et al.*, 2007). O O_2 tem a capacidade de receber um total de quatro elétrons, o que o reduz à água (Smith *et al.*, 2007). Quando ele recebe um elétron, o superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é formado (Smith *et al.*, 2007). Quando o superóxido recebe um elétron, ele é reduzido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Smith *et al.*, 2007). O radical hidroxil ($OH^{\cdot}$) é formado no passo posterior de redução de um elétron na sequência (Smith *et al.*, 2007). Finalmente, a aceitação do último elétron reduz o radical hidroxil à água (H_2O) (Smith *et al.*, 2007).

Estima-se que cerca de 2% do oxigênio consumido na cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias é reduzido apenas parcialmente (Gorrini; Harris; Mak, 2013). Dessa forma, as mitocôndrias são uma importante fonte não enzimática de ROS (Gorrini; Harris; Mak, 2013). Os peroxissomos estão envolvidos na eliminação e produção de ROS, por meio da enzima catalase e da β -oxidação de ácidos graxos, respectivamente (Gorrini; Harris; Mak, 2013). O retículo endoplasmático constitui um ambiente oxidante que favorece a formação de ligações dissulfeto e o

enovelamento de proteínas, porém aumenta os níveis de ROS pela oxidação de proteínas (Gorrini; Harris; Mak, 2013).

Existem diversas reações enzimáticas que geram ROS, incluindo as que envolvem NADPH-oxidase, xantina oxidase, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), enzimas do citocromo P450, lipooxigenase e ciclooxigenase (Gorrini; Harris; Mak, 2013).

O equilíbrio em um sistema bioquímico em relação ao seu estado reduzido versus o seu estado oxidado denomina-se estado redox (Cairns; Harris; Mak, 2011). Em organismos aeróbios saudáveis, existe um balanço entre a produção de ROS e defesas antioxidantes (Walz, 1979). Entretanto, o excesso de ROS pode alterar este equilíbrio, levando ao processo conhecido como estresse oxidativo (Smith *et al.*, 2007).

Portanto, a manutenção do estado redox é crucial para a homeostase celular, pois a oxidação excessiva prejudica componentes celulares como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos (Smith *et al.*, 2007; Gorrini; Harris; Mak, 2013).

Os radicais livres atacam principalmente os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA, do inglês *Poly Unsaturated Fatty Acids*) das membranas celulares (Nimse; Pal, 2015). O dano causado é denominado peroxidação lipídica, que se propaga como uma reação em cadeia, atingindo PUFA's próximos (Nimse; Pal, 2015). O processo inicia-se com a formação de um radical ácido graxo, que rapidamente recebe um oxigênio e torna-se um radical peroxil, o qual é o responsável por continuar a reação em cadeia (Nimse; Pal, 2015).

Além do dano direto aos componentes celulares, o desbalanço na produção de ROS está intimamente ligado aos mecanismos básicos necessários para o desenvolvimento de muitas doenças humanas, inclusive o câncer (Hecht *et al.*, 2016; Dada, 2017). Uma ligação entre ROS e transformação celular foi identificada pela primeira vez em 1981, quando se descobriu que células tumorais se proliferam mais rapidamente sob efeito da insulina, aumentando os níveis de H₂O₂ intracelular (Oberley, 1988).

As ROS estão envolvidas na proliferação celular, por transativação independente de ligante de receptor tirosino kinase e ativação de ERK; na promoção da invasão tecidual e disseminação metastática, devido a liberação de

metaloproteinases e transição epitélio-mesênquima; além de estarem diretamente envolvidas na mutagênese e instabilidade genômica (Fiaschi; Chiarugi, 2012).

Diversos fatores são conhecidos por induzirem a maior produção de ROS, mas a hipóxia é apontada como um dos principais, surgindo de um desequilíbrio entre a oferta e o consumo de oxigênio (Gorrini; Harris; Mak, 2013). Sabe-se que a hipóxia estimula a produção de ROS pelas mitocôndrias, e essas ROS, por sua vez, ativam o fator 1 de transcrição indutível por hipóxia (HIF1) (Bell; Chandel, 2007). O HIF1 é um fator de transcrição heterodimérico que promove a angiogênese, a sobrevivência, a glicólise e a progressão tumoral (Chandel *et al.*, 1998; Semenza, 2011).

Problemas no enovelamento de proteínas dentro do retículo endoplasmático, local de oxidação onde as proteínas nascentes adquirem a correta conformação tridimensional, podem desencadear o estresse do retículo endoplasmático e levar ao acúmulo de ROS (Kincaid; Cooper, 2007). A liberação de cálcio, induzida por este estresse e pela despolarização da membrana interna mitocondrial, também pode ocasionar a maior produção de ROS mitocondriais (Bravo *et al.*, 2012).

Como uma forma de combater o excesso de oxidantes, os antioxidantes são moléculas que podem inibir, quelar ou eliminar os radicais livres e outras ROS, dessa forma retardando ou inibindo danos celulares (Haida; Hakimian, 2019)

Uma das formas de categorização dos antioxidantes é baseada em hidrofília e hidrofobia (Nimse; Pal, 2015). Os antioxidantes hidrossolúveis são hidrofílicos e encontram-se nos fluidos celulares, como citosol ou matriz extracelular (Nimse; Pal, 2015). Os antioxidantes lipossolúveis são hidrofóbicos e localizam-se, predominantemente, nas membranas celulares e lipoproteínas (Nimse; Pal, 2015).

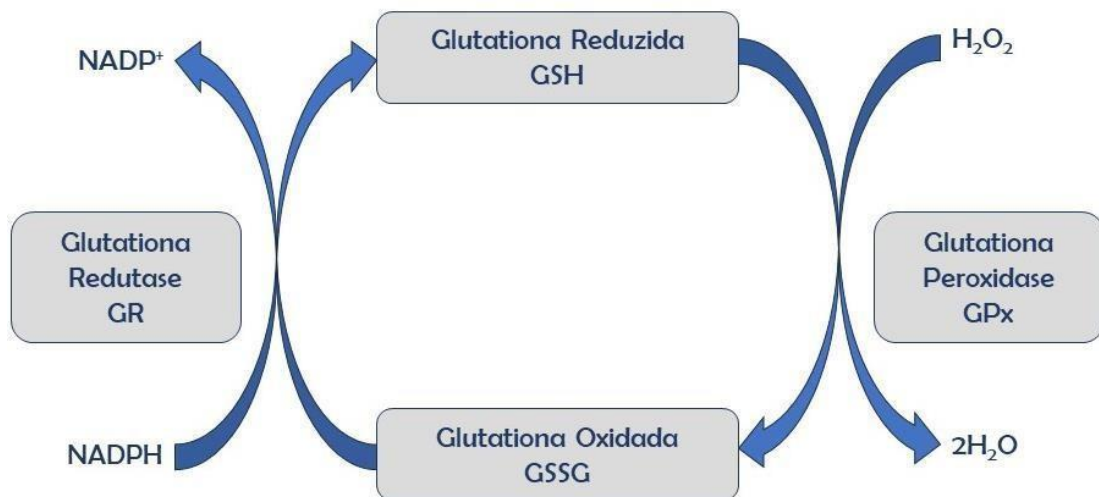
Os antioxidantes também podem ser denominados como pequenas ou grandes moléculas (Nimse; Pal, 2015). As pequenas moléculas antioxidantes atuam limpando todo radical livre (*radical scavenging*), as quais são vitamina C, vitamina E, carotenoides e GSH (Nimse; Pal, 2015). As grandes moléculas antioxidantes são as defesas enzimáticas (Nimse; Pal, 2015).

A dieta é considerada o principal contribuinte externo para a regulação do estado redox plasmático (Nazarewicz *et al.*, 2007; Qian *et al.*, 2021). O consumo de frutas e hortaliças, por exemplo, traz benefícios associados, principalmente, aos antioxidantes presentes nestes alimentos (Finicelli *et al.*, 2022).

As células possuem um sistema antioxidante com mecanismos enzimáticos e

não enzimáticos, que atenuam os danos promovidos pelo estresse oxidativo (Smith *et al.*, 2007). Dentre os enzimáticos, que são altamente específicos para um substrato, a catálise da dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio é realizada pela enzima Superóxido Dismutase (SOD) (Haida; Hakiman, 2019). O H_2O_2 é então neutralizado pela enzima Catalase (CAT) e pelo sistema glutathiona (Haida; Hakiman, 2019). A Glutathiona Peroxidase (GPx) é uma enzima capaz de reduzir o H_2O_2 a partir da oxidação da glutathiona reduzida (GSH), formando glutathiona oxidada (GSSG), que pode voltar a ser GSH pela ação da enzima Glutathiona Redutase (GR) como representado na **Figura 2** (Haida; Hakiman, 2019).

Figura 2. Ciclo de oxido-redução da glutathiona (GSH).



Legenda: As enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) participam do ciclo de oxido- redução da glutathiona (GSH). Fonte: autoria própria.

A glutathiona redutase (GR) é dependente do dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), que transfere elétrons da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) para o dissulfeto de glutathiona (GSSG), regenerando assim duas moléculas de GSH (Ulrich; Jakob, 2019).

O metabólito NADPH é essencial para muitos processos celulares (Gorrini; Harris; Mak, 2013). A sua produção ocorre de três formas: via das pentoses fosfato (PPP), que envolve a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH); conversão de

piruvato em malato pelas isoformas da enzima málica (ME); conversão do isocitrato em α -cetoglutarato pelas isoformas da isocitrato desidrogenase (IDH) (Gorrini; Harris; Mak, 2013).

A enzima SOD pode ser classificada em três grupos, dependendo do seu co-fator e sítio de ação: Cobre/Zinco (CuZn)-SOD (SOD1), Manganês (Mn)-SOD (SOD2), e extracelular CuZnSOD (EC-SOD ou SOD3) (Galadari *et al.*, 2017).

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, existem também as não-enzimáticas, as quais não possuem especificidade (Jomova *et al.*, 2023). Diversas moléculas antioxidantes podem ser obtidas pela dieta, tais como vitamina A (retinol), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferol), ácido úrico, ácido lipóico, compostos fenólicos, além de minerais como ferro, cobre, zinco e manganês, que atuam como cofatores para diferentes enzimas antioxidantes (Haida; Hakiman, 2019; Jomova *et al.*, 2023).

Joseph de Rey-Pailhade foi pioneiro quando em 1888 nomeou como *philothion* o que viria a ser conhecido posteriormente como glutathiona reduzida (GSH), a molécula antioxidante não enzimática mais abundante nas células (Meister, 1988). O nome, derivado das palavras gregas para amor (*philos*) e enxofre (*thion*), foi escolhido devido sua capacidade de reduzir enxofre para sulfeto de hidrogênio (Meister, 1988). O nome glutathiona foi escolhido apenas em 1921 por Frederick G. Hopkins e em seguida a estrutura completa do tripeptídeo foi descoberta (Meister, 1988).

A síntese de GSH acontece a partir da ligação de três aminoácidos (Gorrini; Harris; Mak, 2013). Primeiro, ocorre a ligação entre glutamato e cisteína, catalisada pela enzima glutamato-cisteína-ligase (GCL), seguida da ligação do aminoácido glicina, pela GSH sintetase (GSS) (Gorrini; Harris; Mak, 2013). Enquanto o resíduo de cisteína confere à GSH sua reatividade química, a ligação peptídica γ -glutamil e a carga líquida negativa tornam a GSH um substrato específico para enzimas dependentes de glutathiona (Ulrich; Jakob, 2019).

A GSH é tipicamente caracterizada como o “tampão redox celular”; no entanto, Hansen e colaboradores (2009) quantificaram e categorizaram o total de tióis (R-SH livres ou sulfidrilas) celulares e mostraram que os tióis proteicos representam um conjunto redox ativo maior que o contido na GSH, podendo participar na defesa contra o estresse oxidativo.

O elemento químico enxofre possui 16 prótons e uma configuração eletrônica de $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^4$, permitindo uma ampla faixa de estados de oxidação (de -2 a $+6$) (Nagy; Winterbourn, 2010). O grupo funcional tiol, onde o átomo de enxofre está em seu estado de oxidação mais baixo, está presente no aminoácido cisteína (Nagy; Winterbourn, 2010). Devido ao seu baixo estado de oxidação, os tióis são nucleófilos muito fortes e suscetíveis à oxidação, desempenhando funções fisiológicas importantes como ligar covalentemente proteínas e subunidades proteicas, compor sítios redox ativos de enzimas, atuar como nucleófilos em proteases e fosfatases, cumprir papel integral na sinalização redox e eliminar agentes oxidantes quando faz parte de peptídeos e proteínas antioxidantes (Nagy; Winterbourn, 2010).

Os resíduos de cisteína em proteínas são altamente conservados entre as espécies, sugerindo possibilidades regulatórias além dos papéis estruturais e da coordenação de íons metálicos (Janssen-Heininger *et al.*, 2008). Além disso, podem ser modificados, gerando diferentes efeitos na função proteica (Janssen-Heininger *et al.*, 2008). Portanto, as cisteínas servem como interruptores moleculares, capazes de processar diferentes sinais baseados em respostas redox funcionais distintas (Janssen-Heininger *et al.*, 2008).

O desequilíbrio redox leva a uma redução nos níveis séricos de sulfidrilas (Mahalingaiah; Singh, 2014; Hecht *et al.*, 2016; Gào *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2020; Xing *et al.*, 2022). Nesse contexto, o potencial valor prognóstico do R-SH livre tem sido estudado (Dirican *et al.*, 2016; Sener *et al.*, 2020; Bourgonje *et al.*, 2021).

Segundo Dirican *et al.* (2016), os níveis de R-SH livre na corrente sanguínea de pacientes com câncer de pulmão sofrem uma redução significativa em comparação com controles saudáveis, especialmente em casos avançados. Além disso, os pesquisadores observaram uma sobrevida global mediana menor entre pacientes com níveis mais baixos de R-SH livre (Dirican *et al.*, 2016).

Em um estudo de Inoue e colegas (2018), foi demonstrado que a oxidação da albumina (oxidação de R-SH livre) desencadeia a NETose, um processo no qual neutrófilos produzem estruturas semelhantes a redes conhecidas como armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Estas estruturas facilitam a adesão de células tumorais circulantes em sítios metastáticos, sinalizando como a redução na quantidade de R-SH livre pode estar correlacionada com o início e a perpetuação de

processos metastáticos (Inoue *et al.*, 2018).

Outra modificação pós-traducional que ocorre em proteínas é a carbonilação, uma característica marcante de danos oxidativos (Dalle-Donne *et al.*, 2003; Bujok *et al.*, 2019; Akagawa, 2021). Tal modificação é a introdução de grupos carbonila, como aldeído, cetona e lactama, nas cadeias laterais dos aminoácidos das proteínas (Akagawa, 2021). Quando produzida, esta estrutura é quimicamente estável, o que facilita sua detecção (Akagawa, 2021).

A carbonilação de proteínas é irreversível e pode provocar mudanças conformacionais na cadeia polipeptídica, frequentemente levando à perda da função proteica (Akagawa, 2021). A reação ocorre nas cadeias laterais dos aminoácidos das proteínas por meio da oxidação direta por espécies reativas de oxigênio (ROS) e polifenóis oxidados (Stadtman; Levine, 2003; Ishii *et al.*, 2010). Além disso, pode ser desencadeada pela modificação covalente de proteínas com subprodutos oxidativos de outras moléculas, como lipídios insaturados e açúcares redutores (Akagawa, 2021).

Um método de quantificação do total de antioxidantes em uma amostra é o Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP, do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*), o qual mede a redução de ferro na presença de antioxidantes da amostra, em condições ácidas (pH 3,6) (Benzie; Devaki, 2017; Haida; Hakiman, 2019). O valor de FRAP é expresso como mmol de equivalentes de trolox por gramas (mmolTE /g) (Benzie; Devaki, 2017). Essa abordagem se baseia na capacidade de redução do Fe^{+3} a Fe^{+2} , que é quelado pelo TPTZ (2,4,6–Tris(2-piridil)-s-triazina) para formar o complexo Fe^{+2} -TPTZ, de coloração azul intensa (Haida; Hakiman, 2019).

Atualmente, a investigação sobre o metabolismo redox no CM tem demonstrado a busca da homeostase redox pelas células neoplásicas e a importância de perturbar esta homeostase para o tratamento do câncer (Xing *et al.*, 2022). Ao longo da progressão tumoral, apenas as células que resistem ao estresse oxidativo sobrevivem. Assim, conhecer as estratégias adaptativas do CM para aliviar os danos do estresse oxidativo em uma faixa dinâmica é primordial para intervir.

I.IV Reconfiguração metabólica dos tumores relacionada ao estado redox

As principais vias de sinalização oncogênicas convergem para a adaptação das células tumorais, favorecendo sua proliferação e sobrevivência (Cairns; Harris; Mak, 2011; Hanahan; Weinberg, 2011). Nesse sentido, são consideradas *hallmarks* do câncer as alterações no metabolismo celular (Cairns; Harris; Mak, 2011; Hanahan; Weinberg, 2011).

Os *hallmarks* do câncer são um conjunto de propriedades funcionais fundamentais que são adquiridas no processo de progressão do tumor, tornando possível a existência das células cancerígenas (Hanahan; Weinberg, 2000, 2011).

O metabolismo celular dos tumores é alterado sob três perspectivas principais: geração rápida de ATP para manter o estado de energia; aumento da biossíntese de macromoléculas; e manutenção rigorosa do estado redox celular apropriado (Cairns; Harris; Mak, 2011).

As células tumorais tendem a passar pela reprogramação metabólica de Warburg, caracterizada pelo aumento da atividade de glicólise aeróbia e pela desregulação do metabolismo de lipídeos (Cairns; Harris; Mak, 2011; Fiaschi; Chiarugi, 2012). Esse é o fenótipo metabólico melhor descrito observado nos tumores (Fiaschi; Chiarugi, 2012). Como resultado, muitas células cancerígenas obtêm uma grande quantidade de energia da glicólise aeróbica, convertendo a maior parte da glicose em lactato (Cairns; Harris; Mak, 2011; Fiaschi; Chiarugi, 2012).

A grande liberação de lactato pelas células tumorais contribui para um microambiente com pH ácido, que está associado com maior proliferação de células tumorais, sobrevivência, migração, invasão, angiogênese e supressão da resposta imune anticâncer (Martel; Guedes; Keating, 2016).

Entretanto, embora a glicólise aeróbica (o efeito Warburg) seja o fenótipo metabólico mais bem documentado, não é uma característica universal de todos os tumores (Cairns; Harris; Mak, 2011). Além disso, mesmo nos tumores glicolíticos, a fosforilação oxidativa não é completamente interrompida (Cairns; Harris; Mak, 2011). Aminoácidos, ácidos graxos e até mesmo o lactato têm demonstrado funcionar como combustíveis para células tumorais em determinados contextos genéticos e microambientais (Cairns; Harris; Mak, 2011). A regulação dessa

flexibilidade metabólica é um desafio que exige maiores estudos sobre a complexidade do câncer (Cairns; Harris; Mak, 2011).

Os tumores sólidos geralmente possuem duas subpopulações de células: células tumorais hipóxicas e oxigenadas (Martel; Guedes; Keating, 2016). Christofk et al. (2008) demonstraram que as células hipóxicas produzem piruvato, precursor do lactato. O lactato é exportado e usado por células tumorais oxigenadas presentes no microambiente tumoral, sendo reconvertido em piruvato e totalmente oxidado através do ciclo do ácido cítrico e da fosforilação oxidativa (Martel; Guedes; Keating, 2016). A produção de lactato em células tumorais hipóxicas é favorecida devido a inativação da enzima piruvato desidrogenase, levando a um desacoplamento entre a glicólise e o ciclo do ácido cítrico (Martel; Guedes; Keating, 2016). Dessa forma, os tumores são simbioses metabólicas pelos quais as células tumorais hipóxicas e oxigenadas regulam mutuamente o acesso aos metabólitos energéticos (Martel; Guedes; Keating, 2016).

O complexo HIF1 é um fator de transcrição ubiquamente expresso responsável por mudanças na expressão gênica durante a resposta a pouco oxigênio (Engin, 2017; Li *et al.*, 2019). Além de sua estabilização em condições hipóxicas, o HIF1 também pode ser ativado em condições normóxicas por vias de sinalização oncogênicas (Engin, 2017; Li *et al.*, 2019).

Existem numerosos reguladores, positivos e negativos, que têm um impacto significativo na expressão de genes relacionados às defesas antioxidantes (Gorrini; Harris; Mak, 2013). Compreender as vias específicas que são afetadas por esses controladores é essencial para abordagens sobre como modular os níveis de ROS (Gorrini; Harris; Mak, 2013).

Um importante fator de transcrição nesse contexto chama-se fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2 (Nrf2), amplamente ativado em resposta a estímulos redox, que protege contra o estresse oxidativo ao induzir a transcrição de genes que expressam elementos envolvidos em processos antioxidantes por meio da ligação com um local específico do DNA, o qual é denominado *Antioxidant Responsive Element* (ARE) (Rushmore; Morton; Pickett, 1991). Tem o potencial de ser um alvo para intervir em uma variedade de doenças, tais como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, pulmonares e inflamatórias crônicas (Rushmore; Morton; Pickett, 1991; Singh *et al.*, 2010).

Indiscutivelmente, o Nrf2 é o mais importante regulador da expressão de moléculas que têm funções antioxidantes dentro da célula (Zhu *et al.*, 2016). Sob condições de repouso, esse fator de transcrição é degradado constitutivamente pelo complexo de ligase 1 (KEAP1) - Cullina 3 (CUL3) E3 associada a ECH (Zhu *et al.*, 2016). Sob condições de estresse oxidativo, a KEAP1 é oxidada e modificada para não se ligar ao Nrf2, levando à sua estabilização e translocação para o núcleo (Zhu *et al.*, 2016). Além disso, é o único fator que possibilita a transcrição das enzimas responsáveis pela produção de GSH, impulsionando a expressão das duas subunidades que compõem o complexo glutamato-cisteína-ligase (GCL) (Zhu *et al.*, 2016).

O Nrf2 também induz a expressão do transportador de cistina / glutamato XCT. Em troca do glutamato, o XCT importa a cistina, importante na produção de GSH, para dentro da célula (Gorrini; Harris; Mak, 2013). Ocorre a redução de cistina à cisteína dentro da célula, e dessa forma pode ser encontrada como selenocisteína e incorporada nos centros catalíticos ativos de enzimas antioxidantes, como GPx (Gorrini; Harris; Mak, 2013). A XCT tem sido implicada como uma enzima chave que suporta o desenvolvimento de tumores pois é estabilizada pelo CD44, um antígeno associado ao tumor expresso na superfície celular que também é encontrado em células com potencial de iniciar tumores (Gorrini; Harris; Mak, 2013).

Embora conhecidos principalmente como indutores de parada do ciclo celular e morte celular, a família de fatores de transcrição FOXO (*forkhead box O*) e o supressor de tumor p53 desempenham um papel importante na prevenção do estresse oxidativo por induzirem expressão gênica antioxidante (Gorrini; Harris; Mak, 2013).

O gene da suscetibilidade ao CM 1 (*BRCA1*) mostrou-se relacionado ao controle do estado redox (Gorrini; Harris; Mak, 2013). A modulação *in vitro* dos níveis de *BRCA1* controla a expressão de vários genes antioxidantes regulados por Nrf2 e reduz o dano ao DNA induzido por H₂O₂ e a apoptose (Gorrini; Harris; Mak, 2013). A capacidade do *BRCA1* de regular positivamente o Nrf2 tem consequências importantes para a sua função de supressão de tumor específica do tecido, e as células deficientes em *BRCA1* sofrem de elevados níveis de ROS devido a uma resposta ineficiente do Nrf2 (Gorrini; Harris; Mak, 2013).

ROS como H₂O₂ podem oxidar o resíduo cisteína de proteínas (por

exemplo, proteínas tirosina fosfatases, proteínas tirosina quinases e proteínas quinases C), ativando assim a cascata de quinases à diante (por exemplo, proteínas quinase ativadas por mitógeno, MAPKs), atuando como um transdutor de sinal (Roberts; Der, 2007; Janssen-Heininger *et al.*, 2008; Kalyanaraman *et al.*, 2018). Uma das vias de MAPK mais estudadas é a via de sinalização das quinases reguladas por sinalização extracelular 1 e 2 (ERK1/2), a qual quando ativada regula sobrevivência, proliferação e metástase do câncer (Roberts; Der, 2007). Mutações nos genes que codificam RAS e RAF modulam o desenvolvimento do câncer através do eixo RAS- RAF-MEK-ERK quinases (Fortini; Simon; Rubin, 1992; Roberts; Der, 2007; Kalyanaraman *et al.*, 2018).

Adicionalmente, a via de sinalização fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) é uma das mais comumente hiperativadas no câncer (Kalyanaraman *et al.*, 2018). Essa via é ativada por mutações em genes supressores de tumor, nos componentes do próprio complexo PI3K, por sinalização aberrante de receptores tirosino-quinases ou por sinalização desencadeada por H₂O₂ (Cairns; Harris; Mak, 2011; Kalyanaraman *et al.*, 2018). A sua ativação fornece sinais de proliferação e sobrevivência às células tumorais (Kalyanaraman *et al.*, 2018).

O PI3K ativado subsequentemente fosforila o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) que atua como uma molécula sinalizadora para recrutar a quinase-1 dependente de fosfoinositídeo (PDK1) e a proteína quinase B (PKB, também conhecida como Akt1) (Kalyanaraman *et al.*, 2018). A Akt1 é o efetor mais bem estudado da via, um importante direcionador do fenótipo glicolítico tumoral, o qual estimula a geração de ATP e aumenta assim a capacidade bioenergética para responder aos sinais de crescimento (Cairns; Harris; Mak, 2011).

A via PI3K/AKT/mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos) é frequentemente desregulada durante a tumorigênese, por alterações genéticas e epigenéticas, contribuindo para o desenvolvimento e progressão do CM (Sabine *et al.*, 2010).

O transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) é um importante fator de transcrição hiperativado em CM que regula os processos celulares envolvidos na proliferação, desenvolvimento, inflamação e sobrevivência celular (Watson; Miller, 1995; Lee *et al.*, 2019). Em resposta a estímulos extracelulares, como citocinas e fatores de crescimento, o STAT3 é recrutado do citosol para seus receptores e

ativado por Janus quinases associadas ao receptor (JAKs) (Watson; Miller, 1995). A fosforilação no resíduo de tirosina 705 facilita a formação de um dímero STAT3 que se transloca para o núcleo e passa a transcrever genes alvo responsáveis pela progressão do ciclo celular, como Ciclina D1 e c-Myc, bem como genes envolvidos na sobrevivência celular (Hsieh; Cheng; Lin, 2005). Notavelmente, o aumento da fosforilação de STAT3^{Y705} está associado à metástases no CM (Hsieh; Cheng; Lin, 2005).

Entretanto, existem dados convincentes que demonstram que os oxidantes, como H₂O₂, são moléculas sinalizadoras em ambientes fisiológicos e em homeostase, com importantes funções reguladoras que controlam a divisão celular, migração, contração e produção de mediadores (Janssen-Heininger *et al.*, 2008; Winterbourn; Hampton, 2008). Estas funções fisiológicas são realizadas de maneira primorosamente regulada e compartimentada, através de sutis eventos oxidativos (Janssen-Heininger *et al.*, 2008; Winterbourn; Hampton, 2008).

Por fim, a regulação redox no câncer é dependente do contexto e do microambiente, podendo sofrer alterações quando as células neoplásicas estão na corrente sanguínea, por exemplo. Assim, como essas vias de sinalização são alvos de tratamentos antineoplásicos, é importante o desenvolvimento de novas abordagens para o monitoramento de resposta ao tratamento e consequente prognóstico de mulheres com CM.

I.V Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) é um tipo de espectroscopia vibracional que envolve o estudo da interação da radiação infravermelha com a matéria, medindo transições entre níveis de energia molecular vibracional como resultado da absorção da radiação infravermelha média (Larkin, 2011).

Para que uma molécula absorva a luz infravermelha, seu momento de dipolo elétrico deve mudar durante a vibração, tornando-a ativa (Pavia *et al.*, 2010). O eixo x dos espectros infravermelhos é normalmente expresso em números de onda (cm⁻¹), o inverso do comprimento de onda da radiação infravermelha ($\nu = 1/\lambda$) (Movasaghi; Rehman; Ur Rehman, 2008; Pavia *et al.*, 2010).

Como os níveis de energia vibracional são únicos para cada molécula, os espectros de FTIR fornecem uma “impressão digital” de uma amostra específica (Larkin, 2011; Mamede *et al.*, 2021). As frequências dessas vibrações moleculares dependem das massas dos átomos, de seu arranjo geométrico e da força de suas ligações químicas (Larkin, 2011). Além disso, é uma técnica altamente sensível, detectando mudanças de até 0,002% na força da ligação (Barth, 2007).

Os grupos funcionais, quando absorvem a radiação infravermelha, podem vibrar de várias maneiras: estiramento, uma mudança no comprimento da ligação; dobramento, uma mudança no ângulo da ligação; deformação, conhecidos como *scissoring*, *wagging* e *twisting*; ou vibrações combinadas (Stuart, 2004; Pavia *et al.*, 2010). Adicionalmente, algumas ligações podem esticar ou dobrar em fase (alongamento simétrico) ou fora de fase (alongamento assimétrico) (Stuart, 2004). Em geral, vibrações de estiramento assimétrico ocorrem em frequências mais altas do que vibrações de estiramento simétrico; e vibrações de estiramento ocorrem em frequências mais altas do que vibrações de dobramento (Pavia *et al.*, 2010).

O espectro da região infravermelha é convencionalmente dividido em três partes: região do infravermelho próximo, de 13.000 a 4.000 cm^{-1} ; região do infravermelho médio, de 4.000 a 400 cm^{-1} (principal região para estudo de biomoléculas); e região do infravermelho distante, aproximadamente de 400 a 10 cm^{-1} (Stuart, 2004).

A região do infravermelho médio pode ser dividida em quatro regiões: região de estiramento X–H (4.000–2.500 cm^{-1}); região de ligação tripla (2.500–2.000 cm^{-1}); região de ligação dupla (2.000–1.500 cm^{-1}); e região de impressão digital (1.500– 600 cm^{-1}) (Stuart, 2004).

Um acessório de Refletância Total Atenuada (ATR) pode ser adicionado ao método, passando a ser denominado ATR-FTIR (Larkin, 2011). Essa abordagem envolve um cristal com alto índice de refração e excelentes propriedades de transmissão de infravermelho (preferencialmente diamante), acoplado de forma que o ângulo de incidência seja maior que o ângulo crítico (Larkin, 2011; Clemens *et al.*, 2014). A amostra é colocada em contato direto com o cristal, que devido a diferença de refração induz a reflexão total interna da radiação incidente, a qual é atenuada e penetra na amostra como uma onda evanescente (Clemens *et al.*, 2014). Essa onda evanescente é então alterada e devolvida ao detector no espectrômetro FTIR,

forneendo um espectro único, que representa o sinal médio da área da amostra pela qual a luz passou (Clemens *et al.*, 2014). Assim, o ATR-FTIR é uma ferramenta simples, rápida, que demanda pouca quantidade de amostra, permite estudo de mudanças bioquímicas em nível molecular, não utiliza reagentes nem precisa de preparo de amostra (Clemens *et al.*, 2014).

Ao longo dos últimos anos, diversos estudos têm empregado o FTIR para análise de amostras de CM (Mamede *et al.*, 2021), desde linhagens celulares (Bi *et al.*, 2007; Mostaço-Guidolin *et al.*, 2010) até tecido (Tian *et al.*, 2015; Tian; Zhang, 2015; Lu *et al.*, 2020; Tang; Kurfürstová; Gardner, 2021), sangue (Zelig *et al.*, 2015; Depciuch *et al.*, 2016; Elmi *et al.*, 2017; Sitnikova *et al.*, 2020; Kepesidis *et al.*, 2021) e saliva (Ferreira *et al.*, 2020).

Por fim, é importante destacar que os dados vibracionais necessitam de um extenso trabalho de pré-processamento, processamento e análise, o que pode ser mais demorado do que a aquisição dos próprios dados (Mamede *et al.*, 2021). A inteligência artificial surge como uma aliada na análise dos dados gerados por FTIR, possibilitando uma rápida organização de padrões que discriminam os grupos de amostras estudados (Kourou *et al.*, 2015). Assim, o aprendizado de máquina gera automaticamente modelos que podem ser utilizados para classificação ou predição dos dados para fins diagnósticos, prognósticos e de monitoramento do CM (Kourou *et al.*, 2015).

Referências

- AKAGAWA, Mitsugu. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. **Free Radical Research**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 307-320, 2021. <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1851027>
- AYDINER, Adnan; IGCI, Abdullah; SORAN, Atilla (org.). **Breast Cancer: A Guide to Clinical Practice**. Cham: Springer International Publishing, 2019. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-96947-3>. Acesso em: 28 nov. 2023. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-96947-3>
- BARTH, Andreas. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, [s. l.], v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
- BAZIRA, Peter J.; ELLIS, Harold; MAHADEVAN, Vishy. Anatomy and physiology of the breast. **Surgery (Oxford)**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 79-83, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.11.015>
- BELL, Eric L.; CHANDEL, Navdeep S. Mitochondrial oxygen sensing: regulation of hypoxia-inducible factor by mitochondrial generated reactive oxygen species. **Essays in Biochemistry**, [s. l.], v. 43, p. 17-28, 2007. <https://doi.org/10.1042/bse0430017>
- BENZIE, Iris F.F.; DEVAKI, Malegaddi. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. In: APAK, Resat; CAPANOGLU, Esra; SHAHIDI, Fereidoon (org.). **Measurement of Antioxidant Activity & Capacity**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 77-106. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119135388.ch5>. Acesso em: 19 jan. 2022. <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch5>
- BI, Xinhui *et al.* Infrared Spectral Analysis of MCF-7 Cells Treated with Serum-Lipid Extracts Segregates Predominantly Brominated Flame Retardant-Exposed Subjects from Those with Mainly Organochlorine Exposures. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 41, n. 16, p. 5915-5922, 2007. <https://doi.org/10.1021/es070539y>
- BISTONI, Giovanni; FARHADI, Jian. Anatomy and physiology of the breast. In: FARHADIEH, Ross D.; BULSTRODE, Neil W.; CUGNO, Sabrina (org.). **Plastic and reconstructive surgery**. 1. ed. [S. l.]: Wiley, 2015. p. 477-485. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118655412.ch37>. Acesso em: 19 dez. 2023. <https://doi.org/10.1002/9781118655412.ch37>
- BOURGONJE, Arno R. *et al.* Serum free sulfhydryl status associates with new-onset chronic kidney disease in the general population. **Redox Biology**, [s. l.], v. 48, p. 102211, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102211>
- BRASIL. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2017.
- BRASIL. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2023.
- BRAVO, Roberto *et al.* Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 44, n.

1, p. 16-20, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.012>

BUJOK, Jolanta *et al.* Applicability of FTIR-ATR Method to Measure Carbonyls in Blood Plasma after Physical and Mental Stress. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2019, p. 1-9, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2181370>

CAIRNS, Rob A.; HARRIS, Isaac S.; MAK, Tak W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 85-95, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrc2981>

CHANDEL, N. S. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 95, n. 20, p. 11715-11720, 1998. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.11715>

CHRISTOFK, Heather R. *et al.* Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. **Nature**, [s. l.], v. 452, n. 7184, p. 181-186, 2008. <https://doi.org/10.1038/nature06667>

CLEMENS, Graeme *et al.* Vibrational spectroscopic methods for cytology and cellular research. **The Analyst**, [s. l.], v. 139, n. 18, p. 4411-4444, 2014. <https://doi.org/10.1039/C4AN00636D>

DADA, Rima. Oxidative stress Major executioner in disease pathology role in sperm DNA damage and preventive strategies. **Frontiers in Bioscience**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 420-447, 2017. <https://doi.org/10.2741/s495>

DALLE-DONNE, Isabella *et al.* Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 329, n. 1-2, p. 23-38, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2)

DEPCIUCH, Joanna *et al.* Phospholipid-protein balance in affective disorders: Analysis of human blood serum using Raman and FTIR spectroscopy. A pilot study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 131, p. 287-296, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.08.037>

DESANTIS, Carol E. *et al.* Breast cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 438-451, 2019. <https://doi.org/10.3322/caac.21583>

DEVI, Gayathri R. *et al.* The Role of Oxidative Stress in Breast Cancer. *In*: **CANCER**. [S. l.]: Elsevier, 2014. p. 3-14. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124052055000015>. Acesso em: 15 dez. 2023. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405205-5.00001-5>

DIRICAN, Nigar *et al.* Thiol/disulfide homeostasis: A prognostic biomarker for patients with advanced non-small cell lung cancer?. **Redox Report**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 197-203, 2016. <https://doi.org/10.1179/1351000215Y.0000000027>

EDGE, Stephen B.; HORTOBAGYI, Gabriel N.; GIULIANO, Armando E. New and important changes in breast cancer TNM: incorporation of biologic factors into staging. **Expert Review of Anticancer Therapy**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 309-318, 2019. <https://doi.org/10.1080/14737140.2019.1582335>

ELMI, Fatemeh *et al.* Application of FT-IR spectroscopy on breast cancer serum analysis. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 187, p. 87-91, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.06.021>

ELSTON, E W; ELLIS, I O. Method for grading breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 189-190, 1993. <https://doi.org/10.1136/jcp.46.2.189-b>

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long- term follow-up. **Histopathology**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 403-410, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>

ENGİN, Atilla. Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors. *In*: ENGIN, Ayse Basak; ENGIN, Atilla (org.). **Obesity and Lipotoxicity**. Cham: Springer International Publishing, 2017. (Advances in Experimental Medicine and Biology). v. 960, p. 571-606. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-48382-5_25. Acesso em: 18 dez. 2023. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_25

EROLE, Pilar *et al*. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 698-707, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>

FADLELMOULA, Ahmed *et al*. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Analyse Human Blood over the Last 20 Years: A Review towards Lab-on-a-Chip Devices. **Micromachines**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 187, 2022. <https://doi.org/10.3390/mi13020187>

FERRARIO, Cristiano *et al*. Novel Therapies for the Treatment of HER2-Positive Advanced Breast Cancer: A Canadian Perspective. **Current Oncology**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 2720-2734, 2022. <https://doi.org/10.3390/curroncol29040222>

FERREIRA, Izabella C. C. *et al*. Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. **Journal of Oncology**, [s. l.], v. 2020, p. 1-11, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4343590>

FIASCHI, Tania; CHIARUGI, Paola. Oxidative Stress, Tumor Microenvironment, and Metabolic Reprogramming: A Diabolic Liaison. **International Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 2012, p. 1-8, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/762825>

FINICELLI, Mauro *et al*. The Mediterranean Diet: An Update of the Clinical Trials. **Nutrients**, [s. l.], v. 14, n. 14, p. 2956, 2022. <https://doi.org/10.3390/nu14142956>

FORTINI, Mark E.; SIMON, Michael A.; RUBIN, Gerald M. Signalling by the sevenless protein tyrosine kinase is mimicked by Ras activation. **Nature**, [s. l.], v. 355, n. 6360, p. 559- 561, 1992. <https://doi.org/10.1038/355559a0>

GALADARI, Sehamuddin *et al*. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress?. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 104, p. 144-164, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004>

GÀO, Xīn *et al*. Serum total thiol levels and the risk of lung, colorectal, breast and prostate cancer: A prospective case-cohort study. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 146, n. 5, p. 1261-1267, 2020. <https://doi.org/10.1002/ijc.32428>

GIULIANO, Armando E. *et al*. Breast Cancer—Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 67, n. 4, p. 290-303, 2017. <https://doi.org/10.3322/caac.21393>

GOLDHIRSCH, A. *et al*. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer:

- highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 1736-1747, 2011. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr304>
- GORRINI, Chiara; HARRIS, Isaac S.; MAK, Tak W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 931- 947, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrd4002>
- GSCHWIND, Andreas; FISCHER, Oliver M.; ULLRICH, Axel. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. 361-370, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrc1360>
- HAIDA, Zainol; HAKIMAN, Mansor. A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. **Food Science & Nutrition**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 1555-1563, 2019. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1012>
- HANAHAN, Douglas. Rethinking the war on cancer. **The Lancet**, [s. l.], v. 383, n. 9916, p. 558-563, 2014. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62226-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62226-6)
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000. <https://doi.org/10.1159/000028460>
- HANSEN, Rosa E.; ROTH, Doris; WINTHER, Jakob R. Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 106, n. 2, p. 422-427, 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812149106>
- HE, Chunyan *et al.* A prospective study of genetic polymorphism in MPO, antioxidant status, and breast cancer risk. **Breast Cancer Research and Treatment**, [s. l.], v. 113, n. 3, p. 585- 594, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-9962-z>
- HECHT, Fabio *et al.* The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. **Tumor Biology**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 4281-4291, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4873-9>
- HSIEH, Fu-Chuan; CHENG, Gong; LIN, Jiayuh. Evaluation of potential Stat3- regulated genes in human breast cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 335, n. 2, p. 292-299, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.075>
- HUI, David *et al.* Prognostication in advanced cancer: update and directions for future research. **Supportive Care in Cancer**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 1973-1984, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00520-019-04727-y>
- INOUE, Minoru *et al.* Plasma redox imbalance caused by albumin oxidation promotes lung-predominant NETosis and pulmonary cancer metastasis. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 5116, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07550-x>
- ISHII, Takeshi *et al.* Structural characteristics of green tea catechins for formation of protein carbonyl in human serum albumin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 14, p. 4892-4896, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.06.021>

JANSSEN-HEININGER, Yvonne M.W. *et al.* Redox-based regulation of signal transduction: Principles, pitfalls, and promises. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 1-17, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.011>

JOMOVA, Klaudia *et al.* Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 97, n. 10, p. 2499-2574, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9>

KALYANARAMAN, Balaraman *et al.* Teaching the basics of reactive oxygen species and their relevance to cancer biology: Mitochondrial reactive oxygen species detection, redox signaling, and targeted therapies. **Redox Biology**, [s. l.], v. 15, p. 347-362, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.12.012>

KEPESIDIS, Kosmas V. *et al.* Breast-cancer detection using blood-based infrared molecular fingerprints. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1287, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-09017-7>

KINCAID, Margaret M.; COOPER, Antony A. ERADicate ER Stress or Die Trying. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 2373-2387, 2007.

KOUROU, Konstantina *et al.* Machine learning applications in cancer prognosis and prediction. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 13, p. 8-17, 2015. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1817>

KRISHNAN, Monica *et al.* Predicting life expectancy in patients with advanced incurable cancer: a review. **Journal of Supportive Oncology**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 68-74, 2013. <https://doi.org/10.12788/j.suponc.0004>

LAMBERT, Arthur W.; PATTABIRAMAN, Diwakar R.; WEINBERG, Robert A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, [s. l.], v. 168, n. 4, p. 670-691, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>

LARKIN, Peter. Introduction. *In*: INFRARED AND RAMAN SPECTROSCOPY. [S. l.]: Elsevier, 2011. p. -5. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123869845100011>. Acesso em: 6 out. 2023.

LEE, Eun Ji *et al.* 15-Keto prostaglandin E2 suppresses STAT3 signaling and inhibits breast cancer cell growth and progression. **Redox Biology**, [s. l.], v. 23, p. 101175, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101175>

LEE, Jasmine D. *et al.* The Role of Biomarkers of Oxidative Stress in Breast Cancer Risk and Prognosis: A Systematic Review of the Epidemiologic Literature. **Journal of Women's Health**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 467-482, 2017. <https://doi.org/10.1089/jwh.2016.5973>

LI, Jiehua *et al.* Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer. [s. l.], v. 7, 2015.

LI, Hong-Sheng *et al.* HIF-1 α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria. **Redox Biology**, [s. l.], v. 25, p. 101109, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101109>

LI, Zhuo *et al.* The Role of Progesterone Receptors in Breast Cancer. **Drug Design, Development and Therapy**, [s. l.], v. Volume 16, p. 305-314, 2022. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S336643>

- LU, Yanfei *et al.* In situ research and diagnosis of breast cancer by using HOF-ATR- FTIR spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 235, p. 118178, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118178>
- LUKONG, Kiven Erique. Understanding breast cancer - The long and winding road. **BBA Clinical**, [s. l.], v. 7, p. 64-77, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbcli.2017.01.001>
- MAHALINGAIAH, Prathap Kumar S.; SINGH, Kamaleshwar P. Chronic Oxidative Stress Increases Growth and Tumorigenic Potential of MCF-7 Breast Cancer Cells. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. e87371, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087371>
- MAMEDE, Adriana P. *et al.* A New Look into Cancer—A Review on the Contribution of Vibrational Spectroscopy on Early Diagnosis and Surgery Guidance. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 21, p. 5336, 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13215336>
- MARTEL, F.; GUEDES, M.; KEATING, E. Effect of polyphenols on glucose and lactate transport by breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, [s. l.], v. 157, n. 1, p. 1-11, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3794-z>
- MEISTER, Alton. On the discovery of glutathione. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 185-188, 1988. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(88\)90148-X](https://doi.org/10.1016/0968-0004(88)90148-X)
- MILTENBURG, Darlene M.; SPEIGHTS, V.O. Benign Breast Disease. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 285-300, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2008.03.008>
- MOHAMMED, Hisham *et al.* Progesterone receptor modulates ER α action in breast cancer. **Nature**, [s. l.], v. 523, n. 7560, p. 313-317, 2015. <https://doi.org/10.1038/nature14583>
- MOSTAÇO-GUIDOLIN, Leila Büttner *et al.* Molecular and chemical characterization by Fourier transform infrared spectroscopy of human breast cancer cells with estrogen receptor expressed and not expressed. **Spectroscopy**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 501-510, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/498719>
- MOVASAGHI, Zanyar; REHMAN, Shazza; UR REHMAN, Dr. Ihtesham. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 134-179, 2008. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>
- NAGY, Péter; WINTERBOURN, Christine C. Redox Chemistry of Biological Thiols. *In: ADVANCES IN MOLECULAR TOXICOLOGY*. [S. l.]: Elsevier, 2010. v. 4, p. 183-222. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872085410040063>. Acesso em: 17 dez. 2023.
- NAZAREWICZ, Rafal R. *et al.* Effect of Short-Term Ketogenic Diet on Redox Status of Human Blood. **Rejuvenation Research**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 435-440, 2007. <https://doi.org/10.1089/rej.2007.0540>
- NETO, José Soares Ferreira; HEINEMANN, Marcos Bryan. **Dicionário de Epidemiologia, Saúde Pública e Zoonoses**. *In: [S. l.: s. n.]*, 2016. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/mod/glossary/showentry.php?eid=12118>. Acesso em: 15 dez. 2023.
- NIMSE, Satish Balasaheb; PAL, Dilipkumar. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 35, p. 27986-28006, 2015.

<https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>

OBERLEY, Larry W. Free radicals and diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 113-124, 1988. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(88\)90036-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(88)90036-6)

PAVIA, Donald *et al.* **Introdução a Espectoscopia**. 4. ed. [S. l.]: Cengage Learning, 2010.

PEARLMAN, Mark D.; GRIFFIN, Jennifer L. Benign Breast Disease. **Obstetrics & Gynecology**, [s. l.], v. 116, n. 3, p. 747-758, 2010. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e3181ee9fc7>

PICCART-GEBHART, Martine J *et al.* Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], 2005.

PLICHTA, Jennifer K. *et al.* Novel Prognostic Staging System for Patients With De Novo Metastatic Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 41, n. 14, p. 2546-2560, 2023. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.02222>

QIAN, Lin *et al.* Cancer metabolism and dietary interventions. **Cancer Biology & Medicine**, [s. l.], 2021. Disponível em: <http://www.cancerbiomed.org/lookup/doi/10.20892/j.issn.2095-3941.2021.0461>. Acesso em: 28 nov. 2023. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2021.0461>

ROBERTS, P J; DER, C J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. **Oncogene**, [s. l.], v. 26, n. 22, p. 3291- 3310, 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210422>

RUSHMORE, T.H.; MORTON, M.R.; PICKETT, C.B. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 266, n. 18, p. 11632-11639, 1991. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99004-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99004-6)

SABINE, Vicky S. *et al.* Gene expression profiling of response to mTOR inhibitor everolimus in pre-operatively treated post-menopausal women with oestrogen receptor-positive breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, [s. l.], v. 122, n. 2, p. 419-428, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0928-6>

SAHOO, Sunati *et al.* Standardizing Pathologic Evaluation of Breast Carcinoma After Neoadjuvant Chemotherapy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 147, n. 5, p. 591-603, 2022.

SANTOS, Letícia L. D. *et al.* Overweight Women with Breast Cancer on Chemotherapy Have More Unfavorable Inflammatory and Oxidative Stress Profiles. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 3303, 2020. <https://doi.org/10.3390/nu12113303>

SEMENZA, Gregg L. Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 365, n. 6, p. 537-547, 2011. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1011165>

SENER, Melahat Uzel *et al.* Evaluation of Thiol/Disulfide Homeostasis in Lung Cancer. **Turkish Thoracic Journal**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 255-260, 2020.

SHERMAN, Mark E. *et al.* Benign Breast Disease and Breast Cancer Risk in the Percutaneous Biopsy Era. **JAMA Surgery**, [s. l.], 2023. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jamasurgery/fullarticle/2813028>. Acesso em: 19 dez.

2023.

SINGH, Shruti *et al.* Nrf2-ARE stress response mechanism: A control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. **Free Radical Research**, [s. l.], v. 44, n. 11, p. 1267-1288, 2010. <https://doi.org/10.3109/10715762.2010.507670>

SITNIKOVA, Vera E. *et al.* Breast cancer detection by ATR-FTIR spectroscopy of blood serum and multivariate data-analysis. **Talanta**, [s. l.], v. 214, p. 120857, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120857>

SKOUROLIAKOU, Maria *et al.* Serum antioxidant capacity, biochemical profile and body composition of breast cancer survivors in a randomized Mediterranean dietary intervention study. **European Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 57, n. 6, p. 2133-2145, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1489-9>

SLAMON, Dennis J; CLARK, Gary M; WONG, Steven G. Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**, [s. l.], v. 235, 1987. <https://doi.org/10.1126/science.3798106>

SMITH, Colleen *et al.* **Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach**. 2. eded. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, [s. l.], v. 25, n. 3-4, p. 207-218, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0011-2>

STIVAL, Rebecca Saray Marchesini; PRESTES, Ana Lúcia De Oliveira; MANSANI, Fábio Postiglione. Câncer de mama em mulheres jovens: uma análise do estadiamento clínico inicial e dos subtipos moleculares dos tumores. **Revista Brasileira de Mastologia**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 17-22, 2014. <https://doi.org/10.5327/Z201400010004RBM>

STUART, Barbara H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. 1. ed. [S. l.]: Wiley, 2004. (Analytical Techniques in the Sciences). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0470011149>. Acesso em: 11 out. 2022. <https://doi.org/10.1002/0470011149>

SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

SWIERCZYNSKI, Julian. Role of abnormal lipid metabolism in development, progression, diagnosis and therapy of pancreatic cancer. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 2279, 2014. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i9.2279>

TANG, Xiaohu *et al.* A joint analysis of metabolomics and genetics of breast cancer. **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 415, 2014.

TANG, Jiayi; KURFÜRSTOVÁ, Daniela; GARDNER, Peter. Breast cancer detection using infrared spectral pathology from H&E stained tissue on glass slides. **Clinical Spectroscopy**, [s. l.], v. 3, p. 100008, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.clispe.2021.100008>

TIAN, P *et al.* Intraoperative detection of sentinel lymph node metastases in breast carcinoma by Fourier transform infrared spectroscopy. **British Journal of Surgery**, [s. l.], v. 102, n. 11, p. 1372-1379, 2015. <https://doi.org/10.1002/bjs.9882>

TIAN, Peirong; ZHANG, Weitao. Intraoperative diagnosis of benign and malignant breast tissues by fourier transform infrared spectroscopy and support vector machine classification. [s. l.], 2015. <https://doi.org/10.1002/bjs.9882>

TURELL, Lucía; RADI, Rafael; ALVAREZ, Beatriz. The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 65, p. 244-253, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.050>

ULRICH, Kathrin; JAKOB, Ursula. The role of thiols in antioxidant systems. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 140, p. 14-27, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035>

WAGNER, Johanna *et al.* A Single-Cell Atlas of the Tumor and Immune Ecosystem of Human Breast Cancer. **Cell**, [s. l.], v. 177, n. 5, p. 1330-1345.e18, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.005>

WALZ, Dieter. Thermodynamics of oxidation-reduction reactions and its application to bioenergetics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics**, [s. l.], v. 505, n. 3-4, p. 279-353, 1979. [https://doi.org/10.1016/0304-4173\(79\)90007-7](https://doi.org/10.1016/0304-4173(79)90007-7)

WATSON, Cj; MILLER, Wr. Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 840-844, 1995. <https://doi.org/10.1038/bjc.1995.162>

WINTERBOURN, Christine C.; HAMPTON, Mark B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 549-561, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004>

XING, Faliang *et al.* The Relationship of Redox With Hallmarks of Cancer: The Importance of Homeostasis and Context. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 12, p. 862743, 2022. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.862743>

YOU, Jueng Soo; JONES, Peter A. Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin?. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 9-20, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.008>

ZELIG, Udi *et al.* Early detection of breast cancer using total biochemical analysis of peripheral blood components: a preliminary study. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 408, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1414-7>

ZHONG, Y.; SHAHIDI, F. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods¹¹This chapter is reproduced to a large extent from an article in press by the authors in the Journal of Functional Foods. *In: HANDBOOK OF ANTIOXIDANTS FOR FOOD PRESERVATION*. [S. l.]: Elsevier, 2015. p. 287-333. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781782420897000129>. Acesso em: 25 ago. 2023. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-089-7.00012-9>

ZHU, Jiayu *et al.* An overview of chemical inhibitors of the Nrf2-ARE signaling pathway and their potential applications in cancer therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 99, p. 544-556, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.010>

II. Capítulo II

Communication

A Lower Serum Antioxidant Capacity as a Distinctive Feature for Women with HER2+ Breast Cancer: A Preliminary Study

Letícia L. D. Santos ^{1,2} , Alinne T. F. Silva ^{1,2} , Izabella C. C. Ferreira ^{1,2} , Adriele V. Souza ³,
Allisson B. Justino ³ , Donizeti W. Santos ⁴, Luiz Ricardo Goulart ¹ , Carlos Eduardo Paiva ⁵ ,
Foued S. Espíndola ³  and Yara C. P. Maia ^{1,2,*} 

¹ Laboratory of Nanobiotechnology Luiz Ricardo Goulart Filho, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia 38402-022, Brazil

² Molecular Biology and Nutrition Research Group (BioNut), School of Medicine, Federal University of Uberlandia, Uberlandia 38405-320, Brazil

³ Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia 38405-302, Brazil

⁴ Gynecologic Division, University Hospital, Federal University of Uberlandia, Uberlandia 38405-320, Brazil

⁵ Palliative Care and Quality of Life Research Group (GPQual), Learning and Research Institute, Barretos Cancer Hospital, Barretos 14784-400, Brazil

* Correspondence: yara.maia@ufu.br

Simple Summary: HER2 overexpression in breast tumors serves as a biomarker of aggressive cancer and a poor prognosis. This protein contributes to redox imbalance in the pro-oxidative sense. The study aimed to investigate the infrared spectrum wavenumbers obtained by ATR-FTIR and their relationship with the levels of blood redox status markers. Our results indicate that HER2+ Breast Cancer (BC) cases could be distinguished from HER2− BC and benign breast disease (BBD) cases by their lower serum antioxidant capacity. These unprecedented findings allowed us to assess biochemical changes that occur before clinical signs and allowed us to monitor the tumor. Thus, these data advance knowledge about changes revealed by ATR-FTIR and the lower serum antioxidant capacity, showing our preliminary distinctive feature of these HER2+ molecular subtypes. This research should be extended to a larger sample population.

Abstract: The overexpression of HER2 in breast cancer (BC) can contribute to redox imbalance, which is related to damage and structural modification in many biomolecules. To the best of our knowledge, this is the first study that has investigated the infrared spectrum wavenumbers obtained by ATR-FTIR and their relationship with the levels of redox status markers such as reduced glutathione, superoxide dismutase (SOD), catalase, Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), and protein carbonyl among women with HER2+ BC, HER2− BC, and benign breast disease (BBD). The study was conducted with 25 women, 17 of whom were diagnosed with BC (6 HER2+ and 11 HER2−) and 8 with BBD. Our results indicate HER2+ BC cases could be distinguished from HER2− BC and BBD cases by their serum's antioxidant capacity [HER2+ BC vs. HER2− BC (AUC = 0.818; specificity = 81.82%; sensitivity = 66.67%); HER2+ BC vs. BBD (AUC = 0.875; specificity = 75%; sensitivity = 83.33%)]. The changes in biochemical terms that occur in serum as a result of the scarcity of antioxidants are related to a peculiar fingerprint in the infrared spectrum obtained by ATR-FTIR. In the serum of women with BBD, the SOD enzyme level is the highest, and this characteristic allowed us to distinguish them from HER2− BC. Finally, data regarding the serological antioxidant capacity of FRAP and the infrared spectrum by ATR-FTIR will allow us to assess biochemical changes that occur before clinical signs, indicating whether changes in therapy or interventions are necessary.

Keywords: breast cancer; HER2; redox status markers; antioxidant capacity; FRAP; FTIR



Citation: Santos, L.L.D.; Silva, A.T.F.; Ferreira, I.C.C.; Souza, A.V.; Justino, A.B.; Santos, D.W.; Goulart, L.R.; Paiva, C.E.; Espíndola, F.S.; Maia, Y.C.P. A Lower Serum Antioxidant Capacity as a Distinctive Feature for Women with HER2+ Breast Cancer: A Preliminary Study. *Cancers* **2022**, *14*, 5973. <https://doi.org/10.3390/cancers14235973>

Academic Editor: Rita Rezzani

Received: 28 October 2022

Accepted: 29 November 2022

Published: 2 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Breast cancer (BC) is a highly heterogeneous disease. Studied worldwide, it is still a major public health problem and causes many deaths each year, with 3,025,471 (33.8% increase) new cases expected to be diagnosed in 2040 [1]. Molecular subtypes are used to determine the prognosis by understanding the disease, which is largely associated with cell receptors [2–4]. One of the cell receptors analyzed is the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), as its overexpression or amplification of its gene in breast tumors serves as a biomarker of aggressive cancer and a poor prognosis, which occurs in around 25% of cases [2,4,5].

HER2 overexpression can contribute to redox imbalance in the pro-oxidative sense, also known as oxidative stress, which is related to damage and structural modification in several cellular components, such as DNA, lipids, and proteins [6,7]. Oxidative stress is considered an important factor in developing various diseases, including neurodegenerative, retinal degenerative, type 2 diabetes, atherosclerosis, pulmonary fibrosis, and cancer [8–12].

Reactive oxygen species (ROS) are mainly comprised of neutral molecules (H_2O_2), radicals (hydroxyl radicals), and ions (superoxide), which are produced in greater quantity in BC [6,7]. Cells have natural defense systems against ROS that consist of antioxidants, molecules that inhibit or completely scavenge the action of ROS and protect organisms from oxidative damage [13].

Redox reactions are the basis of the energy-delivering processes in living organisms. The oxidation of a molecule affects its electronic density distribution, altering its vibrational spectrum [14]. The Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) is a vibrational spectroscopy technique that is sensitive to even a 0.002% change in bond strength, reflecting the chemical composition of a sample [13,14]. Thus, this approach can obtain a “biochemical signature of the tumor”, a critical factor for predicting a patient’s response to treatment [15,16].

Our study aimed to investigate the infrared spectrum wavenumbers obtained by ATR-FTIR and their relationship with the levels of redox status markers GSH, SOD, CAT, FRAP, and protein carbonyl among women with HER2+ BC, HER2– BC, and BBD. Our hypothesis is that women with HER2+ BC have a worse redox imbalance. To the best of our knowledge, this is the first study that has investigated infrared spectrum wavenumbers obtained by ATR-FTIR and their relationship to redox status among women with HER2+ BC, HER2– BC, and BBD.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design, Sample Size, and Eligibility Criteria

This study was conducted at a Clinical Hospital in Uberlandia, MG, Brazil, after approval by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Uberlandia (protocol 4.047.065), and all subjects provided written informed consent. The entire study was developed according to the standards of the Declaration of Helsinki and Resolution CNS 466/12.

Women who went to the Clinical Hospital to undergo breast surgery were invited to participate in the study as volunteers. After surgery and histopathological results, the tumors, tissues, and lesions found were classified according to histological type, staging, and status of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and HER2 receptors. HER2 overexpression was identified by 3+ immunohistochemistry or FISH test.

Cases of triple negative BC and cases with suspected or indeterminate cytopathological pattern of malignancy were excluded from the study. Figure 1 shows the number of women screened and enrolled during the study.

A posteriori power analysis was carried out using the G*Power software, version 3.1 (Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Germany). The analysis was based on a F-test linear multiple regression with an effect size f of 0.35, an alpha level of 0.15, and 1 tested predictor. Considering a total of 25 participants, the output parameter showed a power of 92% (post hoc: computer achieved power calculation) [17].

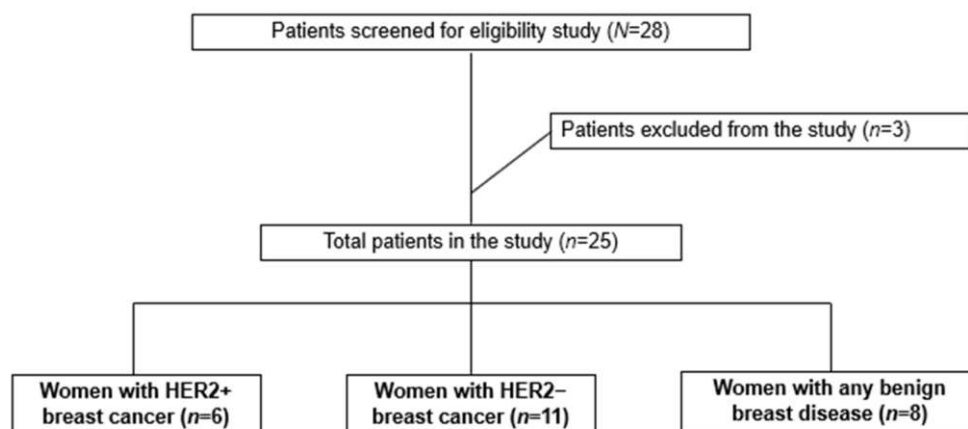


Figure 1. Study flowchart.

2.2. Data and Biological Material Collections

The data of the study were obtained from interviews and medical records.

With the volunteer's consent, 5 mL of peripheral blood was collected to obtain the infrared spectrum by ATR-FTIR and analysis of redox status biomarkers. A vacuum collection tube containing separating gel with a clot activator was used on this occasion, and the samples were processed as indicated by the manufacturer (KASVI®, São José dos Pinhais, PR, Brazil).

2.3. Infrared Spectrum Evaluation of Serum Samples by ATR-FTIR

Infrared spectroscopy was conducted with the ATR accessory Cary 630 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) using MicroLab (Agilent, Santa Clara, CA, USA) software version 5.7, an ATR micro component, crystal material in the ATR unit, and a platinum diamond. The samples were applied in aluminum pellets (10 µL) and heated to 80 °C in a dry bath for 3 min. The spectra were analyzed in the wavenumber region from 650 cm⁻¹ to 4000 cm⁻¹, with a resolution of 4 cm⁻¹.

2.4. Determination of Serum Redox Status Biomarkers

For the GSH (U/mg protein) quantification, serum samples were added to metaphosphoric acid (ratio 1:1) and the analysis was conducted as previously reported [18].

SOD (U/mg protein) activity analysis was conducted as previously reported [19].

CAT (U/mg protein) activity was determined based on monitoring the decomposition of H₂O₂ at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H₂O₂, 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), and 10 µL of the sample. The analysis was conducted as previously reported [20].

The serological non-enzymatic antioxidant capacity (µmol/L Trolox) was evaluated by the FRAP method. The antioxidants present in the samples reduce Fe³⁺ to Fe²⁺, which is chelated by 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) to form an Fe²⁺-TPTZ complex, which has an intense blue color. The analysis was conducted as previously reported [21].

To detect protein carbonyls (nmol/mg ptn) in serum, the samples were incubated with 10 mM DNPH in 2.5 N hydrochloric acid (HCl) in the dark for 1 h and then 20% trichloroacetic acid (TCA) was added. After two centrifugations at 9000 × *g* for 5 min, the pellet was resuspended in 6 M guanidine solubilized in 2.5 N HCl and heated at 37 °C for 5 min. The product formed was visualized at 370 nm [22].

2.5. Statistical Analysis

Statistical analyzes were conducted using the SPSS Program version 21.0 (IBM, New York, NY, USA) and Prism Program version 9.0 (Graphpad, San Diego, CA, USA). The values of the second derivative of the infrared spectrum were used for statistical analyses. Normality tests were performed for the variables using Shapiro-Wilk. The T-test

and the ANOVA test were chosen to search for the redox status biomarkers profile. To determine whether the presence and concentration of the redox status biomarkers may impact the infrared spectrum of sera, statistical analyses using the Generalized Linear Models (GLZM) test were performed. Finally, Spearman's correlation was also performed. The 95% confidence interval and p -value < 0.05 were determined for all tests.

3. Results

3.1. Characterization of the Study Population

The study was conducted with 25 women, 17 of whom were diagnosed with BC and 8 with BBD.

Table 1 presents the clinical and histopathological characteristics of the study participants with BC. Six are HER2+ and 11 HER2−, with a mean age $\pm$ standard deviation (SD) of 63 ± 4.3 years and 54.18 ± 14.4 years, respectively. Regarding the molecular subtype, most women belong to the group with the best prognosis in both cases: luminal B HER2+ (66.6%; $n = 4$) and luminal A (81.8%; $n = 9$).

Table 1. Clinical and histopathological characteristics of women with breast cancer ($n = 17$).

Characteristics	HER2+ n (%)	HER2− n (%)
Age (years) mean (min–max $\pm$ SD)	63 (58–71 $\pm$ 4.3)	54.18 (29–75 $\pm$ 14.4)
Menopause		
No	-	4 (36.3)
Yes	6 (100)	7 (63.6)
Tumor Subtype		
Ductal carcinoma	5 (83.3)	9 (81.8)
Lobular carcinoma	1 (16.6)	2 (18.1)
Clinical Stage		
I	2 (33.3)	3 (27.2)
II	1 (16.6)	5 (45.4)
III	3 (50)	2 (18.1)
NR	-	1 (9)
Histological Grade		
G1	-	2 (18.1)
G2	2 (33.3)	9 (81.8)
G3	4 (66.6)	-
Molecular Subtypes		
ER+ and/or PR+, HER2− and Ki-67 $< 14\%$	-	9 (81.8)
ER+ and/or PR+, HER2− and Ki-67 $\geq 14\%$	-	2 (18.1)
ER+ and/or PR+, HER2+	4 (66.6)	-
ER−, PR− and HER2+	2 (33.3)	-
Surgery		
Radical Mastectomy	1 (16.6)	4 (36.3)
Conservative Surgery	5 (83.3)	6 (54.5)
Others	-	1 (9)

HER2+, human epidermal growth factor receptor 2 positive group ($n = 6$); HER2−, human epidermal growth factor receptor 2 negative group ($n = 11$); SD, standard deviation; G1, well-differentiated tumor (low grade); G2, moderately differentiated tumor (intermediate grade); G3, poorly differentiated tumor (high grade); ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor; −, negative; + positive; Ki-67, Ki-67 antigen; NR, not registered.

The volunteers included in the BBD group ($n = 8$) were diagnosed with the following conditions: ductal ectasia, fibrosis, sclerosing adenosis, ductal hyperplasia, fibroadenoma, microcalcification, and giant juvenile fibroadenoma. The average age was 46.88 years, with a minimum of 19 and a maximum of 71 (SD = 14.71).

3.2. Wavenumbers Absorbance Related to Oxi-Reduction Differ between Groups Studied by ATR-FTIR

From the averages of the original infrared spectrum of the whole serum from the women with HER2+ BC, HER2− BC and BBD, graphs of the second derivative were obtained, which are shown in Figure 2. With this approach, the influence of scattering is reduced, and there is an information gain.

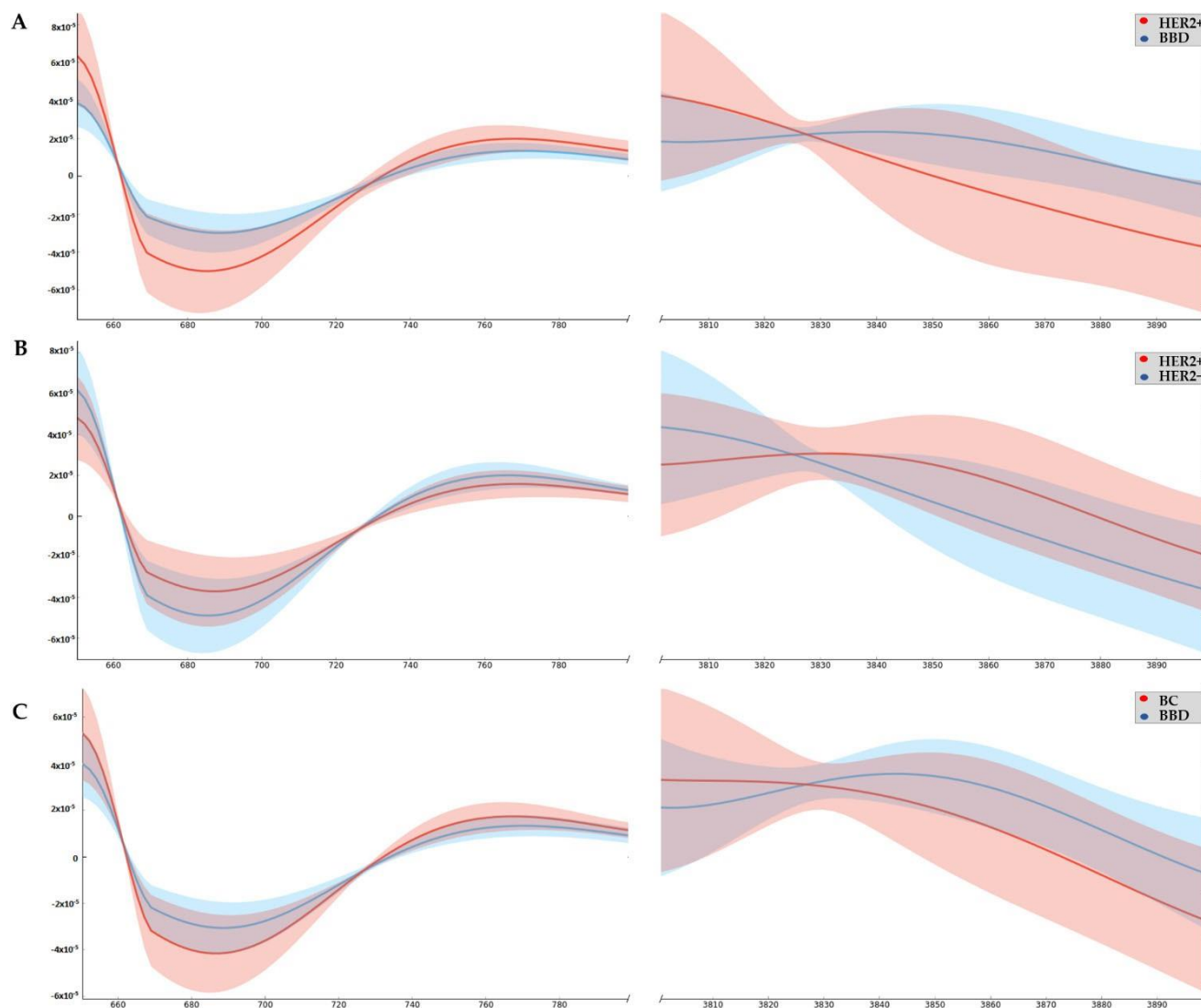


Figure 2. Graph of the second derivative ATR-FTIR. (A) Infrared spectrum HER2+ vs. BBD; (B) Infrared spectrum HER2+ vs. HER2−; (C) Infrared spectrum BBD vs. BC.

The main wavenumbers detected in the serum, i.e., those with a difference between groups, as well as their vibrational modes and their molecular sources, are described in Table 2. In the region, 706–710 cm^{-1} OH (hydroxyl group) out-of-plane bending, CH (hydrocarbon chain) out-of-plane bending and NH (amino group) bending (Amide IV) are found [22–24]. Wavenumbers 3874 cm^{-1} , 3876 cm^{-1} , 3878 cm^{-1} , 3880 cm^{-1} , 3882 cm^{-1} , 3887 cm^{-1} , 3889 cm^{-1} and 3893 cm^{-1} are part of a region of the infrared spectrum where the stretching vibrational bands of OH (hydroxyl group) and NH (amino group) stretchings are found [22,25,26].

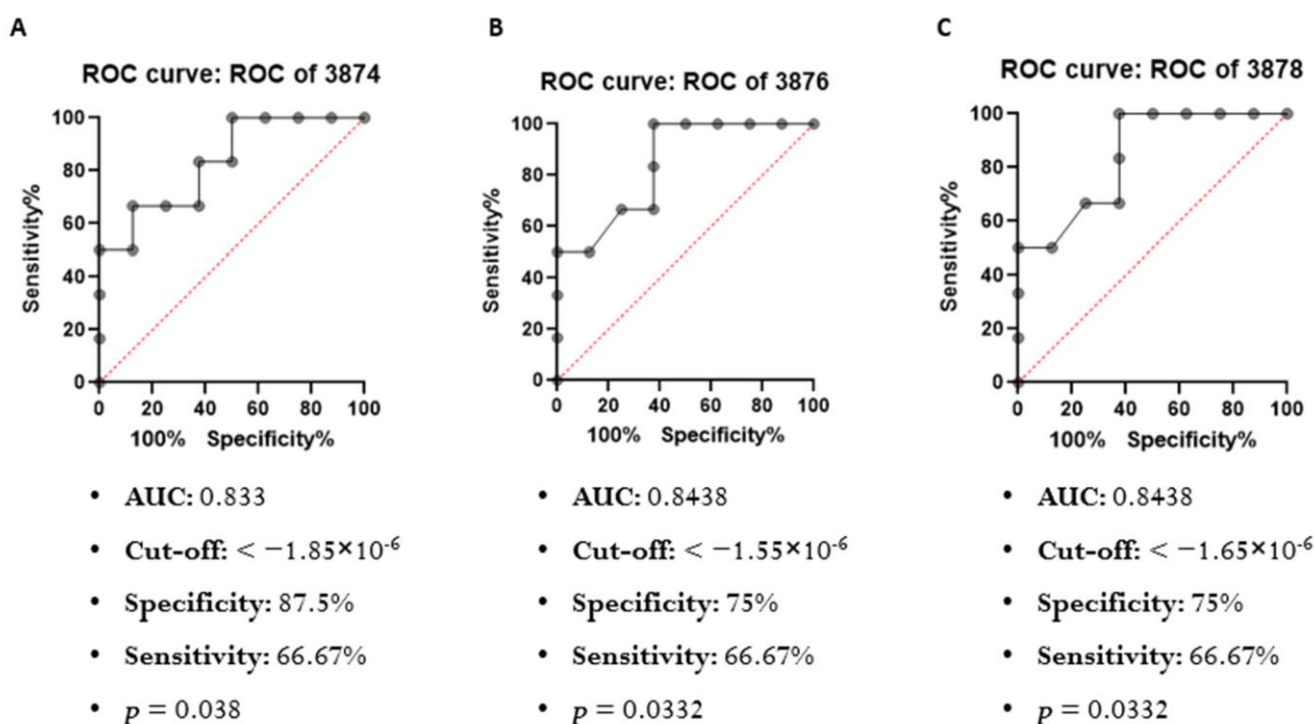
Table 2. Assignments and comparison between second derivative serological ATR-FTIR spectra of women with HER2+ BC ($n = 6$), HER2− BC ($n = 11$) and women with BBD ($n = 8$).

2nd Derivative Wavenumber/ cm^{-1}	HER2+ vs. BBD P	HER2+ vs. HER2− P	BC vs. BBD P	Proposed Vibrational Mode	Molecular Source
706–710	0.049	0.250	0.122	OH out-of-plane bending; CH out-of-plane bending; NH bending	Hydroxyl group; Amide IV
3874	0.042	0.207	0.125	OH stretching; NH stretching	Hydroxyl group; Amino group
3876	0.032	0.218	0.122		
3878	0.032	0.219	0.015		
3880	0.048	0.223	0.111		
3882	0.048	0.227	0.115		
3887	0.044	0.247	0.117		
3889	0.045	0.247	0.120		
3893	0.047	0.275	0.122		

Assignments based on different references [23–27]. T-test analysis of the second derivative spectra of women with HER2+ BC, HER2− BC and women with BBD.

Considering that differences were observed only between the HER2+ BC and BBD spectra, by means of the ROC curve analysis, we searched for a cutoff point so that it is possible to discriminate serum samples from individuals with HER2+ BC with high accuracy.

The only wavenumbers with p -value < 0.05 for the ROC curve were 3874 cm^{-1} , 3876 cm^{-1} and 3878 cm^{-1} , which are shown in Figure 3. All three have high sensitivity and specificity.

**Figure 3.** ROC Curve for HER2+ vs. BBD. (A) 3874 cm^{-1} ; (B) 3876 cm^{-1} ; (C) 3878 cm^{-1} .

3.3. Differentiation of Sera Based on Redox Status

Based on the molecular information obtained from the ATR-FTIR spectrum with serum samples, we investigated which redox status marker could better distinguish the sera, initially between two categories: BC and BBD. In this comparison, GSH ($p = 0.024$) and SOD ($p = 0.002$) levels were significantly reduced in women with BC (Table 3).

Table 3. Profile of redox status markers among women with breast cancer and benign breast disease at a university hospital in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil ($n = 25$).

Markers	BC ($n = 17$)		BBD ($n = 8$)		p
	Mean $\pm$ SD	Median	Mean $\pm$ SD	Median	
		(p25–p75)		(p25–p75)	
GSH	1.467 $\pm$ 0.599	1.335 (1.034–1.763)	2.021 $\pm$ 0.354	2.054 (1.831–2.195)	0.024 ^θ
SOD	0.207 $\pm$ 0.023	0.207 (0.185–0.222)	0.241 $\pm$ 0.023	0.230 (0.224–0.261)	0.002 ^σ
CATALASE	0.114 $\pm$ 0.040	0.113 (0.089–0.136)	0.082 $\pm$ 0.032	0.089 (0.057–0.098)	0.068 ^θ
FRAP	119.0 $\pm$ 37.06	116.0 (86.13–148.5)	126.4 $\pm$ 17.08	125.2 (113.4–141.4)	0.597 ^θ
CARBONYLPROTEIN	4.681 $\pm$ 3.293	4.088 (2.213–5.181)	3.309 $\pm$ 0.589	3.380 (2.865–3.650)	0.215 ^σ

BC, Breast Cancer; BBD, Benign Breast Disease; GSH, Reduced Glutathione; SOD, Superoxide Dismutase; FRAP, Ferric Reducing Antioxidant Power; SD, standard deviation; ^θ t test and ^σ Mann Whitney.

Afterwards, redox status markers were profiled among women with HER2+, HER2− and BBD (Table 4). The average GSH level was lower in the HER2+ BC group, but with a p value = 0.059 (borderline). SOD levels remained higher in the BBD group compared with the others ($p = 0.010$). Post-hoc revealed that the level of SOD contained in serum samples from women with HER2− BC was significantly lower than the level for BBD ($p = 0.008$).

Table 4. Profile of redox status markers among women with breast cancer HER2+, HER2− and benign breast disease at a university hospital in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil ($n = 25$).

Markers	HER2+ ($n = 6$)		HER2− ($n = 11$)		BBD ($n = 8$)		p
	Mean $\pm$ SD	Median	Mean $\pm$ SD	Median	Mean $\pm$ SD	Median	
		(p25–p75)		(p25–p75)		(p25–p75)	
GSH	1.317 $\pm$ 0.353	1.328 (0.998–1.607)	1.548 $\pm$ 0.701	1.335 (1.019–2.420)	2.021 $\pm$ 0.354	2.054 (1.831–2.195)	0.059 ^θ
SOD	0.213 $\pm$ 0.021	0.210 (0.197–0.236)	0.203 $\pm$ 0.023	0.207 (0.175–0.219) ^a	0.241 $\pm$ 0.023	0.230 (0.224–0.261) ^b	0.010 ^σ
CATALASE	0.096 $\pm$ 0.031	0.101 (0.065–0.120)	0.122 $\pm$ 0.042	0.122 (0.090–0.156)	0.082 $\pm$ 0.032	0.089 (0.057–0.098)	0.081 ^θ
FRAP	94.59 $\pm$ 23.79 ^a	87.63 (74.07–119.4)	132.3 $\pm$ 36.91 ^b	131.3 (99.79–166.3)	126.4 $\pm$ 17.08	125.2 (113.4–141.4)	0.049 ^θ
CARBONYL PROTEIN	5.629 $\pm$ 4.107	4.641 (3.208–7.322)	4.164 $\pm$ 2.844	3.991 (2.030–5.159)	3.309 $\pm$ 0.589	3.380 (2.865–3.650)	0.271 ^σ

HER2+, human epidermal growth factor receptor 2 positive; HER2−, human epidermal growth factor receptor 2 negative; BBD, Benign Breast Disease; GSH, Reduced Glutathione; SOD, Superoxide Dismutase; FRAP, Ferric Reducing Antioxidant Power; SD, standard deviation; ^θ ANOVA test + Tukey's multiple comparisons test; ^σ Kruskal-Wallis test + Dunn's multiple comparisons test; ^a and ^b, horizontal means/medians followed by different letters differed statistically according to the post-hoc test at the 5% probability level.

Furthermore, FRAP values were significantly reduced in women with HER2+ BC ($p = 0.049$). Between HER2+ and HER2−, post-hoc presented a p -value ($p = 0.045$), thus being the only redox status marker studied able to differentiate these two groups (Table 4).

The figures with the individual levels of GSH, SOD and FRAP in each studied group are presented in Figure 4. In this format, it is possible to observe the homogeneity of the data in each group.

In order to obtain a cut-off point at which it is possible to discriminate the studied groups based on their redox status, the ROC curve analysis was performed. In this step, Figure 5 presents the analyzes with $p < 0.05$. For FRAP a cut-off point of <117 was found to discriminate women with HER2+ BC from women with BBD (specificity 75% and sensitivity 83.33%). Furthermore, this same antioxidant capacity marker also discriminates against women with HER2+ BC from those with HER2− BC, with a cut-off point < 97.96 (specificity of 81.82% and sensitivity of 66.67%).

The SOD enzyme level presented a cut-off point <0.2238 from which discriminates the HER2− BC group from the BBD group (100% specificity and 90% sensitivity).

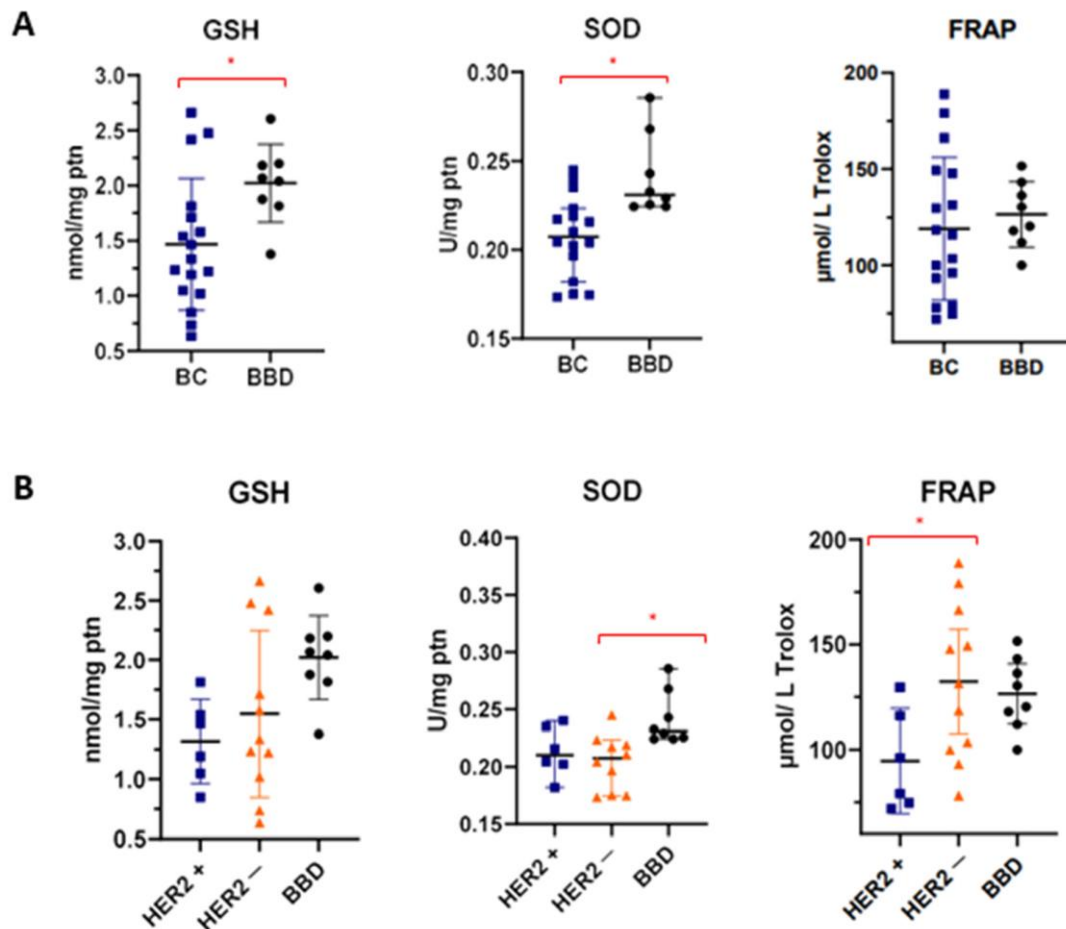


Figure 4. Redox status biomarkers levels in BC, HER2+, HER2− and BBD women. (A) GSH, SOD and FRAP levels in BC and BBD women; (B) GSH, SOD and FRAP levels in HER2+, HER2− and BBD women. *, denotes statistical difference between the two highlighted groups.

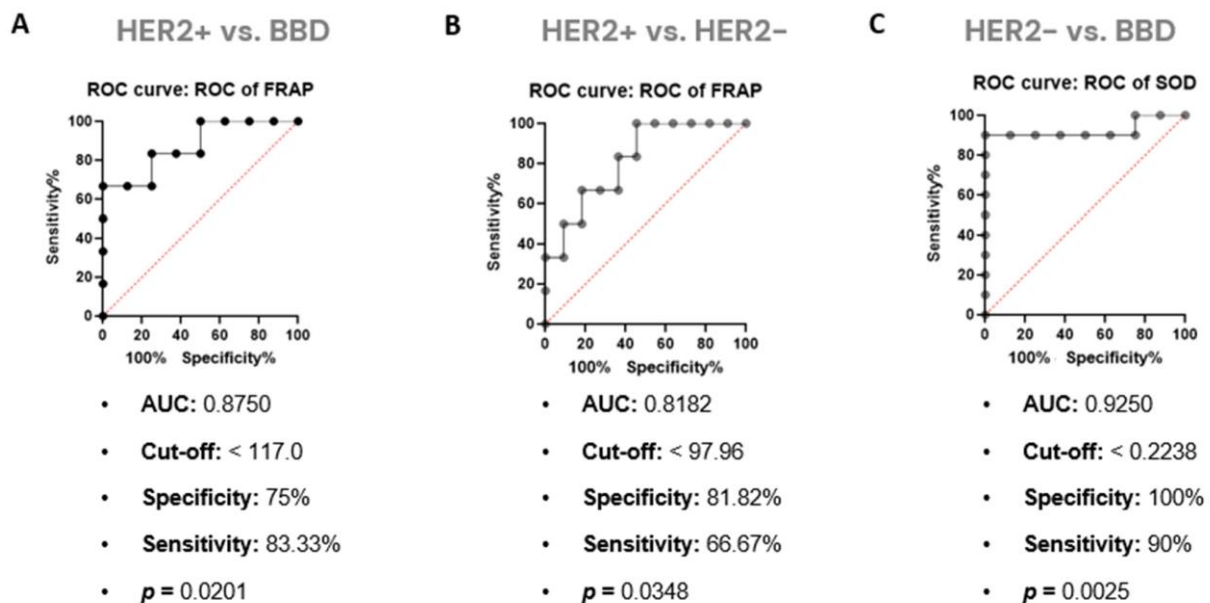


Figure 5. ROC Curve for HER2+ vs. BBD, HER2+ vs. HER2− and HER2− vs. BBD. (A) FRAP differentiates the groups HER2+ and BBD; (B) FRAP differentiates the groups HER2+ and HER2−; (C) SOD differentiates the groups HER2− and BBD.

3.4. FRAP Strongly Correlates and Affects Results Obtained by ATR-FTIR in Serum Samples from Women with HER2+ BC

Based on the previous results, we proceeded to investigate whether the absorbance relative to the wavenumbers in the ATR-FTIR that are different between the HER2+ and BBD groups (3874 cm^{-1} , 3876 cm^{-1} , and 3878 cm^{-1}) are influenced by redox status markers GSH, SOD, CAT, FRAP, and carbonylated protein.

Among the redox status markers evaluated, only FRAP impacts the absorbance value obtained at wavenumbers 3874 cm^{-1} ($\beta = -0.038$; $p < 0.001$), 3876 cm^{-1} ($\beta = -0.059$; $p < 0.001$) and 3878 cm^{-1} ($\beta = -0.066$; $p < 0.001$) of the HER2+ BC infrared spectrum. Regarding the BBD group, the SOD level affected the absorbance value obtained at wavenumbers 3874 cm^{-1} ($\beta = 13.525$; $p = 0.034$), 3876 cm^{-1} ($\beta = 18.571$; $p = 0.001$) and 3878 cm^{-1} ($\beta = 24.565$; $p = 0.042$). No markers studied showed influence on the ATR-FTIR infrared spectrum obtained from serum samples from women with HER2− or the general BC group.

To determine whether there is a correlation between the redox status markers and the absorbance values of the selected wavenumbers, statistical analyzes were performed. Using Spearman's correlation, a correlation between FRAP level and the regions of the spectrum 3874 cm^{-1} ($r = 0.829$; $p = 0.042$), 3876 cm^{-1} ($r = 0.829$; $p = 0.042$), and 3878 cm^{-1} ($r = 0.829$; $p = 0.042$) was found for the HER2+ BC group.

However, for the BBD group, no such correlations occur for FRAP [3874 cm^{-1} ($r = 0.143$; $p = 0.736$), 3876 cm^{-1} ($r = 0.190$; $p = 0.651$) and 3878 cm^{-1} ($r = 0.119$; $p = 0.779$)] or for the other redox status markers.

4. Discussion

The present study aimed to investigate the infrared spectrum wavenumbers obtained by ATR-FTIR and their relationship with the levels of redox status markers GSH, SOD, CAT, FRAP and protein carbonyl among women with HER2+ BC, HER2− BC, and BBD. Our results indicate HER2+ BC cases could be distinguished from HER2− BC and BBD cases by their serum's antioxidant capacity [HER2+ BC vs. HER2− BC (AUC = 0.818; specificity = 81.82%; sensitivity = 66.67%); HER2+ BC vs. BBD (AUC = 0.875; specificity = 75%; sensitivity = 83.33%)]. Furthermore, the changes in biochemical terms that occur in serum as a result of the scarcity of antioxidants, are related to a peculiar fingerprint in the infrared spectrum obtained by ATR-FTIR. These results confirm our initial hypothesis that a worse redox imbalance occurs in HER2+ BC cases.

Differences were found between the spectra of HER2+ and BBD serum in the wavenumbers $706\text{--}710\text{ cm}^{-1}$; 3874 cm^{-1} ; 3876 cm^{-1} ; 3878 cm^{-1} ; 3880 cm^{-1} ; 3882 cm^{-1} ; 3887 cm^{-1} ; 3889 cm^{-1} and 3893 cm^{-1} , among which three had ROC curve results with $p < 0.05$ [3874 cm^{-1} (AUC = 0.833), 3876 cm^{-1} (AUC = 0.843) and 3878 cm^{-1} (AUC = 0.843)]. In the serum of HER2+ BC women, the antioxidant capacity is the lowest and impacts the absorbance in wavenumbers 3874 cm^{-1} ($\beta = -0.038$; $p < 0.001$), 3876 cm^{-1} ($\beta = -0.059$; $p < 0.001$) and 3878 cm^{-1} ($\beta = -0.066$; $p < 0.001$). Meanwhile, in the serum of women with BBD, the SOD enzyme level is the highest, which affects the absorbance on the same wavenumbers [3874 cm^{-1} ($\beta = 13.525$; $p = 0.034$), 3876 cm^{-1} ($\beta = 18.571$; $p = 0.001$) and 3878 cm^{-1} ($\beta = 24.565$; $p = 0.042$)], and this characteristic allows us to distinguish them from HER2− BC samples (AUC = 0.92). In addition, the antioxidant capacity, obtained by the FRAP assay, allowed us to distinguish HER2+ BC samples from the others (AUC from HER2+ vs. HER2− = 0.81; AUC from HER2+ vs. BBD = 0.87), and correlated with the wavenumbers 3874 cm^{-1} ($r = 0.829$; $p = 0.042$), 3876 cm^{-1} ($r = 0.829$; $p = 0.042$) and 3878 cm^{-1} ($r = 0.829$; $p = 0.042$).

A pilot study conducted by Kepesidis and contributors (2021), applying FTIR in combination with machine learning for BC detection performed in Saudi Arabia, included 26 women with BC and 26 non-symptomatic women. They concluded from the data obtained with plasma from the volunteers that their model achieved an average performance of 0.79 in terms of area under the curve (AUC) of the receiver operating characteristic (ROC) and found a relationship between the size of the effect of the measured fingerprints and the

progression of the tumor [28]. The ROC curve analyzes performed in our study showed AUC values between 0.81 and 0.92, with high sensitivity and specificity. Despite the smaller sample size of our study, the study groups were much more homogeneous, with well-defined characteristics and precise diagnoses, thus obtaining representative results.

Oxidative stress can cause spectral changes due to alterations in intramolecular and intermolecular interactions of the biomolecules present in the blood. The redox status interferes with the conformation of proteins such as human serum albumin [29]. The region of the spectrum called Amide IV (about $620\text{--}767\text{ cm}^{-1}$), in which band $706\text{--}710\text{ cm}^{-1}$ is found, is sensitive to protein conformation [24]. In this sense, the difference between the absorbances of the HER2+ and BBD groups (Table 2) confirms that there are changes in protein folding in women's serum with HER2+ BC.

Elmi and colleagues (2017) evaluated serum from healthy women and women with BC using FTIR spectroscopy coupled with principal component and linear discriminate (PCA-LDA) analyses. Differences were found between groups in the regions of the spectrum referring to sugars, proteins, and lipids. It was highlighted that the infrared spectrum region of $3090\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$ (NH stretching mainly) was the most relevant criterion to distinguish the analyzed groups. The authors said that this fact could be explained by the protein changes that occur during BC, but they do not indicate what these changes could be [30]. In agreement with other studies, the alterations caused by the more accentuated redox imbalance in our HER+ BC serum samples would be due to variations in proteins due to oxidation, leading to modifications of the thiol group and possible alteration of the carbonyl group [28,31].

Currently, to assess the prognosis and predict the therapeutic response of patients with BC, knowledge of several pathological parameters is necessary. The combination of these parameters brings great clinical value in regard to medicine and nutrition, as it is possible to classify patients into many risk categories [32]. Among the 17 women with BC who participated in the present study, only two (11.76%) were classified as G1 (well-differentiated tumor), 11 (64.70%) as G2 (moderately differentiated tumor) and four (23.52%) as G3 (poorly differentiated tumor). Analyzing the HER2+ and HER2− groups separately, it can be observed that tumors with a higher histological grade are concentrated in the HER2+ group (all G3 cases). Poorly differentiated tumors are considered to have a poor prognosis because they have a cell phenotype similar to that of stem cells, becoming more aggressive and with greater metastatic potential [33]. Thus, considering all the histopathological characteristics described in Table 1, the HER2+ BC group is notably the one with the worst prognosis among the study groups.

Based on this information, it is possible to affirm that our results indicate a lower serological antioxidant capacity among women with a poor prognosis for BC. However, it is not known whether this would be the cause or consequence of this clinical condition. Nevertheless, there are studies that associated low antioxidant capacity with increased risk of mortality from all causes, including cancer and cardiovascular disease [33–37].

It is well known that diet is a key modifiable risk factor for several diseases, including BC. In the present study design, we did not collect data on the volunteers' diet, but our research group previously published a prospective study carried out among women with BC undergoing chemotherapy, where we found a decrease in the total antioxidant capacity of their diets over the time of treatment and among women that presented post-treatment metastasis [38].

Chemotherapy drugs, such as doxorubicin, induce cell death by producing ROS [39]. Consequently, this leads to the assumption that antioxidants could disrupt the treatment. However, more studies need to be conducted in order to establish a value from which the serum's antioxidant capacity would have a real effect on the non-apoptosis of tumor cells. In this sense, the ATR-FTIR and FRAP methods can contribute to the advancement of this area of knowledge, providing answers to these questions.

GSH is considered the most abundant molecule among endogenous antioxidants. It can eliminate ROS directly or indirectly, reacting with superoxide radicals and some other

ROS, produced by xenobiotic metabolism and inflammatory responses, or revitalizing other antioxidants, such as vitamin E [40]. In our study, GSH levels in women with BC were lower when compared with women with BBD (Table 3), indicating a low defense potential against oxidative damage in the BC group. In addition, a research group pointed out that an increase in nitric oxide synthesis occurs as a consequence when GSH levels decrease in the body, as there is oxidative activation of the main transcription factor related to inflammation, called NF κ B, and also an increase in the enzymatic activity of induced nitric oxide synthase (iNOS), features that are closely related to oxidative stress [41].

The SOD enzyme levels found in the serum of women with BC in general were lower when compared with women in the BBD group in this study (Table 3). SOD provides cellular defense against the superoxide radical. Early work with SOD in cancer already observed a lower level of this enzyme in the types of tumors analyzed [42]. Currently, it is known that these low levels of SOD only occur during tumor progression due to inactivation by proteins c-jun and p53 [6,43–45]. The scarcity of SOD can lead to an increase in ROS and consequently significant accumulation of mutations.

Indeed, in advanced stages, SOD levels rise in response to the excessive increase in ROS and p53 mutation [6,44,45]. In our sample, none of the volunteers with HER2 – BC have grade 3 tumors and only 18.1% were classified in clinical stage III, while 66.6% and 50% of the HER2+ group have these features, respectively (Table 1). This may be one of the reasons for the HER2 – BC group to present a lower level of SOD than the others (Table 4).

Regarding CAT, it is considered the main antioxidant enzyme, present mainly in peroxisomes of mammalian cells [13]. There are studies linking its lower activity to tumor metastasis [46–48], while others point to its overexpression in malignant cells, as it combats the increase in H₂O₂ generated in large amounts in cancer cells and thus helps the survival of the malignant cells [49,50]. Chromatin remodeling is the main regulatory event of CAT expression during the process of acquisition of resistance by malignant cells in BC against oxidative stress [51]. Our study did not find different levels of CAT between the groups analyzed, but there is a tendency for cases of BC to have a higher average level of this enzyme (Table 3).

Protein carbonylation is a trace generated by oxidative damage and a way to measure its extent in body fluids and tissues [52,53]. When produced, the carbonyl groups are chemically stable, which facilitates their detection. Physiological levels are low, around 1 nmol/mg of protein, but during oxidative stress, its concentration may increase 2 to 8 times [54]. According to our results, the average level of carbonyl protein was above 1 nmol/mg of protein in the three groups analyzed (Tables 3 and 4). However, even with a greater amount in the HER2+ BC group (average = 5.629 nmol/mg of protein), the difference was not significant between the groups for this biomarker.

The prognosis for HER2+ BC has improved over the years with the development of specific drugs targeting this receptor, both monoclonal antibodies (trastuzumab and pertuzumab), as well as tyrosine kinase inhibitors (lapatinib, tucatinib) and drug-conjugated antibodies (ado-trastuzumab emtansine and trastuzumab deruxtecan), which are used in combination with chemotherapy or alone in different clinical scenarios [55]. Though, in many cases, selective therapeutic pressure leads to more aggressive tumor recurrence, even after a long period of treatment efficacy [56]. Thus, it is of paramount importance that more research is done to be able to predict and monitor the response to early treatment.

Although there are studies investigating the use of FTIR for cancer diagnosis [16,57–62], this was not the objective of the present study. Here we pioneered combining infrared spectrum analyzes and levels of redox status markers in the blood, expanding the frontier of scientific knowledge in this area for women with HER2+ BC, HER2 – BC, and BBD. We emphasize that, as a preliminary study, the results are reliable according to the a posteriori sample calculation, although the data presented are still from a small number of women. Another possible limitation is that, in addition to cancer, there are other comorbidities in

the studied population. However, no differences were found for the values of the redox state markers when dichotomized into with and without comorbidities (results not shown).

For a new approach to be applicable in clinical practice, accuracy is important, but it is not enough. Due to this, even though there is development in this area, access is still restricted. A wide range of sample types can be tested in the FRAP assay and can be performed manually, semi-automatically, or even adapted to run in fully automated mode using a program in a biochemical analyzer [63]. Thus, the quantification of the serum's antioxidant capacity can be accessed quickly, cheaply, and safely and inserted in the practice of clinical analysis laboratories.

Studies carried out with BC patients had already reported a lower FRAP level in disease samples when compared with healthy ones [34,64], but there is no precedent showing HER2+ BC cases to be distinguished from HER2− BC cases by their serum's antioxidant capacity (reducing power). Thus, our preliminary results are of great value to the scientific community as they indicate a distinctive feature of these HER2+ molecular subtypes, which should be extended to a larger sample population. More studies should be conducted with this innovative approach combining the ATR-FTIR technique and the evaluation of the redox status of women with BC.

5. Conclusions

The present study concludes, among the redox status biomarkers evaluated, that the lowest antioxidant capacity is an important characteristic in the serum of women with HER2+, distinguishing them from other groups. The changes in biochemical terms that occur in serum as a result of the scarcity of antioxidants are related to a unique fingerprint in the infrared spectrum obtained by ATR-FTIR. Finally, data regarding the serological antioxidant capacity of FRAP and the infrared spectrum by ATR-FTIR will allow us to assess biochemical changes that occur before clinical signs, indicating whether changes in therapy or interventions are necessary throughout cancer treatment.

Author Contributions: Conceptualization, L.L.D.S., F.S.E. and Y.C.P.M.; Formal analysis, L.L.D.S., A.T.F.S., I.C.C.F. and Y.C.P.M.; Funding acquisition, C.E.P. and Y.C.P.M.; Investigation, L.L.D.S., A.T.F.S., I.C.C.F., A.V.S., A.B.J., D.W.S. and Y.C.P.M.; Methodology, L.L.D.S., F.S.E. and Y.C.P.M.; Project administration, Y.C.P.M.; Resources, L.R.G., F.S.E. and Y.C.P.M.; Supervision, C.E.P., F.S.E. and Y.C.P.M.; Visualization, L.L.D.S. and Y.C.P.M.; Writing—original draft, L.L.D.S., A.T.F.S., I.C.C.F., A.V.S., A.B.J., D.W.S., L.R.G., C.E.P., F.S.E. and Y.C.P.M.; Writing—review & editing, L.L.D.S., A.T.F.S., I.C.C.F., A.V.S., A.B.J., D.W.S., C.E.P., F.S.E. and Y.C.P.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study received financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil (CNPq Grant number: 409482/2021-8), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) Grant number: APQ-01339-21, CAPES and National Institute of Science and Technology in Teranostics and Nanobiotechnology–INCT–Teranano. Yara Cristina de Paiva Maia and Foued Salmen Espíndola are supported by a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais–FAPEMIG [Rede Mineira de Pesquisa Translacional em Imunobiológicos e Biofármacos no Câncer (REMITRIBIC, RED-00031-21)]. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Federal University of Uberlândia (protocol 4.047.065, approval date: 25 May 2022).

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

Data Availability Statement: The datasets used and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: To the female volunteers of this study. Furthermore, this work is dedicated to Luiz Ricardo Goulart Filho (in memoriam), a brilliant Brazilian scientist who have deceased due to COVID-19. We are grateful that we have worked with a brilliant scientist and an incomparable person.

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

References

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 Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Li, J.; Chen, Z.; Su, K.; Zeng, J. Clinicopathological Classification and Traditional Prognostic Indicators of Breast Cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 8500–8505. [\[PubMed\]](#)
3. Polyak, K. Heterogeneity in Breast Cancer. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 3786–3788. [\[CrossRef\]](#)
4. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2022. *CA Cancer J. Clin.* **2022**, *72*, 7–33. [\[CrossRef\]](#)
5. DeSantis, C.E.; Ma, J.; Gaudet, M.M.; Newman, L.A.; Miller, K.D.; Goding Sauer, A.; Jemal, A.; Siegel, R.L. Breast Cancer Statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin.* **2019**, *69*, 438–451. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Stival, R.S.M.; Prestes, A.L.d.O.; Mansani, F.P. Câncer de Mama Em Mulheres Jovens: Uma Análise Do Estadiamento Clínico Inicial e Dos Subtipos Moleculares Dos Tumores. *Rev. Bras. Mastol.* **2014**, *24*, 17–22. [\[CrossRef\]](#)
7. Devi, G.R.; Allensworth, J.L.; Evans, M.K.; Sauer, S.J. The Role of Oxidative Stress in Breast Cancer. In *Cancer*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; pp. 3–14.
8. Smith, C.; Marks, A.; Lieberman, M. *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*, 2nd ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2007.
9. Hecht, F.; Pessoa, C.F.; Gentile, L.B.; Rosenthal, D.; Carvalho, D.P.; Fortunato, R.S. The Role of Oxidative Stress on Breast Cancer Development and Therapy. *Tumor Biology* **2016**, *37*, 4281–4291. [\[CrossRef\]](#)
10. Thannickal, V.J.; Fanburg, B.L. Reactive Oxygen Species in Cell Signaling. *Am. J. Physiol. -Lung Cell. Mol. Physiol.* **2000**, *279*, L1005–L1028. [\[CrossRef\]](#)
11. Bhatti, J.S.; Sehrawat, A.; Mishra, J.; Sidhu, I.S.; Navik, U.; Khullar, N.; Kumar, S.; Bhatti, G.K.; Reddy, P.H. Oxidative Stress in the Pathophysiology of Type 2 Diabetes and Related Complications: Current Therapeutics Strategies and Future Perspectives. *Free Radic. Biol. Med.* **2022**, *184*, 114–134. [\[CrossRef\]](#)
12. Chang, K.-C.; Liu, P.-F.; Chang, C.-H.; Lin, Y.-C.; Chen, Y.-J.; Shu, C.-W. The Interplay of Autophagy and Oxidative Stress in the Pathogenesis and Therapy of Retinal Degenerative Diseases. *Cell Biosci.* **2022**, *12*, 1. [\[CrossRef\]](#)
13. Ali, S.S.; Ahsan, H.; Zia, M.K.; Siddiqui, T.; Khan, F.H. Understanding Oxidants and Antioxidants: Classical Team with New Players. *J. Food Biochem.* **2020**, *44*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Barth, A. Infrared Spectroscopy of Proteins. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Bioenerg.* **2007**, *1767*, 1073–1101. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Délérís, G.; Petibois, C. Applications of FT-IR Spectrometry to Plasma Contents Analysis and Monitoring. *Vib. Spectrosc.* **2003**, *32*, 129–136. [\[CrossRef\]](#)
16. Mamede, A.P.; Santos, I.P.; Batista de Carvalho, A.L.M.; Figueiredo, P.; Silva, M.C.; Tavares, M.V.; Marques, M.P.M.; Batista de Carvalho, L.A.E. A New Look into Cancer—A Review on the Contribution of Vibrational Spectroscopy on Early Diagnosis and Surgery Guidance. *Cancers* **2021**, *13*, 5336. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Faul, F.; Erdfelder, E.; Lang, A.-G.; Buchner, A. G*Power 3: A Flexible Statistical Power Analysis Program for the Social, Behavioral, and Biomedical Sciences. *Behav. Res. Methods* **2007**, *39*, 175–191. [\[CrossRef\]](#)
18. Browne, R.W.; Armstrong, D. Reduced Glutathione and Glutathione Disulfide. In *Free Radical and Antioxidant Protocols*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 1998; Volume 108, pp. 347–352.
19. Fernandes, C.G.; Borges, C.G.; Seminotti, B.; Amaral, A.U.; Knebel, L.A.; Eichler, P.; de Oliveira, A.B.; Leipnitz, G.; Wajner, M. Experimental Evidence That Methylmalonic Acid Provokes Oxidative Damage and Compromises Antioxidant Defenses in Nerve Terminal and Striatum of Young Rats. *Cell Mol. Neurobiol.* **2011**, *31*, 775–785. [\[CrossRef\]](#)
20. Aebi, H. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 121–126.
21. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [\[CrossRef\]](#)
22. Reznick, A.Z.; Packer, L. Oxidative Damage to Proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay. *Methods Enzymol.* **1994**, *186*, 357–363.
23. Coates, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2006.
24. Kumar, S.; Chaudhary, S.; Jain, D.C. Vibrational Studies of Different Human Body Disorders Using FTIR Spectroscopy. *Open J. Appl. Sci.* **2014**, *04*, 103–129. [\[CrossRef\]](#)
25. Movasaghi, Z.; Rehman, S.; ur Rehman, D.I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2008**, *43*, 134–179. [\[CrossRef\]](#)
26. Anastassopoulou, J.; Kyriakidou, M.; Kyriazis, S.; Mavrogenis, A.F.; Mamareli, V.; Mamarelis, I.; Petra, M.; Malesiou, E.; Kotoulas, C.; Kolovou, P.; et al. Oxidative Stress in Ageing and Disease Development Studied by FT-IR Spectroscopy. *Mech. Ageing Dev.* **2018**, *172*, 107–114. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Naumann, D. FT-Infrared and FT-Raman Spectroscopy in Biomedical Research. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2001**, *36*, 239–298. [\[CrossRef\]](#)

28. Kepesidis, K.V.; Bozic-Iven, M.; Huber, M.; Abdel-Aziz, N.; Kullab, S.; Abdelwarith, A.; al Diab, A.; al Ghamdi, M.; Hilal, M.A.; Bahadoor, M.R.K.; et al. Breast-Cancer Detection Using Blood-Based Infrared Molecular Fingerprints. *BMC Cancer* **2021**, *21*, 1287. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Nakashima, F.; Shibata, T.; Kamiya, K.; Yoshitake, J.; Kikuchi, R.; Matsushita, T.; Ishii, I.; Giménez-Bastida, J.A.; Schneider, C.; Uchida, K. Structural and Functional Insights into S-Thiolation of Human Serum Albumins. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 932. [\[CrossRef\]](#)
30. Elmi, F.; Movaghar, A.F.; Elmi, M.M.; Alinezhad, H.; Nikbakhsh, N. Application of FT-IR Spectroscopy on Breast Cancer Serum Analysis. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, *187*, 87–91. [\[CrossRef\]](#)
31. Ghimire, H.; Garlapati, C.; Janssen, E.A.M.; Krishnamurti, U.; Qin, G.; Aneja, R.; Perera, A.G.U. Protein Conformational Changes in Breast Cancer Sera Using Infrared Spectroscopic Analysis. *Cancers* **2020**, *12*, 1708. [\[CrossRef\]](#)
32. Aydiner, A.; Igci, A.; Cabioglu, N.; Ozer, L.; Sen, F. *Breast Cancer*; Aydiner, A., Igci, A., Soran, A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2019; ISBN 978-3-319-96946-6.
33. ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological Prognostic Factors in Breast Cancer. I. The Value of Histological Grade in Breast Cancer: Experience from a Large Study with Long-Term Follow-Up. *Histopathology* **1991**, *19*, 403–410. [\[CrossRef\]](#)
34. Aune, D.; Keum, N.; Giovannucci, E.; Fadnes, L.T.; Boffetta, P.; Greenwood, D.C.; Tonstad, S.; Vatten, L.J.; Riboli, E.; Norat, T. Dietary Intake and Blood Concentrations of Antioxidants and the Risk of Cardiovascular Disease, Total Cancer, and All-Cause Mortality: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2018**, *108*, 1069–1091. [\[CrossRef\]](#)
35. Aune, D. Plant Foods, Antioxidant Biomarkers, and the Risk of Cardiovascular Disease, Cancer, and Mortality: A Review of the Evidence. *Adv. Nutr.* **2019**, *10*, S404–S421. [\[CrossRef\]](#)
36. Bastide, N.; Dartois, L.; Dyeve, V.; Dossus, L.; Fagherazzi, G.; Serafini, M.; Boutron-Ruault, M.-C. Dietary Antioxidant Capacity and All-Cause and Cause-Specific Mortality in the E3N/EPIC Cohort Study. *Eur. J. Nutr.* **2017**, *56*, 1233–1243. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Parohan, M.; Anjom-Shoae, J.; Nasiri, M.; Khodadost, M.; Khatibi, S.R.; Sadeghi, O. Dietary Total Antioxidant Capacity and Mortality from All Causes, Cardiovascular Disease and Cancer: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Eur. J. Nutr.* **2019**, *58*, 2175–2189. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Santos, L.L.D.; Custódio, I.D.D.; Silva, A.T.F.; Ferreira, I.C.C.; Marinho, E.C.; Caixeta, D.C.; Souza, A.V.; Teixeira, R.R.; Araújo, T.G.; Shivappa, N.; et al. Overweight Women with Breast Cancer on Chemotherapy Have More Unfavorable Inflammatory and Oxidative Stress Profiles. *Nutrients* **2020**, *12*, 3303. [\[CrossRef\]](#)
39. Gorrini, C.; Harris, I.S.; Mak, T.W. Modulation of Oxidative Stress as an Anticancer Strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 931–947. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Espinosa-Diez, C.; Miguel, V.; Mennerich, D.; Kietzmann, T.; Sánchez-Pérez, P.; Cadenas, S.; Lamas, S. Antioxidant Responses and Cellular Adjustments to Oxidative Stress. *Redox Biol.* **2015**, *6*, 183–197. [\[CrossRef\]](#)
41. Nikulina, M.A.; Andersen, H.U.; Karlsen, A.E.; Darville, M.I.; Eizirik, D.L.; Mandrup-Poulsen, T. Glutathione depletion inhibits IL-1 β -stimulated nitric oxide production by reducing inducible nitric oxide synthase gene expression. *Cytokine* **2000**, *12*, 1391–1394. [\[CrossRef\]](#)
42. Oberley, L.W.; Buettner, G.R. Role of Superoxide Dismutase in Cancer: A Review. *Cancer Res.* **1979**, *39*, 1141–1149.
43. Katiyar, S.; Casimiro, M.C.; Dettin, L.; Ju, X.; Wagner, E.F.; Tanaka, H.; Pestell, R.G. *C-Jun* Inhibits Mammary Apoptosis In Vivo. *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 4264–4274. [\[CrossRef\]](#)
44. Robbins, D.; Zhao, Y. Manganese Superoxide Dismutase in Cancer Prevention. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20*, 1628–1645. [\[CrossRef\]](#)
45. Dhar, S.K.; Tangpong, J.; Chaiswing, L.; Oberley, T.D.; St. Clair, D.K. Manganese Superoxide Dismutase Is a *P53* -Regulated Gene That Switches Cancers between Early and Advanced Stages. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 6684–6695. [\[CrossRef\]](#)
46. Radenkovic, S.; Milosevic, Z.; Konjevic, G.; Karadzic, K.; Rovcanin, B.; Buta, M.; Gopcevic, K.; Jurisic, V. Lactate Dehydrogenase, Catalase, and Superoxide Dismutase in Tumor Tissue of Breast Cancer Patients in Respect to Mammographic Findings. *Cell Biochem. Biophys.* **2013**, *66*, 287–295. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Salman, R.A.; AlBairuty, G.A.A.; Abdul-Rasheed, O.F. Decreased Catalase Activity and Glutathione Concentration Levels in Women Patients with Breast Cancer. *Ann. Trop. Med. Public Health* **2020**, *23*. [\[CrossRef\]](#)
48. Kodydkova, J.; Vavrova, L.; Stankova, B.; Macasek, J.; Krechler, T.; Zak, A. Antioxidant Status and Oxidative Stress Markers in Pancreatic Cancer and Chronic Pancreatitis. *Pancreas* **2013**, *42*, 614–621. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Davison, C.A.; Durbin, S.M.; Thau, M.R.; Zellmer, V.R.; Chapman, S.E.; Diener, J.; Wathen, C.; Leevy, W.M.; Schafer, Z.T. Antioxidant Enzymes Mediate Survival of Breast Cancer Cells Deprived of Extracellular Matrix. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 3704–3715. [\[CrossRef\]](#)
50. Esme, H.; Cemek, M.; Sezer, M.; Saglam, H.; Demir, A.; Melek, H.; Unlu, M. High Levels of Oxidative Stress in Patients with Advanced Lung Cancer. *Respirology* **2008**, *13*, 112–116. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Glorieux, C.; Sandoval, J.M.; Dejeans, N.; Nonckreman, S.; Bahloul, K.; Poirel, H.A.; Calderon, P.B. Evaluation of Potential Mechanisms Controlling the Catalase Expression in Breast Cancer Cells. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2018**, *2018*, 5351967. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

52. Bujok, J.; Gaśior-Głogowska, M.; Marszałek, M.; Trochanowska-Pauk, N.; Zigo, F.; Pavl'ak, A.; Komorowska, M.; Walski, T. Applicability of FTIR-ATR Method to Measure Carbonyls in Blood Plasma after Physical and Mental Stress. *Biomed. Res. Int.* **2019**, *2019*, 2181370. [\[CrossRef\]](#)
53. Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Giustarini, D.; Milzani, A.; Colombo, R. Protein Carbonyl Groups as Biomarkers of Oxidative Stress. *Clin. Chim. Acta* **2003**, *329*, 23–38. [\[CrossRef\]](#)
54. Shacter, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab. Rev.* **2000**, *32*, 307–326. [\[CrossRef\]](#)
55. Ferrario, C.; Christofides, A.; Joy, A.A.; Laing, K.; Gelmon, K.; Brezden-Masley, C. Novel Therapies for the Treatment of HER2-Positive Advanced Breast Cancer: A Canadian Perspective. *Curr. Oncol.* **2022**, *29*, 2720–2734. [\[CrossRef\]](#)
56. Eroles, P.; Bosch, A.; Alejandro Pérez-Fidalgo, J.; Lluch, A. Molecular Biology in Breast Cancer: Intrinsic Subtypes and Signaling Pathways. *Cancer Treat Rev.* **2012**, *38*, 698–707. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Ferreira, I.C.C.; Aguiar, E.M.G.; Silva, A.T.F.; Santos, L.L.D.; Cardoso-Sousa, L.; Araújo, T.G.; Santos, D.W.; Goulart, L.R.; Sabino-Silva, R.; Maia, Y.C.P. Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. *J. Oncol.* **2020**, *2020*, 4343590. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Dong, L.; Sun, X.; Chao, Z.; Zhang, S.; Zheng, J.; Gurung, R.; Du, J.; Shi, J.; Xu, Y.; Zhang, Y.; et al. Evaluation of FTIR Spectroscopy as Diagnostic Tool for Colorectal Cancer Using Spectral Analysis. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *122*, 288–294. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Backhaus, J.; Mueller, R.; Formanski, N.; Szlama, N.; Meerpohl, H.-G.; Eidt, M.; Bugert, P. Diagnosis of Breast Cancer with Infrared Spectroscopy from Serum Samples. *Vib. Spectrosc.* **2010**, *52*, 173–177. [\[CrossRef\]](#)
60. Yang, X.; Wu, Z.; Ou, Q.; Qian, K.; Jiang, L.; Yang, W.; Shi, Y.; Liu, G. Diagnosis of Lung Cancer by FTIR Spectroscopy Combined With Raman Spectroscopy Based on Data Fusion and Wavelet Transform. *Front. Chem.* **2022**, *10*, 810837. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Sala, A.; Cameron, J.M.; Jenkins, C.A.; Barr, H.; Christie, L.; Conn, J.J.A.; Evans, T.R.J.; Harris, D.A.; Palmer, D.S.; Rinaldi, C.; et al. Liquid Biopsy for Pancreatic Cancer Detection Using Infrared Spectroscopy. *Cancers* **2022**, *14*, 3048. [\[CrossRef\]](#)
62. Fadlilmoula, A.; Pinho, D.; Carvalho, V.H.; Catarino, S.O.; Minas, G. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Analyse Human Blood over the Last 20 Years: A Review towards Lab-on-a-Chip Devices. *Micromachines* **2022**, *13*, 187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Benzie, I.F.F.; Devaki, M. The Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP) Assay for Non-Enzymatic Antioxidant Capacity: Concepts, Procedures, Limitations and Applications. In *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity*; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2017; pp. 77–106.
64. Kundaktepe, B.P.; Sozer, V.; Durmus, S.; Kocael, P.C.; Kundaktepe, F.O.; Papila, C.; Gelisgen, R.; Uzun, H. The Evaluation of Oxidative Stress Parameters in Breast and Colon Cancer. *Medicine* **2021**, *100*, e25104. [\[CrossRef\]](#)

III. Capítulo III

Analysis of R-SH Quantification Unveils Redox Imbalance Signatures in Advanced Metastatic Breast Cancer

Letícia L. D. Santos^{a,b}, Alinne T. F. Silva^{a,b}, Izabella C. C. Ferreira^{a,b}, Lara A. Marques^{a,b}, Allisson B. Justino^c, Maria Sol Penã^c, Renata R. Teixeira^c, Donizeti W. Santos^d, Paula P. Lajolo^e, Carlos Eduardo Paiva^f, Foued S. Espíndola^c and Yara C. P. Maia^{a,b*}

^aLaboratory of Nanobiotechnology Luiz Ricardo Goulart Filho, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, 38402-022, Brazil.

^bMolecular Biology and Nutrition Research Group (BioNut), School of Medicine, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, 38405-320, Brazil.

^cLaboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, 38405-302, Brazil.

^dObstetric Division, University Hospital, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, 38405-320, Brazil.

^eDepartment of Clinical Oncology, Clinics Hospital, Federal University of Uberlandia, Oncology Sector, Room 9, Campus Umuarama, Uberlandia, 38405-320, Brazil.

^fDepartment of Clinical Oncology, Graduate Program in Oncology, Palliative Care and Quality of Life Research Group (GPQual), Pio XII Foundation, Barretos Cancer Hospital, Barretos, 14784-400, Brazil.

*Correspondence: yara.maia@ufu.br

Highlights:

- Lower free R-SH levels are here explored as natural molecular signatures significantly associated with metastatic BC.
- The findings suggest a potential link between lower free R-SH and the initiation and perpetuation of metastatic processes in BC.
- The redox cycle of GSH showed no correlation with the lower quantification of free R-SH.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is a heterogeneous disease in which clinical, pathological, and biological data are used to predict patient outcomes. Serum sulfhydryl groups (R-SH, free thiols) reflect systemic redox status, and they decrease in the presence of oxidative stress. This study assesses the quantification of R-SH using serum samples from patients with metastatic BC, non-metastatic BC, people with benign breast disease (BBD), and healthy women. The aim is to explore markers of redox imbalance: free R-SH, GSH, GPx and GR in women with BC. The study included 108 women: 20 patients with metastatic BC undergoing palliative care, 33 recently diagnosed non-metastatic BC cases, 27 with BBD, and 28 healthy controls. Blood samples were collected at a Clinical Hospital, following Ethics Committee approval. Statistical analyses were conducted at 95% confidence intervals, considering p-value less than 0.05 as indicative of significant. The quantification of R-SH demonstrated a notable reduction in women with metastatic BC ($p = 0.018$). Consequently, the significant association between R-SH levels and advanced metastatic BC has the potential to serve as a readily quantifiable biomarker for monitoring BC patients, with the prospect of being amenable to therapeutic interventions. To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the relationship between free R-SH and the prognosis, as well as redox status, in female patients with advanced BC. The results obtained have the potential to make valuable contributions to clinical practice and represent a significant advancement in this area of knowledge.

Keywords: breast cancer; sulfhydryl; redox imbalance; palliative care; metastasis; prognosis.

Introduction

Breast cancer (BC) stands as the second leading cause of death in women worldwide. In South America, a foreseen 30% increase in BC-related fatalities is expected by 2030, reaching a total of 54,163 deaths[1]. This concerning trajectory underscores the critical need to address metastatic BC, which remains the primary source of morbidity and mortality among patients. This stage of BC is characterized by its incurable nature and represents

the most advanced phase of the disease[2–4]. Comprehensive care encompasses the management of risk factors, early disease detection, and palliative care[5]. Clinical, pathological, and biological data play a vital role in predicting a patient's clinical course, including the likelihood of disease recurrence and overall survival. Prognostic factors are firmly established as essential determinants in shaping therapeutic goals and treatment choices. Nevertheless, within the clinical domain, there is a compelling need for additional strategies, including the exploration of novel prognostic markers and the development of innovative prognostic models[6].

The pro-oxidative redox imbalance, which has been linked to BC[7,8], leads to a reduction in serum levels of the sulfhydryl group (free R-SH or thiol). This group plays a pivotal role as a functional group with antioxidant properties[9]. R-SH is found in cysteines and related molecules within biological systems, and can participate in both one- and two-electron reaction mechanisms[10].

Reduced glutathione (GSH) is a tripeptide with antioxidant action, enzymatically produced from three amino acid residues: glutamate, cysteine, and glycine[11]. The cysteine residue imparts GSH with its chemical reactivity, while the γ -glutamyl peptide bond and the negative net charge make GSH a specific substrate for glutathione-dependent enzymes, such as glutathione reductase (GR). GR transfers electrons from NADPH to glutathione disulfide (GSSG), thereby regenerating two molecules of GSH. The enzyme glutathione peroxidase (GPx) reduces hydrogen peroxide using the reducing power of GSH, yielding water and GSSG as products[12].

In this work, we present the quantification of levels of free R-SH, GSH, GPx, and GR in the serum of women with BC. Therefore, the discovery is applied to the prognosis and redox status monitoring of women in different health conditions, including those with metastatic BC in palliative care, non-metastatic BC, benign breast disease (BBD) and healthy control. Our hypothesis postulate that women with metastatic BC exhibit a more severe redox imbalance. The aim of this research is to explore markers of redox imbalance in women with BC, especially at an advanced stage.

Material and Methods

Study Design, Sample Size, and Eligibility Criteria

This study was conducted at a Clinical Hospital in Uberlandia, MG, Brazil, after approval by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Uberlandia (protocol 4.047.065), and all subjects provided written informed consent. The entire study was developed according to the standards of the Declaration of Helsinki and Resolution CNS 466/12.

Women who went to the Clinical Hospital to undergo breast surgery were invited to participate in the study as volunteers. After surgery and histopathological results, the tumors, tissues, and lesions found were classified according to histological type, staging, and status of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and HER2 receptors.

Cases of triple negative BC and cases with suspected or indeterminate cytopathological pattern of malignancy were excluded from the study.

The healthy control group consists of women with no family history of cancer, who had undergone a breast ultrasound examination up to one year prior to the blood sample collection, with the examination results classified as BIRADS 1. **Figure 1** shows the number of women screened and enrolled during the study.

A posteriori power analysis was carried out using the G*Power software, version 3.1 (Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Germany). The analysis was based on a F-test linear multiple regression with an effect size f of 0.35, an alpha level of 0.15, and 1 tested predictor. Considering a total of 108 participants, the output parameter showed a power of 99% (post hoc: computer achieved power calculation)[13].

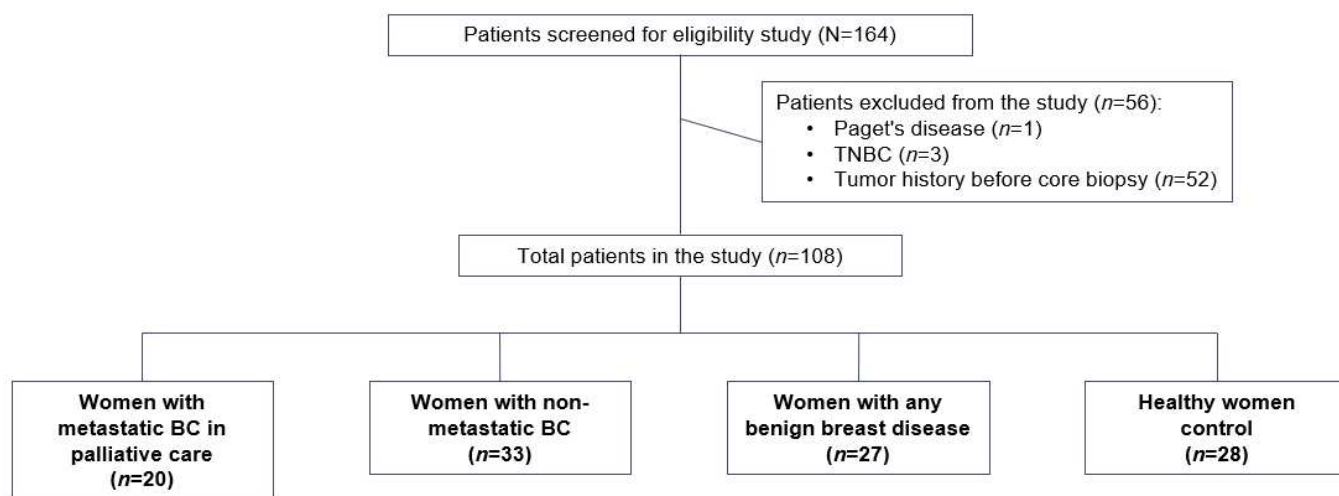


Figure 1. Study flowchart.

Data and Biological Material Collections

The data of the study were obtained from interviews and medical records. With the volunteer's consent, 5 mL of peripheral blood was collected to analysis of sulfhydryl. A vacuum collection tube containing separating gel with a clot activator was used on this occasion, and the samples were processed as indicated by the manufacturer (KASVI®, São José dos Pinhais, PR, Brazil).

Quantification of sulfhydryls

Modification of free R-SH group was quantitatively determined using freshly prepared 5,50 -dithiobis- (2-nitrobenzoic acid) (Ellman's reagent, DTNB) in 50 mM PBS contained 1 mM EDTA, pH = 7.4. When DTNB reacts with R-SH groups of proteins under mild alkaline conditions (pH 7–8), the 2-nitro-5-thiobenzoate anion gives an intense yellow color and absorbs at 412 nm. The analysis was conducted as previously reported[14].

Quantification of GSH

For the quantification of GSH levels, 150 µL of the sample was added to 150 µL of metaphosphoric acid and then centrifuged at 7000 xg for 10 min at 4°C. Thirty microliters of the supernatant were withdrawn, to which 185 µL of 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 5 mM EDTA, and 15 µL of o-phthalaldehyde (1 mg/ml in methanol) were added. This mixture was incubated in the dark at room temperature for 15 min, and the fluorescence was read at 350 nm (excitation) and 420 nm (emission). GSH concentrations were calculated using a GSH standard curve (0.001-0.1 mM).

GR activity

The GR activity was determined based on the consumption of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) using oxidized glutathione (GSSG) as a substrate. Plasma samples were mixed with a 200 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer at pH 7.5 containing 6.3 mmol L⁻¹ EDTA to inhibit metal-dependent enzymes, such as metalloproteases, 10 mmol L⁻¹ oxidized glutathione, and 3 mmol L⁻¹ NADPH. The decay in NADPH concentration was assessed for 10 minutes at 340 nm.

GPx activity

The GPx activity was determined based on the reduction of NADPH by GR, which reduces a glutathione disulfide bridge created by the sample's GPx. Plasma samples were incubated with GPx buffer (100 mmol L⁻¹ potassium phosphate, pH 7.7, containing 1 mmol L⁻¹ EDTA to deactivate metal-dependent enzymes, such as metalloproteases), 40 mmol L⁻¹ sodium azide, 100 mmol L⁻¹ GSH diluted in 5% metaphosphoric acid, 4.5 UGR diluted in GPx buffer, 2 mmol L⁻¹ NADPH diluted in 5% sodium bicarbonate, and 0.5 mmol L⁻¹ tert-butyl. The decay in NADPH concentration was assessed for 10 minutes at 340 nm.

Statistical Analysis

Statistical analyzes were conducted using the Prism Program version 9.0 (Graphpad, San Diego, CA, USA).

Normality tests were performed for the variables using Shapiro-Wilk. The Kruskal-Wallis test was chosen to search for the sulfhydryl profile. The 95% confidence interval and p-value < 0.05 were determined for all tests.

Results

Characterization of the Study Population

The study was conducted with 108 women: 20 metastatic BC cases in palliative care, 33 non-metastatic BC cases, 27 with BBD, and 28 healthy controls. **Table 1** presents the clinical and histopathological characteristics of the study participants with BC (n = 53). The average ages of the metastatic and non-metastatic BC groups are close, being 61.35 ± 12.52 and 57.39 ± 14.56 , respectively. Regarding the molecular subtype, most women in both groups presented the luminal B HER2- subtype, totaling 29 cases (54.7%).

In Table 2, it is evident that most metastases are recurrences (85%, n = 17), occurring subsequent to the BC diagnosis. The median interval from diagnosis to metastasis in this sample was 1275 days.

Table 1. Clinical and histopathological characteristics of women with breast cancer (n = 53).

Characteristics	Metastatic BC (n = 20) n (%)	Non-metastatic BC (n = 33) n (%)
Age (years) mean (min-max $\pm$ SD)	61.35 (37–86 $\pm$ 12.52)	57.39 (33–91 $\pm$ 14.56)
Menopause		
No	3 (15)	11 (33.3)
Yes	17 (85)	22 (66.7)
Tumor Subtype		
Ductal carcinoma	15 (75)	25 (75.8)
Lobular carcinoma	3 (15)	6 (18.2)
NR	2 (10)	2 (6)
Clinical Stage		
0	-	2 (6)
I	-	6 (18.2)
II	-	19 (57.6)
III	-	6 (18.2)
IV	20 (100)	-
Histological Grade		
G1	-	4 (12.1)
G2	11 (55)	23 (69.7)
G3	6 (30)	5 (15.2)
NR	3 (15)	1 (3)
Molecular Subtypes		
ER+ and/or PR+, HER2- and Ki-67 < 14%	3 (15)	8 (24.2)
ER+ and/or PR+, HER2- and Ki-67 $\geq$ 14%	11 (55)	18 (54.7)
ER+ and/or PR+, HER2+	2 (10)	4 (12.1)
ER-, PR- and HER2+	4 (20)	1 (3)
NR	-	2 (6)
Surgery		
Radical Mastectomy	7 (35)	-
Conservative Surgery	4 (20)	-
Needle Biopsy	-	33 (100)
No	9 (45)	-

SD, standard deviation; G1, well-differentiated tumor (low grade); G2, moderately differentiated tumor (intermediate grade); G3, poorly differentiated tumor (high grade); ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor; -, negative; + positive; HER2+, human epidermal growth factor receptor 2 positive; HER2-, human epidermal growth factor receptor 2 negative; Ki-67, Ki-67 antigen; NR, not registered.

155 **Table 2.** Characteristics regarding metastases in patients from the Metastatic BC group (n = 20).

Metastatic BC		
De novo disease n (%)	Recurrence n (%)	Median days (p25–p75)
3 (15)	17 (85)	1275 (102.3–2789)

156 *De novo*, patients who at the time of diagnosis had metastatic disease; recurrence, patients who at the time of
157 diagnosis did not have metastatic disease; median, time in days from diagnosis to metastasis.

158
159 The volunteers included in the BBD group (n = 27) were diagnosed with the following conditions: simple adenosis,
160 sclerosing adenosis, fibrocystic changes, papillomatous changes, epithelial atypia, ductal ectasia, fibroadenoma,
161 fibrosis, usual ductal hyperplasia, stromal hyperplasia, papillary lesion without atypia, apocrine metaplasia and
162 intraductal papillomas. The average age was 46.4 years, with a minimum of 18 and a maximum of 70 (SD = 15.5).
163 The healthy control group (n = 28) consisted of women with an average age of 49.8 (range 33-71 ± 7.2).

164
165 **Differentiation of sera based on sulfhydryl quantification**

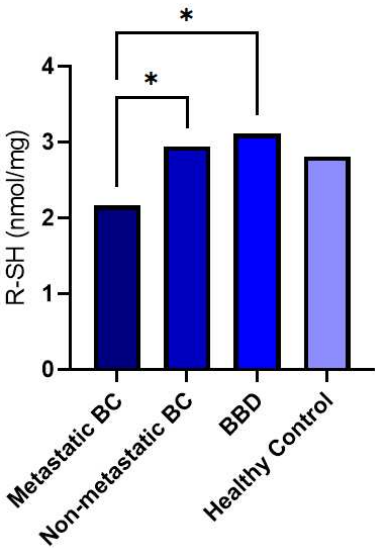
166 Table 3 displays the sulfhydryl levels detected in the serum samples. Significantly, there was a discernible
167 difference in the content identified among the various groups ($p = 0.018$).

168 Figure 2 graphically illustrates the quantification of sulfhydryl groups, highlighting that women with metastatic BC
169 exhibited the lowest levels of free R-SH in the serum. Post-hoc analysis reveals that this reduced concentration of
170 free R-SH was significantly lower than the levels observed in both the non-metastatic BC ($p = 0.034$) and the BBD
171 ($p = 0.023$) groups.

172
173 **Table 3.** Profile of sulfhydryl among women with metastatic BC, non-metastatic BC, BBD and healthy control at a
174 university hospital in Minas Gerais, Brazil (n = 108).

Groups	Mean ± SD	Median (p25–p75)	p
Metastatic BC	2.166 ± 0.734	1.810 (1.709–2.452)	0.018
Non-metastatic BC	2.942 ± 0.985	2.751 (2.251–3.782)	
Benign Breast Disease	3.111 ± 1.280	3.058 (2.042–4.035)	
Healthy Control	2.812 ± 0.932	2.740 (1.964–3.510)	

175 SD, standard deviation; Kruskal-Wallis test + Dunn's multiple comparisons test.



176
177 **Figure 2.** Sulfhydryl levels in metastatic BC, non-metastatic BC, BBD and healthy control women. *, denotes
178 statistical difference between the two highlighted groups; Kruskal-Wallis test + Dunn's multiple comparisons test.

Investigating factors contributing to the reduced free R-SH levels

In the pursuit of investigating some factors that may contribute to the reduction of free R-SH levels, the quantitative assessment of the tripeptide reduced glutathione (GSH) and the enzymatic activities of glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) was undertaken. Both enzymes are components of the glutathione system and oxidize and reduce GSH, respectively.

Figure 3 and Table 4 present the obtained results. Notably, GSH levels did not vary significantly among the studied groups. Conversely, GPx levels manifested a discernible decrement in the groups of patients diagnosed with BC. Specifically, metastatic cases exhibited markedly diminished GPx levels in comparison to the healthy control group ($p < 0.01$). Non-metastatic cases similarly demonstrated lower GPx levels than both BBD ($p < 0.01$) and healthy control groups ($p < 0.01$). Thus, the group comprising healthy women showcased the highest GPx levels, thereby significantly distinguishing itself from the BBD group ($p < 0.01$).

However, there was a difference in GR levels only between the non-metastatic and healthy control groups ($p < 0.01$).

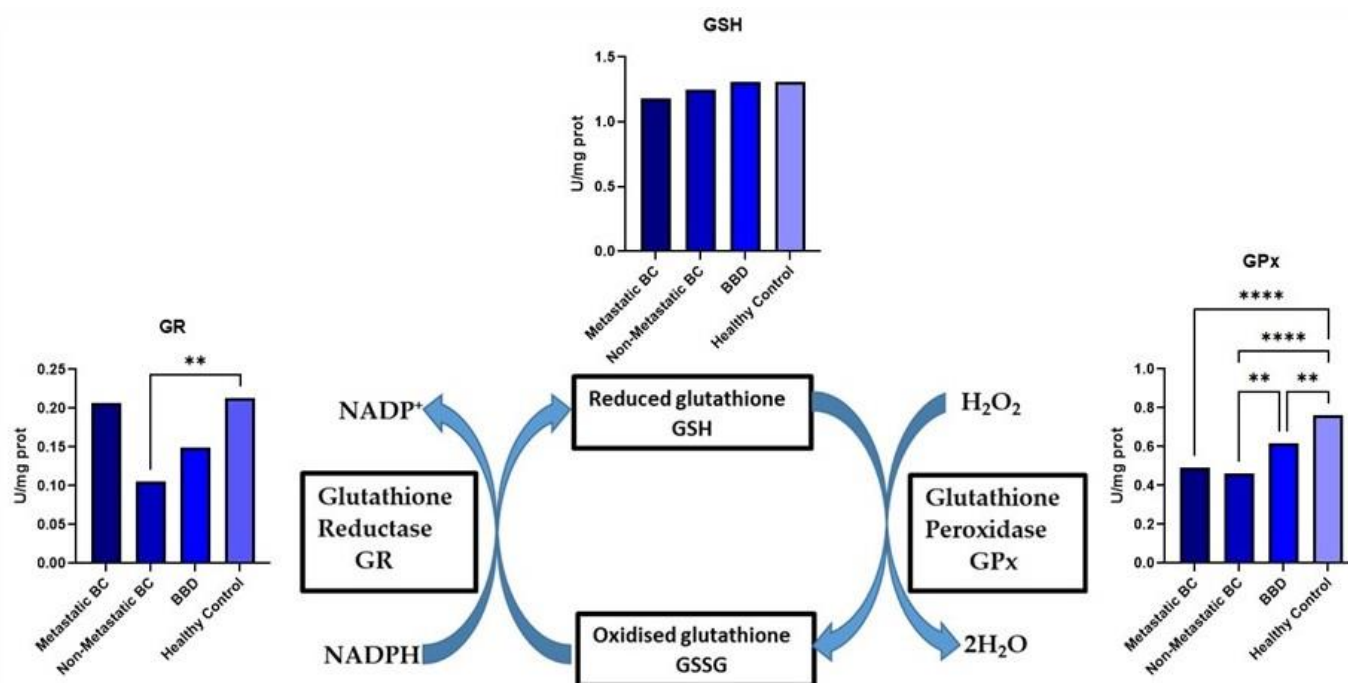


Figure 3. Glutathione system. Quantification of GSH and GR and GPx activity; *, denotes statistical difference between the two highlighted groups; Kruskal-Wallis test + Dunn's multiple comparisons test.

Table 4. Profile of GSH, GPx and GR among women with metastatic BC, non-metastatic BC, BBD and healthy control at a university hospital in Minas Gerais, Brazil (n = 108).

Groups	GSH ($p = 0.679^a$)		GPx ($p < 0.001^a$)		GR ($p = 0.008^a$)	
	Mean $\pm$ SD	Median (p25–p75)	Mean $\pm$ SD	Median (p25–p75)	Mean $\pm$ SD	Median (p25–p75)
Metastatic BC	1.178 $\pm$ 0.264	1.103 (0.996–1.395)	0.493 $\pm$ 0.185	0.500 (0.313–0.662)	0.207 $\pm$ 0.130	0.164 (0.111–0.263)
Non-Metastatic BC	0.248 $\pm$ 0.459	1.176 (0.951–1.468)	0.462 $\pm$ 0.167	0.457 (0.338–0.579)	0.105 $\pm$ 0.183	0.137 (0.077–0.181)
BBD	1.307 $\pm$ 0.431	1.181 (0.939–1.637)	0.620 $\pm$ 0.187	0.588 (0.457–0.784)	0.149 $\pm$ 0.068	0.143 (0.110–0.180)
Healthy Control	1.310 $\pm$ 0.427	1.265 (0.9043–1.599)	0.763 $\pm$ 0.117	0.759 (0.662–0.861)	0.213 $\pm$ 0.104	0.203 (0.131–0.285)

SD, standard deviation; ^a ANOVA test + Tukey's multiple comparisons test; ^o Kruskal-Wallis test + Dunn's multiple comparisons test.

Discussion

In the present study, we analyzed blood serum samples from women with metastatic BC, non-metastatic BC, BBD, and healthy control subjects. Quantification of free R-SH revealed significantly lower levels in metastatic BC patients in comparison to both the non-metastatic BC ($p = 0.034$) and BBD ($p = 0.023$) groups. Our goal was to explore markers of redox imbalance in women with BC.

Hence, the deficiency of free R-SH is significantly linked to advanced metastatic BC, indicating considerable potential as a readily measurable biomarker for monitoring BC patients. Furthermore, these compounds may be amenable to therapeutic interventions as many of the reactions it undergoes are reversible[10].

The nuances of oxidative stress often elude conventional quantification methods. The amino acid cysteine can be oxidized from 0% to 100%, with nuances existing between these two extremes[15]. In this context, the results contribute valuable insights to the existing body of knowledge, offering enhanced information for women undergoing palliative care due to metastatic BC.

Studies quantifying the levels of free R-SH in lung cancer patients have consistently revealed a significant reduction in comparison to healthy controls within blood samples, especially in advanced cases[16,17].

Furthermore, the median overall survival was shorter among patients with lower levels of free R-SH[16].

Numerous studies have established a connection between diminished antioxidant capacity and an increased risk of mortality, encompassing a wide range of causes, including cancer[18,19]. Although dietary intake represents a potential source of antioxidants, our current study did not encompass the collection of dietary data from the participants. Nevertheless, our research group has previously conducted a prospective study involving women with BC undergoing chemotherapy. In that investigation, we observed a progressive reduction in the overall antioxidant capacity of their diets throughout the treatment regimen, notably among individuals who subsequently developed post-treatment metastases[8]. In this way, it is beneficial to acknowledge that the level of free R-SH may also be influenced by external factors, such as an antioxidant-rich diet or supplementation. Therefore, other aspects need to be taken into account and discussed to enable the implementation of protocols aiming to utilize R-SH analyses in clinical practice.

Individuals receiving palliative care in advanced stages of BC may manifest cachexia, characterized by a reduction in skeletal muscle mass. As elucidated by Fearon et al.[20], cancer cachexia represents a multifactorial syndrome involving continuous loss of skeletal muscle, with or without concurrent loss of adipose tissue, exhibiting limited reversibility and resulting in a progressive decline in functional capacities. Consequently, this condition leads to difficulty in maintaining redox balance (R-SH levels). However, analyses performed by subdividing the metastatic BC group into cachectic and non-cachectic subgroups did not reveal differences in terms of sulfhydryl quantification (data not shown).

The quantification of GSH did not differ between the groups, even with the enzyme GR activity being lower in the non-metastatic group compared to the healthy control group. This suggests that an adaptation occurred to maintain GSH levels. The dependence of GR on FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) and NADPH to reduce GSSG to GSH could be the reason for the lower activity in non-metastatic patients. The activity of the GPx enzyme was lower in the blood of BC patients when compared to the BBD and healthy control groups. This may occur due to the dysregulation of the antioxidant system.

In a previously conducted research, our research group observed an association between low GR activity and high transcription of IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF- α in women with BC [8]. These cytokines are pro-inflammatory, indicating that women with non-metastatic BC in the present study exhibit a more exacerbated immune response than women with advanced-stage BC in palliative care.

Human serum albumin (HSA) stands as the most abundant protein in serum, serving as the primary reservoir of free R-SH groups available for oxidation within the bloodstream, fulfilling an antioxidant role[21]. The interaction between HSA's R-SH groups and reactive oxygen species (ROS) leads to the formation of oxidized HSA. In a study by Inoue and colleagues (2018), it was demonstrated that HSA oxidation triggers NETosis, a process in which neutrophils produce web-like structures known as neutrophil extracellular traps (NETs). Notably, these NETs were found to facilitate the adhesion of circulating tumor cells, shedding light on how the reduction in free R-SH favors the initiation and perpetuation of metastatic processes[22].

Nevertheless, while these findings hold promise and offer new insights for BC monitoring, it is imperative to acknowledge that this research represents just the initial step. Subsequent studies are necessary to validate and expand upon our results. These studies should aim to establish the optimal threshold of free R-SH for improved outcomes and investigate whether low levels of R-SH are a causative factor or a consequence of poorer prognoses. Additionally, it is key to investigate the clinical applicability of the findings in a larger patient cohort. Finally, the free R-SH content emerges as a significant attribute warranting attention in the serum of women with metastatic BC. These findings affirm our initial hypothesis, indicating a heightened redox imbalance within the metastatic patient group.

Conclusion

In conclusion, this study has explored lower free R-SH levels as natural molecular signatures significantly associated with metastatic BC. Collectively, our findings present a promising monitoring strategy for individuals with metastatic BC.

References

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, CA. Cancer J. Clin. 71 (2021) 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [2] A.B. Mariotto, R. Etzioni, M. Hurlbert, L. Penberthy, M. Mayer, Estimation of the Number of Women Living with Metastatic Breast Cancer in the United States, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 26 (2017) 809–815. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0889>.
- [3] A.W. Lambert, D.R. Pattabiraman, R.A. Weinberg, Emerging Biological Principles of Metastasis, Cell 168 (2017) 670–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>.
- [4] A.T.F. Silva, C.M. Rodrigues, I.C.C. Ferreira, L.L.D. Santos, D.W. Santos, T.G. Araújo, P.P.L. Canto, C.E. Paiva, L.R. Goulart, Y.C.P. Maia, A Novel Detection Method of Breast Cancer through a Simple Panel of Biomarkers, Int. J. Mol. Sci. 23 (2022) 11983. <https://doi.org/10.3390/ijms231911983>.
- [5] Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer, Estimate 2023 – Cancer Incidence in Brazil, Rio de Janeiro, 2022.
- [6] D. Hui, C.E. Paiva, E.G. Del Fabbro, C. Steer, J. Naberhuis, M. Van De Wetering, P. Fernández-Ortega, T. Morita, S.-Y. Suh, E. Bruera, M. Mori, Prognostication in advanced cancer: update and directions for future research, Support. Care Cancer 27 (2019) 1973–1984. <https://doi.org/10.1007/s00520-019-04727-y>.
- [7] L.L.D. Santos, A.T.F. Silva, I.C.C. Ferreira, A.V. Souza, A.B. Justino, D.W. Santos, L.R. Goulart, C.E. Paiva, F.S. Espindola, Y.C.P. Maia, A Lower Serum Antioxidant Capacity as a Distinctive Feature for Women with HER2+ Breast Cancer: A Preliminary Study, Cancers 14 (2022) 5973. <https://doi.org/10.3390/cancers14235973>.
- [8] L.L.D. Santos, I.D.D. Custódio, A.T.F. Silva, I.C.C. Ferreira, E. Marinho, D.C. Caixeta, A.V. Souza, R.R. Teixeira, T.G. Araújo, N. Shivappa, J. Hébert, C.E. Paiva, F.S. Espindola, L.R. Goulart, Y.C.P. Maia, Overweight Women with Breast Cancer on Chemotherapy Have More Unfavorable Inflammatory and Oxidative Stress Profiles, Nutrients 12 (2020) 3303. <https://doi.org/10.3390/nu12113303>.
- [9] A.R. Bourgonje, A.E. Abdule, M.F. Bourgonje, S.H. Binnenmars, S.J. Gordijn, M.L.C. Bulthuis, S. La Bastide-van Gemert, L.M. Kieneker, R.T. Gansevoort, S.J.L. Bakker, D.J. Mulder, A. Pasch, M.H. De Borst, H. Van Goor, Serum free sulfhydryl status associates with new-onset chronic kidney disease in the general population, Redox Biol. 48 (2021) 102211. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102211>.
- [10] L. Turell, R. Radi, B. Alvarez, The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes, Free Radic. Biol. Med. 65 (2013) 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.050>.
- [11] B.H. Nicolet, The Structure of Glutathione, Science 71 (1930) 589–590. <https://doi.org/10.1126/science.71.1849.589>.
- [12] K. Ulrich, U. Jakob, The role of thiols in antioxidant systems, Free Radic. Biol. Med. 140 (2019) 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035>.
- [13] F. Faul, E. Erdfelder, A.-G. Lang, A. Buchner, G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences, Behav. Res. Methods 39 (2007) 175–191. <https://doi.org/10.3758/BF03193146>.
- [14] M.Y. Aksenov, W.R. Markesbery, Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease, Neurosci. Lett. 302 (2001) 141–145. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01636-6).
- [15] J.N. Cobley, 50 shades of oxidative stress: A state-specific cysteine redox pattern hypothesis, Redox Biol. 67 (2023) 102936. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102936>.
- [16] N. Dirican, A. Dirican, O. Sen, A. Aynali, S. Atalay, H.A. Bircan, O. Oztürk, S. Erdogan, M. Cakir, A. Akkaya, Thiol/disulfide homeostasis: A prognostic biomarker for patients with advanced non-small cell lung cancer?, Redox Rep. 21 (2016) 197–203. <https://doi.org/10.1179/1351000215Y.0000000027>.

- [17] M.U. Sener, O. Sonmez, I.A. Keyf, O. Erel, M. Alisik, S. Bulut, Y. Erdogan, Evaluation of Thiol/Disulfide Homeostasis in Lung Cancer, *Turk. Thorac. J.* 21 (2020) 255–260. <https://doi.org/10.5152/TurkThoracJ.2019.19033>.
- [18] D. Aune, Plant Foods, Antioxidant Biomarkers, and the Risk of Cardiovascular Disease, Cancer, and Mortality: A Review of the Evidence, *Adv. Nutr.* 10 (2019) S404–S421. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz042>.
- [19] D. Aune, N. Keum, E. Giovannucci, L.T. Fadnes, P. Boffetta, D.C. Greenwood, S. Tonstad, L.J. Vatten, E. Riboli, T. Norat, Dietary intake and blood concentrations of antioxidants and the risk of cardiovascular disease, total cancer, and all-cause mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies, *Am. J. Clin. Nutr.* 108 (2018) 1069–1091. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy097>.
- [20] K. Fearon, F. Strasser, S.D. Anker, I. Bosaeus, E. Bruera, R.L. Fainsinger, A. Jatoi, C. Loprinzi, N. MacDonald, G. Mantovani, M. Davis, M. Muscaritoli, F. Ottery, L. Radbruch, P. Ravasco, D. Walsh, A. Wilcock, S. Kaasa, V.E. Baracos, Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus, *Lancet Oncol.* 12 (2011) 489–495. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70218-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70218-7).
- [21] F. Nakashima, T. Shibata, K. Kamiya, J. Yoshitake, R. Kikuchi, T. Matsushita, I. Ishii, J.A. Giménez-Bastida, C. Schneider, K. Uchida, Structural and functional insights into S-thiolation of human serum albumins, *Sci. Rep.* 8 (2018) 932. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19610-9>.
- [22] M. Inoue, R. Nakashima, M. Enomoto, Y. Koike, X. Zhao, K. Yip, S.H. Huang, J.N. Waldron, M. Ikura, F.-F. Liu, S.V. Bratman, Plasma redox imbalance caused by albumin oxidation promotes lung-predominant NETosis and pulmonary cancer metastasis, *Nat. Commun.* 9 (2018) 5116. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07550-x>.

Acknowledgements (not compulsory)

This study received financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil (CNPq Grant number: 409482/2021-8), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) Grant number: APQ-01339-21, CAPES and National Institute of Science and Technology in Teranostics and Nanobiotechnology–INCT–Teranano. Yara Cristina de Paiva Maia and Foued Salmen Espíndola are supported by a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais–FAPEMIG [Rede Mineira de Pesquisa Translacional em Imunobiológicos e Biofármacos no Câncer (REMITRIBIC, RED-00031-21)].

Author contributions statement

Conceptualization, L. L. D. S., F. S. E. and Y. C. P. M.; Formal analysis, L. L. D. S., A. T. F., I. C. C. F. and Y. C. P. M.; Funding acquisition, C. E. P. and Y. C. P. M.; Investigation, L. L. D. S., A. T. F., I. C. C. F., L. A. M., A. B. J., M. S. P., R. R. T., D. W. S. and Y. C. P. M.; Methodology, L. L. D. S., F. S. E. and Y. C. P. M.; Project administration, Y. C. P. M.; Resources, F. S. E. and Y. C. P. M.; Supervision, C. E. P., F. S. E. and Y. C. P. M.; Visualization, L. L. D. S. and Y. C. P. M.; Writing – original draft, L. L. D. S., A. T. F., I. C. C. F., L. A. M., A. B. J., M. S. P., R. R. T., D. W. S., P. P. L., C. E. P., F. S. E. and Y. C. P. M.; Writing – review & editing, L. L. D. S., A. T. F., I. C. C. F., L. A. M., A. B. J., M. S. P., R. R. T., D. W. S., P. P. L., C. E. P., F. S. E. and Y. C. P. M.

Competing interests: The author(s) declare no competing interests.

Conclusão

- Foi possível revisar os principais tópicos relacionados ao estado redox e CM;
- A análise dos números de onda do espectro infravermelho obtidos por ATR-FTIR e sua correlação com os níveis dos marcadores de status redox GSH, SOD, CAT, FRAP e proteína carbonilada entre mulheres com CM HER2+, CM HER2- e DBM demonstrou que a menor capacidade antioxidante é uma característica importante no soro de mulheres com CM HER2+, distinguindo-as dos demais grupos estudados;
- As alterações em termos bioquímicos que ocorrem no soro de mulheres com CM HER2+, como resultado da escassez de antioxidantes, estão relacionadas a uma impressão digital única no espectro infravermelho obtido por ATR-FTIR;
- Foi observado um pior desbalanço redox em mulheres com CM HER2+, quando comparadas à mulheres com CM HER2- ou DBM.
- Menores níveis de R-SH livre revelaram-se uma assinatura molecular significativamente associada ao CM metastático;
- Coletivamente, os resultados obtidos nessa tese, apresentam uma estratégia promissora para monitoramento, triagem e prognóstico de indivíduos com CM. Espera-se que no futuro assinaturas moleculares relacionadas à processos redox indiquem a necessidade de modificações na terapia ou intervenções ao longo do tratamento do CM.

Perspectivas

- Avaliação nutricional de mulheres com CM em cuidados paliativos, para estudo da Capacidade Antioxidante Total da Dieta (CATd) e Índice Inflamatório da Dieta.
- Análise de marcadores inflamatórios na corrente sanguínea, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , comparando os resultados obtidos nos grupos CM, DBM e controle saudável.
- Quantificação de pontes dissulfeto e sua relação com a quantificação de sulfidril.
- Comparação de resultados de ATR-FTIR com diferentes amostras (soro, saliva e tecido) para o desenvolvimento de um modelo preditivo para desbalanço redox.

Anexos

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE MATERIAIS BIOLÓGICOS POR MEIO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS PARA DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES EM MULHERES COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS.

Pesquisador: Yara Cristina de Paiva Maia

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 31626620.2.0000.5152

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.047.065

Apresentação do Projeto:

Segundo os pesquisadores:

O objetivo deste estudo consiste em determinar se a análise dos materiais biológicos (soro, plasma, tecido e saliva) por meio de técnicas espectroscópicas e espectrométricas poderão ser utilizada para discriminar mulheres com neoplasia benigna de mama de neoplasias malignas de acordo com características específicas da assinatura espectral de sua composição molecular. Estes materiais serão enviados para o Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, ficarão sob a responsabilidade dos pesquisadores responsáveis por essa pesquisa e descartados, após realizarmos as análises, ao final do estudo, conforme orienta a resolução CNS 441/11 que regulamenta biorrepositórios. As variáveis quantitativas serão submetidas ao teste Kolmogorov-Smirnov para verificar o grau de aderência e distribuição normal. O tratamento e a análise de dados serão realizadas utilizando os programas GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) e o Statistical Package of Social Science versão 21.0 (SPSS, IBM, Chicago, IL, USA).

Estas pacientes serão acompanhadas durante o tratamento no hospital de Clínicas de Uberlândia, sendo divididas em cinco grupos. O grupo “adjuvante” (termo utilizado em oncologia para o grupo de mulheres que serão submetidas às terapias cirúrgicas antes de receber a quimioterapia); o

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4131

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 4.047.065

grupo “neoadjuvante” (termo utilizado em oncologia para designar o grupo de mulheres que realizarão a quimioterapia antes da cirurgia); o grupo “menor risco” será composto por mulheres que realizarão a cirurgia, mas não precisarão receber a quimioterapia pela característica do tumor; o grupo de “doença benigna da mama” – DBM será composto por mulheres que, após a cirurgia, apresentarem fibroadenoma, hiperplasia ductal atípica, papiloma ou outras doenças benignas da mama. O grupo “controle” composto de mulheres que farão cirurgia plástica e que após resultado histopatológico não apresentarem qualquer alteração da mama. Estes procedimentos já são indicações e práticas comuns realizadas pelos médicos responsáveis do Hospital das Clínicas de Uberlândia (HCU-UFU) e nenhuma intervenção terapêutica será realizada nesta pesquisa. As participantes que comporão os grupos “adjuvante”, “menor risco”, “doença benigna da mama” e “controle” serão recrutadas no setor Clínica Cirúrgica – Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas ou Centro Cirúrgico do Hospital de Clínicas de Uberlândia em momento anterior à realização da cirurgia. Já o grupo “neoadjuvante” será recrutado no Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do HCU-UFU quando a paciente tiver consulta agendada com o oncologista. Nesses momentos, será apresentada a pesquisa e as dúvidas serão esclarecidas.

No primeiro momento do estudo: os grupos adjuvante, menor risco, doença benigna da mama e controle, haverá coleta de sangue (10mL) e tecido, sem prejudicar os procedimentos habituais do HCU-UFU. A saliva (2mL) será coletada apenas para a pesquisa, porém trata-se de um procedimento simples e não invasivo, onde a coleta ocorre apenas por meio de um algodão inserido na boca da participante por 3 minutos. Para o grupo neoadjuvante a coleta de sangue (10mL) e saliva (2mL) será apenas para a pesquisa, mas para coleta de sangue será aproveitada a punção realizada para fazer exames de acompanhamento da participante, dessa forma evitando que a mesma tenha o desgaste de realizar uma nova punção apenas para a pesquisa. No segundo momento: para os grupos adjuvante, menor risco e doença benigna da mama, a coleta de sangue (10mL) e saliva (2mL) será realizada apenas para a pesquisa, mas aproveitaremos a punção realizada para fazer exames de acompanhamento da paciente para a coleta do sangue, dessa forma evitando que a participante tenha o desgaste de realizar uma punção apenas para a pesquisa. Para o grupo neoadjuvante, a coleta de sangue (10mL) e tecido será realizada no momento da cirurgia e a saliva (2mL) será coletada apenas para a pesquisa. No terceiro momento: para o grupo neoadjuvante e adjuvante, a coleta de sangue (10mL) e saliva (2mL) será realizada no momento em que a participante for realizar exames de acompanhamento, aproveitando assim a punção e dessa forma evitando que a participante tenha o desgaste de realizar uma punção

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4131

E-mail: cep@propp.ufu.br

apenas para a coleta de sangue para a pesquisa.

Serão incluídas no estudo as pacientes que recorrerem ao Hospital de Clínicas de Uberlândia, com idade superior a 18 anos, possuírem capacidade física, verbal e cognitiva para responder os questionários. O delineamento do estudo será analítico, observacional e prospectivo. A confirmação de cada diagnóstico para critério de inclusão nos grupos será; por exame clínico e histopatológico.

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com os pesquisadores:

Objetivo Primário:

Analisar a constituição química de fluidos e tecidos biológicos de mulheres com neoplasias mamárias, a fim de determinar biomarcadores para fins de diagnóstico, prognóstico e monitoramento dos tumores de mama.

Objetivo Secundário:

Mensurar grupos funcionais dos constituintes séricos, salivares e teciduais tumorais a partir das técnicas espectroscópicas: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Espectrofotometria RAMAN e Espectrometria de massa;

Identificar diferenças bioquímicas entre os fluidos e tecidos biológicos de mulheres com neoplasias mamárias malignas e benignas;

Correlacionar as características clínicas, hormonais e terapêuticas das mulheres com neoplasias de mama com a constituição química dos fluidos (saliva e sangue periférico) e dos tecidos tumorais;

Determinar e avaliar possíveis marcadores biológicos com a finalidade diagnóstica, prognóstica e de monitoramento das neoplasias mamárias e de sua terapêutica;

Obter subsídios para o desenvolvimento de uma técnica de baixo custo e risco e com maior agilidade e efetividade por meio de plataformas miniaturizadas para diagnóstico, prognóstico e

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4131

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 4.047.065

monitoramento da evolução das neoplasias mamárias.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora:

Riscos:

Os riscos da pesquisa consistirão nos sujeitos de pesquisa estarem sujeitos a um leve hematoma ou desconforto no local da punção sérica, porém o procedimento será realizado por profissionais qualificados e devidamente treinados. Outro risco relacionado à coleta dos materiais biológicos, será o fato da participante fornecer a saliva em tubos apropriados o que poderá causar um certo desconforto, mas isso será minimizado por meio da agilidade do processo. Há ainda o risco da exposição e identificação da participante, porém o sujeito de pesquisa e os grupos serão identificados por códigos alfanuméricos para sua proteção ética. Dessa forma, a equipe pesquisadora compromete-se com o sigilo absoluto da identidade das participantes. Estes indivíduos serão informados que não terão nenhum gasto ou ganho financeiro em participar da pesquisa, apenas irão contribuir com o progresso dos métodos diagnósticos do câncer de mama.

Benefícios:

Os benefícios da pesquisa estão relacionados à aquisição de conhecimentos para o aprimoramento e refinamento dos métodos diagnósticos e de prognóstico do câncer de mama. Portanto, possíveis novos métodos mais fidedignos, rápidos, de baixo custo e risco poderão ser implementados a fim de orientar programas de prevenção, reduzindo a incidência da doença, bem como melhorar a terapêutica e o prognóstico das neoplasias mamárias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A relevância do estudo é estimar a carga de doença circulando ao longo do tempo pre e pós-tratamento, podendo permitir aos pesquisadores rastrear e descobrir novas mudanças nas células tumorais e lançando luz sobre alguns dos processos fundamentais que levam a um fenótipo agressivo, metástase e resistência as terapias atuais

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos (TCLE 1, 2 e 3) foram devidamente apresentados.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4131

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 4.047.065

Recomendações:

O CEP/UFU lembra que os pesquisadores devem considerar os decretos federais, estaduais e municipais referente ao isolamento social causado pelo COVID-19. Se for necessário alteração no cronograma da pesquisa, uma EMENDA deverá ser apresentada ao CEP, solicitando e informando essa alteração.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto não apresenta óbices éticos.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Setembro de 2021.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Setembro de 2022.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Setembro de 2023.

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: Setembro de 2024.

* Tolerância máxima de 06 meses para atraso na entrega do relatório final.

Considerações Finais a critério do CEP:

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4131

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 4.047.065

Orientações ao pesquisador :

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1450254.pdf	08/05/2020 21:54:34		Aceito
Outros	Links.docx	08/05/2020 21:29:09	Alinne Tatiane Faria	Aceito
Outros	Questionario.pdf	08/05/2020 21:28:39	Alinne Tatiane Faria	Aceito
Outros	Declaracao_Instituicao_Coparticipante.jpg	08/05/2020 21:27:57	Alinne Tatiane Faria	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	08/05/2020 21:20:32	Alinne Tatiane Faria	Aceito

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4131

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 4.047.065

Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_COMPROMISSO_DA_EQ_UIPE_EXECUTORA.pdf	08/05/2020 21:20:02	Alinne Tatiane Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_03.pdf	08/05/2020 21:19:51	Alinne Tatiane Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_02.pdf	08/05/2020 21:19:42	Alinne Tatiane Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_01.pdf	08/05/2020 21:19:33	Alinne Tatiane Faria	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoAssinada.pdf	08/05/2020 21:19:22	Alinne Tatiane Faria	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLÂNDIA, 25 de Maio de 2020

Assinado por:
Karine Rezende de Oliveira
(Coordenador(a))

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLANDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4131

E-mail: cep@propp.ufu.br

SBBq & SBBf

2022

**51st Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology
46th Congress of the Brazilian Biophysical Society / LAFESB**

Águas de Lindóia, São Paulo
September 5th to 8th, 2022

Certificate

We hereby certify that the abstract entitled

**A LOWER SERUM ANTIOXIDANT CAPACITY AS A DISTINCTIVE FEATURE FOR WOMEN WITH HER2+
BREAST CANCER**

by authors: SANTOS, LLD, SANTOS, LLD, SILVA, ATF, FERREIRA, ICC, SOUZA, AV, JUSTINO, AB,
SANTOS, DW, GOULART, LR, PAIVA, CE, ESPINDOLA, FS, MAIA, YCP

was presented during the 51th Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular
Biology (SBBq) will be co-organized with the 46th Congress of the Brazilian Society of Biophysics
(SBBf) / LAFESB, from September 5-8 in the Convention Center of the Majestic Hotel in Águas de
Lindóia, SP.

Leda Quercia Vieira

*President of SBBq
Leda Quercia Vieira*

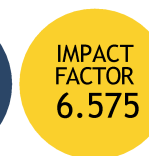
Rosângela Itri

*President of SBBf
Rosângela Itri*



cancers

an Open Access Journal by MDPI



CERTIFICATE OF ACCEPTANCE



Certificate of acceptance for the manuscript (cancers-2027565) titled:
A lower serum antioxidant capacity as a distinctive feature for women with HER2+ breast cancer: a preliminary study

Authored by:

Letícia Lopes Dantas Santos; Alinne Tatiane Faria Silva; Izabella Cristina Costa Ferreira; Adriele Vieira Souza;
Allisson Benatti Justino; Donizeti Willian Santos;
Luiz Ricardo Goulart; Carlos Eduardo Paiva; Foued Salmen Espindola; Yara Cristina Paiva Maia

has been accepted in *Cancers* (ISSN 2072-6694) on 29 November 2022



Academic Open Access Publishing
since 1996

Basel, November 2022

SAU - SERVIÇOS DE APOIO AOS USUÁRIOS

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que LETÍCIA LOPES DANTAS SANTOS esteve no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - Sírius - LNLS-SIRIUS, entre os dias 11/12/2022 a 16/12/2022 realizando medidas como pesquisador(a) pela proposta de pesquisa abaixo:

Proposta de Pesquisa	Título	Data de Realização
IMBUA-20221632	Smart Prognosis: new approach using the FTIR platform for breast cancer	11/12/2022 a 16/12/2022

Atenciosamente,



Serviços de Apoio aos Usuários

The Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM) is a private, non-profit organization overseen by the Ministry of Science, Technology, and Innovation (MCTI). Address: Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000 - Polo II de Alta Tecnologia - Caixa Postal 6192 - 13083-100 Campinas/SP | Phone: +55.19.3512.1000 | diretoriageral@cnpem.br | www.cnpem.br



The Officers and Council of the
SfRBM Society for Redox
Biology and Medicine

are pleased to recognize

Leticia Lopes Dantas Santos,

as a recipient of a

Travel Award

at the 30th Annual Conference
of the Society for Redox Biology and Medicine

Established in 1987, SfRBM is a professional organization comprised of scientists and clinicians
investigating redox biology, a unifying theme in the pathophysiology of human diseases.

November 18, 2023

Date

Francisco Laurindo, MD, PhD, President