

Investigação dos perfis metabólicos e lipídicos associados à progressão das lesões de alto grau do câncer de colo de útero: uma abordagem multi-ômica integrativa

Giovanna Melo Marques; Universidade Federal do Amazonas; giovannamarques1111@gmail.com;
Luana Quadros de Souza Leão; Universidade Federal do Amazonas;
Adriano de Souza Carolino; Universidade Federal do Amazonas;
Anderson Ferreira Gonçalves; Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas;
Zeliene Araújo de Souza; Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas;
Marina Amaral Alves; Universidade Federal do Rio de Janeiro; Rio de Janeiro;
Rafael Garrett da Costa; Universidade Federal do Rio de Janeiro; Rio de Janeiro
Priscila Ferreira de Aquino; Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia.

1. Introdução

O câncer de colo de útero (CCU) ainda permanece sendo um relevante desafio para a saúde pública, apesar dos avanços em programas de rastreamento e prevenção. No Brasil, esta neoplasia ocupa a terceira posição dentre os cânceres mais diagnosticados entre a população feminina e figura entre as principais causas de morbimortalidade, com 15,38 novos casos estimados a cada 100 mil mulheres para o triênio de 2023-2025. No estado do Amazonas, esse cenário é ainda mais alarmante, com taxas de incidência acima da média nacional, alcançando 27,63 casos por 100 mil mulheres¹.

Esse carcinoma é antecedido por lesões denominadas como neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs), classificadas histopatologicamente em lesão cervical de baixo grau (NIC 1) e alto grau (NIC 2 e NIC 3), conforme as alterações morfológicas no epitélio cervical². Embora os métodos de rastreamento convencionais sejam a principal estratégia de detecção precoce do CCU, metodologias que permitam elucidar os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento das NICs têm se consolidado na pesquisa biomédica, especialmente visando identificar alvos para diagnóstico, prognóstico e aprimoramento de estratégias de rastreamento³.

Dentre essas abordagens, a metabolômica e a lipidômica vêm sendo amplamente aplicadas nos estudos oncológicos na investigação de possíveis alterações metabólicas e lipídicas associadas à progressão neoplásica, oferecendo um panorama direto e único das alterações patológicas e das redes regulatórias celulares mediadas por esses metabólitos e lipídios^{4,5}.

Assim, esse estudo tem como finalidade investigar os mecanismos moleculares de progressão das lesões pré-cancerígenas do câncer de colo de útero através de uma abordagem ômica integrativa.

2. Material e Métodos

Comitê de ética em pesquisa (CEP): Este projeto é integrado ao estudo intitulado “Avaliação das características epidemiológicas e moleculares de mulheres tratadas com lesões precursoras do câncer de colo de útero no Amazonas”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Centro de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON) sob nº de parecer 2.372.935.

Seleção de pacientes e coleta de amostras: Foram selecionadas 24 mulheres com idade acima de 18 anos, com laudo histopatológico de neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC 2 ou NIC 3) e que tiveram indicação cirúrgica para o procedimento de conização. Destas pacientes, foram coletadas 48 amostras de tecido cervical (cerne da lesão e suas margens adjacentes) pela equipe clínica da Fundação CECON durante o procedimento cirúrgico.

Análise metabolômica/lipidômica: As amostras foram submetidas ao processo de maceração congela-descongela e em seguida à extração tipo *Matyash*⁶, no qual foi utilizado um sistema bifásico (éter metil-terc-butilico/metanol/água) para extrair os metabólitos e lipídios. Os tecidos foram processados e analisados pelo sistema de cromatografia líquida Dionex Ultimate 3000 UHPLC acoplado ao espectrômetro de massas Q Exactive Plus (*Thermo Fisher Scientific*), com fonte de ionização por *electrospray* (ESI). A obtenção dos espectros de massas foi realizada por meio do programa Xcalibur (*Thermo-Scientific*).

Análise de dados: Os dados obtidos foram processados no software MS-DIAL v.4.9 para detecção, alinhamento e anotação de compostos, utilizando as bibliotecas MONA e MS/MS default. Foram considerados espectros com similaridade >70%. Adicionalmente, a análise estatística multivariada dos perfis metabólicos e lipídicos foi realizada através da linguagem de programação estatística R (versão 4.3.1)

3. Resultados e Discussão

Inicialmente, as amostras foram submetidas à análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), com o objetivo de verificar possíveis perfis de metabólitos/lipídios discriminantes. O método revelou uma sobreposição no agrupamento das margens e lesões de NIC 2 e NIC 3 no estudo metabolômico e lipidômico (Figura 1), apesar de todas as pacientes apresentarem laudo histopatológico de margens livres de lesão. Essas sobreposições indicam uma semelhança nos perfis entre as amostras, o que sugere uma possível recidiva ou recorrência precoce da lesão. Fenômenos já relatados em estudos anteriores, mesmo em casos de pacientes com margens cirúrgicas consideradas livres⁷.

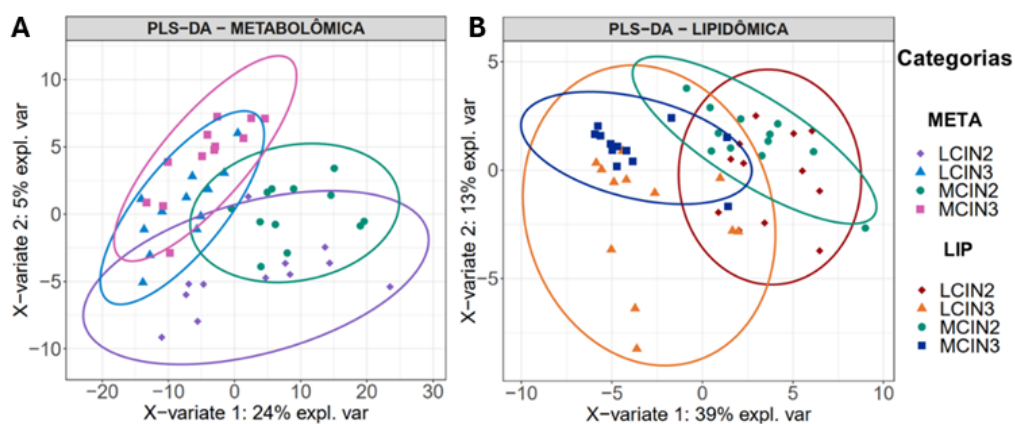


Figura 1 - PLS-DA das amostras de NIC 2 – lesão (roxo) e margem (verde), NIC 3 – lesão (azul) e margem (rosa) na abordagem metabolômica (A) e das amostras de NIC 2 - lesão (vermelho) e margem (verde), NIC 3 - lesão (amarelo) e margem (azul) na abordagem lipidômica (B).

Considerando o padrão de similaridade observado, optou-se por realizar a análise por PLS-DA das amostras de NIC 2 e NIC 3, agrupando as categorias de margem e lesão. Os resultados evidenciaram que não houve sobreposição entre os tecidos cervicais em ambos os estudos, com acurácia excelentes (AUC=1 para metabolômica e AUC= 0,95 para lipidômica) na distinção das categorias (Figura 2).

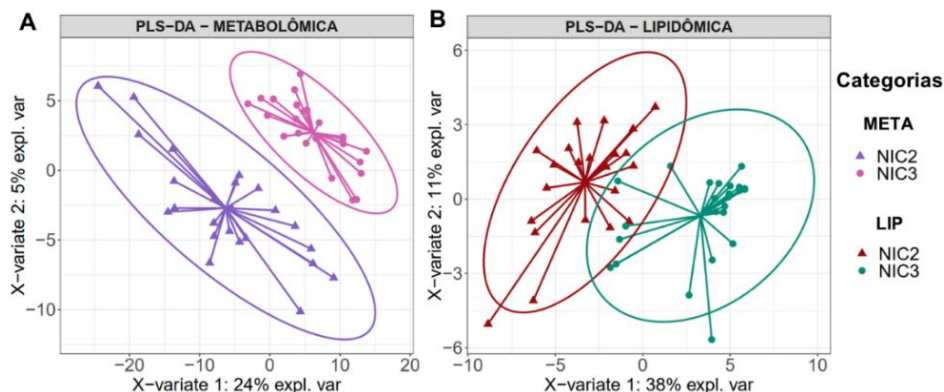


Figura 2 – PLS-DA das amostras de NIC 2 (roxo) e NIC 3 (rosa) na abordagem metabolômica (**A**) e NIC 2 (vermelho) e NIC 3 (verde) das amostras na abordagem lipidômica (**B**).

Adicionalmente, foi possível identificar as variáveis de impacto (metabólitos e lipídios) que contribuem para a diferenciação entre as categorias evidenciada no PLS-DA (Figura 2). Dentre os compostos discriminantes, destacam-se os metabólitos N-acetil-L-glutamina e ácido succínico, bem como os lipídios TG 49:1 e TG 48:0, mais abundantes em NIC 2. Em contraste, os metabólitos sacarina e pseudouridina e os lipídios SE 24:1;O4 e Cer 42:1;O3 foram mais prevalentes nas amostras de NIC 3.

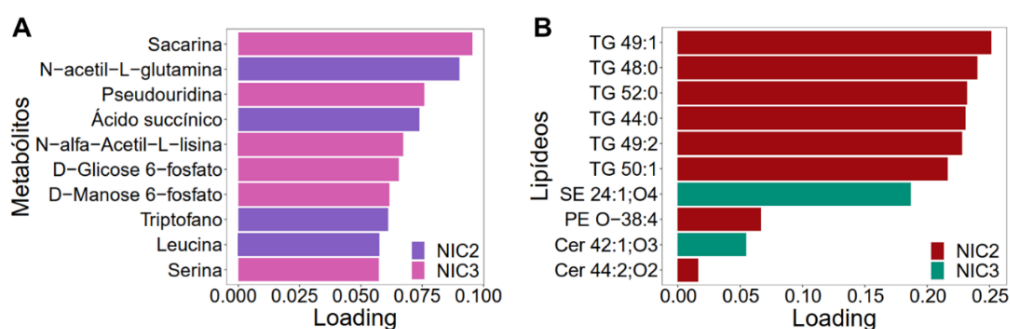


Figura 3 – *Loadings* referentes as variáveis de maior impacto com a componente 1 e 2 das amostras contendo os metabólitos (**A**) e contendo os lipídios (**B**).

Posteriormente, foi realizada a integração dos dados das abordagens ômicas através da análise de correlação de Pearson (Figura 3), a qual revelou correlações significativas entre os perfis de metabólitos e lipídios das amostras de NICs.

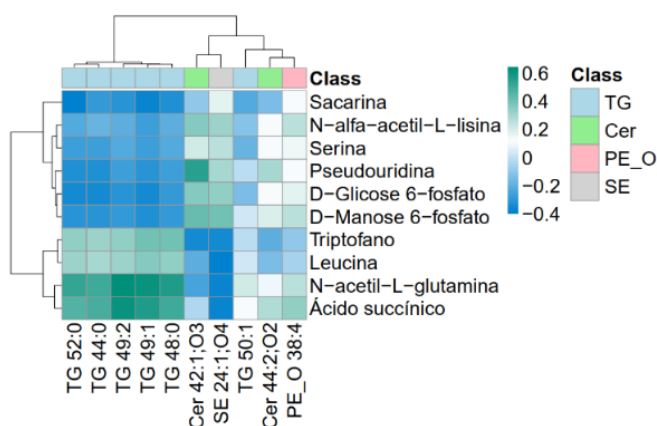


Figura 3 - Análise de correlação de Pearson representada em mapa de calor (*heatmap*). As colunas correspondem aos lipídios diferencialmente expressos e as linhas aos metabólitos identificados. Os gradientes de cor indicam os coeficientes de correlação que variam de 0.6 (correlação positiva) a -0.4 (correlação negativa).

Observou-se uma correlação positiva entre triglicerídeos (TGs) e os metabólitos triptofano e ácido succínico, os quais foram mais abundantes em NIC 2. Os TGs constituem a principal reserva energética das células e participam ativamente nos mecanismos carcinogênicos⁸, enquanto o triptofano atua na via da quinurenina, a qual está associada à repressão das respostas imunes antitumorais⁹. O ácido succínico, por sua vez, pode influenciar tanto a resposta imune quanto a tumorigênese, embora também seja descrito como indutor de apoptose em alguns cânceres^{10,11}. Essa associação pode indicar um ambiente metabólico ativo, capaz de influenciar processos inflamatórios e carcinogênicos. Achado interessante, visto que as lesões cervicais moderadas apresentam caráter dinâmico, e podem regredir para NIC 1 ou progredir para NIC 3¹². Nesse sentido, a correlação observada, relacionada tanto a respostas imune quanto à tumorigênese, pode ser indicativo do comportamento de NIC 2.

Ademais, a análise revelou correlações positivas entre ceramidas e os metabólitos serina e pseudouridina. A serina é uma precursora fundamental para a biossíntese de proteínas, nucleotídeos e lipídios, enquanto as ceramidas e pseudouridina são associadas à regulação da sinalização intracelular e em processos como apoptose e autofagia, contribuindo para a proliferação descontrolada das células cancerígenas. Desse modo, essa associação sugere possíveis relações entre esses compostos e a progressão das lesões cervicais, os quais foram mais abundantes em NIC 3¹²⁻¹⁴.

Diante do exposto, os resultados evidenciam correlações relevantes entre o metaboloma e o lipidoma de lesões precursoras de alto grau do colo do útero e suas margens adjacentes. A integração desses dados por meio da análise de correlação de Pearson aponta interações bioquímicas significativas, contribuindo para a compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão dessas neoplasias.

4. Conclusões

O estudo revelou similaridades entre os perfis moleculares de margem e lesão em ambas as NICs, sugerindo possível recorrência da neoplasia. Contudo, evidenciou diferenciação significativa entre os tecidos de NIC 2 e NIC 3, destacando metabólitos e lipídios discriminantes, como N-acetil-L-glutamina e TG 49:1 em NIC 2, e sacarina e SE 24:1;O4 em NIC 3. Além disso, foram identificadas correlações positivas entre lipídios e metabólitos associadas à progressão tumoral e resposta imunológica frente às alterações neoplásicas, evidenciando interações metabólicas e lipídicas que contribuem para a compreensão dos mecanismos subjacentes às lesões cervicais de alto grau.

Desse modo, através deste estudo foi possível explorar a inter-relação presente nos conjuntos de dados multi-ômicos (metabolômica e lipidômica), com enfoque nas NICs de alto grau. Assim, os resultados obtidos demonstram características moleculares relevantes que podem contribuir para uma compreensão mais aprofundada da progressão das neoplasias intraepiteliais de alto grau.

Palavras-Chave: Neoplasias intraepiteliais cervicais; metabolômica; lipidômica; espectrometria de massas.

Agradecimentos

Às pacientes voluntárias, ILMD-Fiocruz Amazônia, UFAM, FCECON, LabMeta (LADETEC-UFRJ), Meta2MS, LabYM, PPSUS/FAPEAM/Secretaria do Estado de Planejamento, Desenvolvimento, Ciência e Tecnologia/Governo do Estado do Amazonas, CNPq e Capes.

Divulgação

Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, o Congresso Pan-Amazônico de Oncologia detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação deste resumo, por meio eletrônico.

Referências

1. INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; 2023.
2. Øvestad IT, Engesæter B, Halle MK, Akbari S, Bicskei B, Lapin M, Austdal M, et al. High-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) associates with increased proliferation and attenuated immune signaling. *Int J Mol Sci.* 2022;23:373.
3. Kocheturov A, Pardalos PM, Karakitsiou A. Massive datasets and machine learning for computational biomedicine: trends and challenges. *Ann Oper Res.* 2019;276:5–34.
4. Cheng F, et al. A serum lipidomic strategy revealed potential lipid biomarkers for early-stage cervical cancer. *Life Sci.* 2021;60:118489.
5. Nam M, et al. Comparable plasma lipid changes in patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia and patients with cervical cancer. *J Proteome Res.* 2021;20:740–750.
6. Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia TV, Shevchenko A, Schwudke D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J Lipid Res.* 2008;49:1137–1146.
7. Alder S, Megyessi D, Sundström K, Östensson E, Mints M, Belkić K, et al. Incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia as a predictor of the risk of recurrent disease—a 16-year follow-up study. *Am J Obstet Gynecol.* 2020;222:172.e1–172.e12.
8. Martin-Perez M, Urdiroz-Urricelqui U, Bigas C, Benitah SA. The role of lipids in cancer progression and metastasis. *Cell Metab.* 2022;34:1675–1699.
9. Opitz CA, Somarribas Patterson LF, Mohapatra SR, Dewi DL, Sadik A, Platten M, et al. The therapeutic potential of targeting tryptophan catabolism in cancer. *Br J Cancer.* 2020;122:30–44.
10. Kuo CC, Wu JY, Wu KK. Cancer-derived extracellular succinate: a driver of cancer metastasis. *J Biomed Sci.* 2022;29:93.
11. Kasarci G, Ertugrul B, Iplik ES, Cakmakoglu B. The apoptotic efficacy of succinic acid on renal cancer cell lines. *Med Oncol.* 2021;38(12):144.
12. Nourrisson A, Lepetit H, Marty M, Garrigue I, Brun JL. Regression of cervical high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL/CIN2) managed expectantly. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2022;51:102442.
13. Alizadeh J, da Silva Rosa SC, Weng X, Jacobs J, Lorzadeh S, Ravandi A, et al. Ceramides and ceramide synthases in cancer: focus on apoptosis and autophagy. *Eur J Cell Biol.* 2023;102:151337.
14. Liu K, Zhang S, Liu Y, Hu X, Gu X. Advancements in pseudouridine modifying enzyme and cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1465546.
15. Handzlik MK, Metallo CM. Sources and Sinks of Serine in Nutrition, Health, and Disease. *Annu Rev Nutr.* 2023;43:123–51.