

O efeito Warburg em carcinoma de pulmão de pequenas células: caracterização da expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico em amostras preservadas em meio líquido

The Warburg effect in small cell lung cancer: characterization of the expression of proteins related to the glycolytic metabolism in small cell lung cancer

Ayra Daneluzzi Quinelato^{1,2}, Murilo Bonatelli², Patrik da Silva Vital², Eduardo Caetano Albino da Silva³, Paula Roberta Pastrez², Adhemar Longatto-Filho^{2,4,5,6}, Céline Pinheiro^{1,2}

¹Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata - FACISB, São Paulo, Brasil

²Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, Hospital de Câncer de Barretos, São Paulo, Brasil

³Departamento de Patologia, Hospital de Câncer de Barretos, São Paulo, Brasil

⁴Laboratório de Patologia Hepática (LIM14), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brasil

⁵Instituto de Investigação em Ciências da Vida e da Saúde (ICVS), Escola de Medicina, Universidade do Minho, Braga, Portugal

⁶ICVS/3B's-PT Laboratório Associado, Braga/Guimarães, Portugal

RESUMO

Introdução: O câncer de pulmão de pequenas células (CPPC) afeta, em média, 200.000 pessoas no mundo, anualmente, correspondendo a 15-20% de todos os cânceres de pulmão. De forma geral, os tumores sólidos reprogramam o seu metabolismo aumentando a dependência na glicólise, mesmo em condições aeróbicas (efeito Warburg), sendo uma das características fundamentais do câncer. Esta reprogramação envolve o aumento da expressão das proteínas MCT1, MCT4, GLUT1 e CA9, entre outras. **Objetivo:** Avaliar a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico em amostras de CPPC preservadas em meio líquido. **Material e Métodos:** Foram incluídos 45 pacientes com diagnóstico de CPPC, submetidos à lavagem brônquica em ambos os pulmões, cujas amostras (normal e tumoral) foram armazenadas em meio líquido (BD SurePath®). A expressão das proteínas MCT1, MCT4, GLUT1 e CA9 foi avaliada por imunocitoquímica (ICQ) em cell blocks, seguida de avaliação por patologista e, por fim, análise estatística. **Resultados:** Foi observada uma perda importante de amostras durante a construção dos cell blocks, na ICQ e por falta de representatividade celular. Das amostras remanescentes, 1 amostra tumoral (12,5%) foi positiva para MCT1, 2 amostras normais (9,1%) e 2 tumorais (14,3%) foram positivas para MCT4, 1 amostra normal (4,2%) e 3 amostras tumorais (21,4%) foram positivas para GLUT1 ($p=0,043$) e 1 amostra tumoral (7,1%) foi positiva para CA9. Devido ao reduzido número de casos positivos, não foi possível verificar a existência de associações com os dados clínicos e patológicos dos pacientes. **Conclusão:** A expressão de MCT1, MCT4 e CA9 foi observada em poucas amostras, não sendo observada diferença entre amostras normais e tumorais. Para GLUT1, observou-se um aumento significativo da expressão citoplasmática nas amostras tumorais, comparando às normais.

Palavras-chave: Câncer de pulmão, citologia de base líquida, efeito Warburg, glicólise, lactato, metabolismo.

ABSTRACT

Introduction: Small cell lung cancer (SCLC) affects an average of 200,000 people worldwide annually, corresponding to 15-20% of all lung cancers. In general, solid tumors reprogram their metabolism, increasing their dependence on glycolysis, even under aerobic conditions (Warburg effect), which is one of the hallmarks of cancer. **Aim:** To evaluate the expression of glycolysis-related proteins in SCLC samples preserved in liquid-based cytology media. **Material and Methods:** A total of 45 patients diagnosed with SCLC, submitted to bronchial lavage in both lungs, whose samples (normal and tumor) were stored in liquid base (BD SurePath™), were included in the study. The expression of MCT1, MCT4, GLUT1 and CA9 proteins was evaluated by immunocytochemistry (ICC) in cell blocks, followed by evaluation by a pathologist and, finally, statistical analysis. **Results:** An important loss of samples was observed during the construction of cell blocks, ICQ and due to lack of cell representation. Of the remaining samples, 1 tumor sample (12.5%) was positive for MCT1, 2 normal samples (9.1%) and 2 tumor samples (14.3%) were positive for MCT4, 1 normal sample (4.2%) and 3 tumor samples (21.4%) were positive for GLUT1 ($p=0.043$) and 1 tumor sample (7.1%) was positive for CA9. Due to the small number of positive cases, it was not possible to verify associations with the clinical and pathological data of the patients. **Conclusion:** The expression of MCT1, MCT4 and CA9 was observed in few samples, with no difference between normal and tumor samples. For GLUT1, a significant increase in cytoplasmic expression was observed in tumor samples, compared to normal samples.

Keywords: Glycolysis, lactate, liquid-based cytology, lung cancer, metabolism, Warburg effect.

INTRODUÇÃO

No mundo, em 2018, o câncer de pulmão foi classificado como a neoplasia mais comum¹. No Brasil, a estimativa do INCA é que entre os anos de 2020 a 2022 o câncer de pulmão seja o 5º mais incidente². O câncer de pulmão pode ser dividido em dois tipos histológicos principais: pequenas células (CPPC) e não-pequenas células (CPNPC). O CPPC é originado a partir de células precursoras neuroendócrinas e caracterizado por um crescimento acelerado³. O CPNPC pode ser diferenciado entre escamoso, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células. Dentre esses, apenas o carcinoma de grandes células não pode ser associado ao tabagismo⁴. O CPPC corresponde a 15-20% de todos os casos de carcinoma de pulmão detectados no mundo por ano. Possui como causa principal o tabagismo, sendo importante a intensidade e o tempo de fumo, e apresenta-se clinicamente através de sinais e sintomas como dispneia, tosse, dor torácica, fraqueza e emagrecimento. Além disso, é considerado um subtipo extremamente agressivo com necrose normalmente ampla e elevada atividade mitótica das células cancerígenas⁵. O diagnóstico do CPPC ocorre, geralmente, quando aparecem sintomas relacionados com a disseminação da doença por metástases. Através destes, inicia-se a busca pela confirmação do diagnóstico, que pode ser feita através de estudos citológicos de amostras colhidas por aspiração por agulha fina (FNA, do inglês *fine needle aspiration*), aspiração transbrônquica por agulha (TBNA, do inglês *transbronchial needle aspiration*), aspiração por agulha fina guiada por endoscópio (EUS-FNA, do inglês *endoscopic ultrasonography-guided fine-needle aspiration*) e estudos histológicos de amostras colhidas por biópsia broncoscópica⁶. Com a broncoscopia, é possível obter o lavado broncoalveolar (BAL, do inglês *bronchoalveolar lavage*), o qual, é geralmente, utilizado em doenças pulmonares de uma forma geral, visto possuir células suficientes para amostra citológica e molecular⁷. A citologia em meio líquido (SurePath®), uma técnica simples, rápida, efetiva e menos invasiva para os pacientes, é cada vez mais utilizada para colher e armazenar amostras de células tumorais. Já foi comprovada a alta acurácia da técnica em câncer de células escamosas esofágicas⁸, porém, seu maior uso continua sendo na colpocitologia oncótica⁹.

Há décadas, foi observado que tumores sólidos obtêm energia principalmente a partir da glicólise¹⁰, sendo esta característica reconhecida como um dos hallmarks do câncer¹¹. Em células normais, a metabolização de glicose em piruvato, geralmente ocorre a taxas relativamente reduzidas em ambientes com oxigênio, estando bastante aumentada em situações de diminuição da disponibilidade de oxigênio (glicólise anaeróbica), com conversão do piruvato em lactato¹². Porém, um estudo de Otto Warburg verificou que células neoplásicas são capazes de converter grandes quantidades de glicose em lactato, mesmo na presença de oxigênio¹⁰, fenótipo conhecido por glicólise aeróbica ou “efeito Warburg”¹³. Como consequência dessa reprogramação metabólica, as células tumorais geralmente apresentam importante aumento no consumo de glicose e na produção de lactato¹². Uma grande vantagem deste efeito é a geração de uma elevada quantidade de intermediários da via glicolítica que são desviados para vias metabólicas de biossíntese de moléculas como lipídios, proteínas e aminoácidos, indispensáveis para a proliferação e crescimento celular. O elevado consumo de glicose pelas células tumorais leva à produção de uma elevada quantidade de lactato que precisa ser retirado do meio intracelular de forma constante¹². O transporte de lactato para o meio extracelular é realizado pela família de transportadores de monocarboxilatos (MCTs), que é codificada pelos genes SLC16A, sendo atualmente composta por 14 genes^{14,15}. As isoformas 1 a 4 são responsáveis pelo transporte transmembranar de ácidos carboxílicos de cadeia curta, como piruvato e lactato, acoplado a um H⁺. Assim, as isoformas mais importantes no contexto da reprogramação metabólica das células tumorais são as isoformas 1 (MCT1) e 4 (MCT4), por estarem principalmente envolvidas no efluxo de lactato, estando a expressão destas proteínas aumentada em vários tipos de tumores e relacionada com piores prognósticos¹⁶. Cânceres primários e metastáticos possuem regulação positiva crescente de níveis intracelulares de glicose¹³. Para a obtenção desses níveis, há a necessidade de uma grande quantidade de transportadores de glicose (GLUTs), os quais compreendem as isoformas GLUT1 a GLUT5. Enquanto GLUT2, GLUT4 e GLUT5 existem em tecidos específicos, GLUT1 e GLUT3

são encontrados em quase todas as células humanas e são hiperexpressos em tumores¹⁷. Os MCTs não são as únicas proteínas envolvidas na regulação do pH intracelular das células tumorais. Neste contexto, surge a família de anidrases carbônicas, sendo a isoforma 9 (CA9) a mais descrita como associada a fenótipos tumorigênicos humanos¹⁸. Esta enzima converte CO₂ em H⁺ e HCO₃⁻, aumentando a acidificação extracelular, a qual favorece a progressão tumoral. Geralmente, encontra-se presente com maior frequência no período pré-natal; posteriormente, é encontrada apenas em tecidos especializados ou em tumores¹⁹.

O CPPC apresenta amplificação do gene MYC em 30% a 50% dos casos e perda de função do gene p53 em 90-100% dos casos²⁰. Estes genes estão relacionados a uma reprogramação metabólica das células tumorais, com a troca da predominância da fosforilação oxidativa mitocondrial pela glicólise, mesmo em condições aeróbicas²¹. De acordo, um estudo mostrou a expressão de GLUT1 em duas linhagens celulares derivadas de CPPC²². Um outro estudo observou que existe uma relação significativa entre o estágio do CPPC e os níveis de imunorreatividade de HIF-1 α , um importante regulador do metabolismo tumoral²³. Além disso, um estudo mais recente demonstrou que, em CPPC, os níveis do transportador de lactato MCT4 são aumentados em hipóxia, enquanto os níveis de MCT1 estão relacionados com piores prognósticos. Este mesmo estudo mostrou uma relação entre os níveis de MCT4 e CA9 reforçando, em CPPC, a relação do MCT4 com a ocorrência de hipóxia²⁴.

OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi caracterizar a expressão imunocitoquímica das proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico, MCT1, MCT4, GLUT1 e CA9, em amostras de câncer de pulmão de pequenas células preservadas em meio líquido.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes e dados clínicos e patológicos

O atual estudo foi baseado em um desenho longitudinal, observacional, com coleta retrospectiva. A população de estudo foi constituída por pacientes admitidos no Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII com diagnóstico de CPPC comprovado cito e/ou histopatologicamente. Foram incluídos neste estudo 45 pacientes diagnosticados com carcinoma de pulmão de pequenas células no Departamento de Tórax do Hospital de Câncer de Barretos, entre novembro de 2012 a novembro de 2015, com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos, sem relato de doença neoplásica pulmonar antecedente, com amostras obtidas por lavado broncoalveolar e conservadas em meio líquido (SurePath[®]) e que aceitaram participar no estudo com assinatura do TCLE. Os dados clínicos e patológicos foram obtidos de forma retrospectiva, por revisão de prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital de Câncer de Barretos / Fundação Pio XII. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Câncer de Barretos (CAAE 01196012.1.0000.5437).

Amostras biológicas

Os lavados brônquicos (obtidos durante broncoscopia) foram coletados de pulmão com carcinoma de pequenas células e do respectivo pulmão contralateral sem lesão dos 45 pacientes incluídos no estudo, e mantidos em recipiente contendo fixador líquido BD SurePath[™] (BD Diagnostics, EUA), armazenado a 4°C durante um intervalo de 4 a 7 anos, totalizando 90 amostras. Para a realização dos cell blocks, 5 mL de conteúdo citológico foram transferidos para tubo falcon e adicionados 4 mL de BD[™] Density Reagent. Logo após, as amostras foram submetidas a uma centrifugação de 2 minutos a 1080 rpm e duas centrifugações de 10 minutos a 2155 rpm, no equipamento Rotanta 460S (Hettich Zentrifugen). Posteriormente, o conteúdo sedimentado foi ressuspenso com 500 μ L de Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) e transferido para tubos de 1,5 mL. Os tubos foram colocados na centrífuga MiniSpin (Eppendorf) por 2 minutos a 13000 rpm. O excesso de DPBS foi descartado dos tubos e, após agitação no vórtex, 500 μ L de agarose 2% a 60°C foram adicionados aos pellets celulares recuperados.

Logo em seguida, as células foram vortexadas e depois centrifugadas novamente por 2 minutos a 13000 rpm. Acomodados em agarose, os pellets celulares foram cortados ao meio e transferidos para cassetes histológicos imersos em formol tamponado 10%. Posteriormente, as amostras foram emblocadas em parafina e os cortes citológicos (4 µm) disponibilizados em lâminas para a realização da imunocitoquímica, assim como uma lâmina com coloração hematoxilina e eosina (H&E) para verificação da representatividade e qualidade da amostra.

Imunocitoquímica (ICQ)

As amostras citológicas foram submetidas à técnica de ICQ, utilizando os anticorpos primários específicos anti-MCT1, anti-MCT4, anti-GLUT1 e anti-CA9 para cada reação (Tabela 1), conforme instruções dos fabricantes e de acordo com os detalhes descritos previamente pelo grupo²⁵. As reações foram reveladas utilizando o kit Envision+ Dual Link (Dako, Dinamarca), com sistema polímero, seguindo as indicações dos fabricantes. Foram utilizados controles positivos (carcinoma de células escamosas de cavidade oral para os MCTs, estômago para CA9 e placenta para GLUT1) e negativos encontrados no mesmo corte histológico utilizado para controle positivo. As reações foram sujeitas a avaliação semi-quantitativa, conforme previamente descrito, por patologista²⁵. Foi utilizada a seguinte graduação semi-quantitativa: 0: 0% de células positivas; 1: <5% de células positivas; 2: 5-50% de células positivas; 3: >50% de células positivas. A intensidade da

marcação foi graduada como 0: negativa; 1: fraca; 2: intermediária; 3: intensa. A graduação final foi dada pela soma dos parâmetros extensão e intensidade, e agrupada em negativa (0-2) e positiva (4-6). As diferentes localizações celulares (citoplasma, membrana e núcleo), quando presentes, foram avaliadas independentemente.

Análise estatística

A descrição da população do estudo foi realizada a partir de tabelas de frequências e, para a comparação entre os grupos, foi utilizado o teste exato de Fisher, de acordo com a característica da amostra. Para a tabulação dos dados e análise estatística, foi utilizado o software IBM® SPSS® Statistics 21.0 para Windows (IBM Corporation, EUA), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Durante o processamento das amostras armazenadas em meio líquido para construção dos cell blocks, foram perdidas um total de 34 amostras: 15 pares de amostras (normal e tumoral para o mesmo paciente), além de 3 amostras obtidas de pulmão contralateral sem lesão (normais) e 1 tumoral, por falta de conteúdo celular mínimo para formar pellet adequado. As 56 amostras restantes, referentes a 30 pacientes, foram emblocadas e

Tabela 1. Aspectos detalhados para cada anticorpo utilizado em imunocitoquímica.

Proteína	Recuperação antigênica	Anticorpo	Diluição e tempo de incubação do anticorpo
MCT1	Tampão citrato (0,01 M, pH=6), 98°C, 20 minutos	AB3538P Chemicon International	1:300, overnight
MCT4	Tampão citrato (0,01 M, pH=6), 98°C, 20 minutos	sc-50329 Santa Cruz Biotechnology	1:1000, 2 horas
GLUT1	Tampão citrato (0,01 M, pH=6), 98°C, 20 minutos	ab15309-500 AbCam	1:500, 2 horas
CA9	Tampão citrato (0,01 M, pH=6), 98°C, 20 minutos	ab150860 AbCam	1:4000, 2 horas

Tabela 2. Características clínicas e patológicas dos 27 pacientes com câncer de pulmão de pequenas células incluído no estudo.

Variável	n	% (% válidos)
Gênero		
Feminino	13	48,1
Masculino	14	51,9
Cor da pele		
Branco	23	85,2
Negro	2	7,4
Pardo ou mulato	2	7,4
Alcoolismo		
Não	7	25,9 (26,9)
Sim	19	70,4 (73,1)
Sem informação	1	3,7
Tabagismo		
Sim	26	96,3 (100)
Sem informação	1	3,7
Estadiamento T		
T2	1	3,7 (5,0)
T4	18	66,7 (90,0)
Tx	1	3,7 (5,0)
Sem informação	7	25,9
Estadiamento N		
N0	2	7,4 (10,0)
N1	1	3,7 (5,0)
N2	3	11,1 (15,0)
N3	13	48,1 (65,0)
Nx	1	3,7 (5,0)
Sem informação	7	25,9
Estadiamento M		
M0	4	14,8 (19,0)
M1	17	63,0 (81,0)
Sem informação	6	22,2
Último status		
Vivo com doença	4	14,8
Óbito por câncer	23	85,2

processadas em lâminas para ICQ. Durante a obtenção das lâminas, foi perdida mais 1 amostra tumoral. Durante a coloração H&E, ocorreu a perda de mais duas amostras não pareadas (1 normal e 1 tumoral), totalizando 50 amostras pareadas (25 pacientes), 1 normal (1 paciente) e 2 tumorais (2 pacientes). Assim, das 90 amostras iniciais, foi possível obter um total de 53 amostras com lâmina para ICQ, o que representa uma perda de 41% das amostras durante o

processamento pré-imunocitoquímica.

Na Tabela 2, é possível observar a descrição das características clínicas e patológicas dos 27 pacientes cujas amostras tumorais foram submetidas a imunocitoquímica. A idade ao diagnóstico varia de 39 a 85, com uma média de 65,14 ($\pm 11,16$) anos.

De uma forma geral, as lâminas de amostras normais apresentaram alta quantidade de células inflamatórias e pouca quantidade de epitélio

respiratório (Figura 1A). As lâminas das amostras tumorais também apresentaram baixa quantidade de células tumorais e grande quantidade de células inflamatórias (Figura 1B). Na avaliação pelo patologista, em uma lâmina com tecido pulmonar normal, em especial, foi possível diferenciar claramente o epitélio respiratório intacto e íntegro (Figura 2A). Também, foi possível observar em algumas amostras tumorais possuíam células características bem evidentes, agrupadas, com núcleo hiperpigmentado, cariorrexis e alta relação núcleo/citoplasma (Figura 2B). No entanto, na grande maioria dos casos, foi observado pouco conteúdo tumoral.

As 53 amostras (26 normais e 27 tumorais) foram submetidas a imunocitoquímica para avaliação da expressão de MCT1, MCT4, GLUT1 e CA9 e, em seguida, analisadas por médico patologista utilizando uma graduação semi-quantitativa.

Quanto às imunorreações, foi observada marcação citoplasmática e membranal em amostras submetidas a ICQ para MCT1 e GLUT1 e apenas marcação citoplasmática para as de MCT4 e CA9, sendo a maioria de baixa extensão e intensidade (Tabela 3). Não foi observada marcação nuclear em nenhum dos casos.

Para MCT1, das 53 amostras avaliadas, 23 (43%) foram perdidas, sendo 7 (13%, 3 normais e 4 tumorais) por queda de corte e 16 (30%, 1 normal e 15 tumorais) por falta de células representativas do tecido normal ou tumoral. Os resultados obtidos para as 30 amostras remanescentes (22 normais e 8 tumorais) não demonstraram positividade em região citoplasmática

nas amostras de células normais, entretanto, 1 amostra tumoral obteve marcação positiva em região citoplasmática. Não foram observadas amostras com expressão positiva em região de membrana (Tabela 3 e Figura 3).

Para MCT4, das 53 amostras avaliadas, 17 (32%) foram perdidas, sendo 8 (15%, 2 normais e 6 tumorais) por queda de corte durante o processo de imunocitoquímica e 9 (17%, 2 normais e 7 tumorais) por falta de células representativas do tecido normal ou tumoral. Os resultados obtidos para as 36 amostras remanescentes (22 normais e 14 tumorais) mostraram positividade citoplasmática em 2 amostras normais e 2 tumorais e ausência de positividade membranal (Tabela 3 e Figura 4).

Para GLUT1, das 53 amostras avaliadas, 15 (28%) foram perdidas, sendo 3 (6%, 2 normais e 1 tumoral) por queda do corte durante o processo de imunocitoquímica e 12 (23%, todas tumorais) por falta de células representativas do tecido tumoral. Os resultados obtidos para as 38 amostras remanescentes (24 normais e 14 tumorais) mostraram positividade de 1 amostra normal em região citoplasmática, de 3 amostras tumorais também em região citoplasmática e de 2 amostras tumorais em região de membrana (Tabela 3 e Figura 5A).

Para CA9, das 53 amostras avaliadas, 20 (38%) foram perdidas, sendo 4 (8%, 3 normais e 1 tumoral) por queda do corte durante o processo de imunocitoquímica, 5 amostras (9%, 4 normais e 1 tumoral) não foram avaliadas por má qualidade da reação imunocitoquímica (background por problema

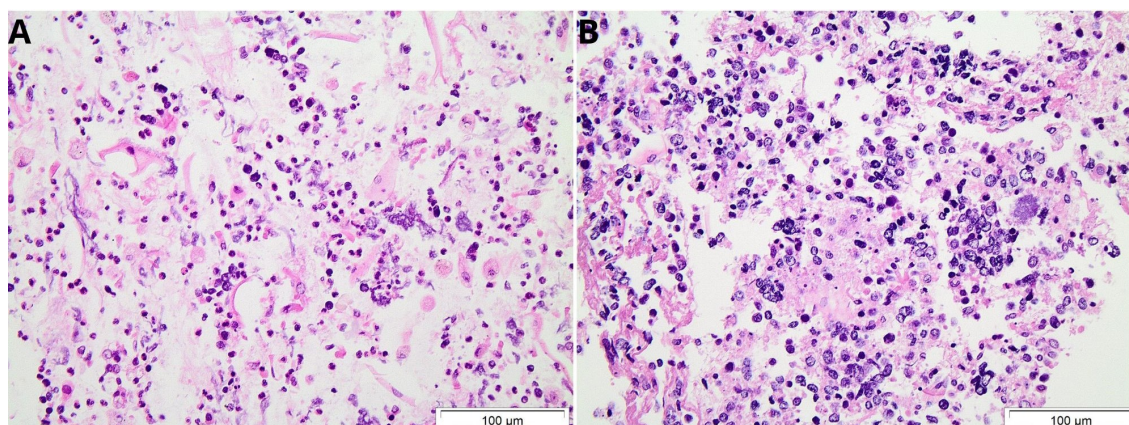


Figura 1. Coloração por hematoxilina e eosina de amostras obtidas a partir de lavado broncoalveolar preservado em meio líquido, com observação de células inflamatórias. A: amostra normal; B: amostra tumoral. Ampliação 400x.

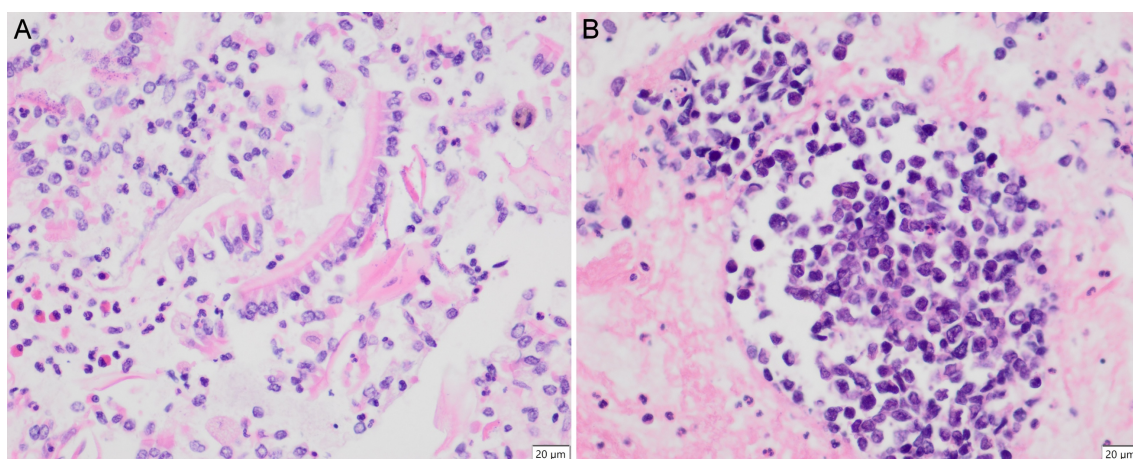


Figura 2. Coloração por hematoxilina e eosina de amostras obtidas a partir de lavado broncoalveolar preservado em meio líquido. A: epitélio respiratório em amostra normal; B: células tumorais em amostra tumoral. Ampliação 400x.

durante o protocolo de imunocitoquímica) e 11 (21%, todas tumorais) por falta de células representativas do tecido tumoral. Os resultados obtidos para as 33 amostras remanescentes (19 normais e 14 tumorais) mostraram ausência de positividade nas amostras normais e marcação positiva, em região citoplasmática, em apenas 1 amostra tumoral (Tabela

3 e Figura 5B).

Devido ao baixo número de casos positivos, não foi possível realizar a análise estatística de associação com os dados clínicos e patológicos dos pacientes.

Tabela 3. Frequências de expressão de MCT1, MCT4, GLUT1 e CA9 nas amostras normais e tumorais de pulmão obtidas a partir de lavado broncoalveolar preservado em meio líquido.

	n	Expressão citoplasmática		Expressão membranar	
		Positivo (%)	P	Positivo (%)	P
MCT1			0,267		---
Normal	22	0 (0,0)		0 (0,0)	
Tumoral	8	1 (12,5)		0 (0,0)	
MCT4			0,634		---
Normal	22	2 (9,1)		0 (0,0)	
Tumoral	14	2 (14,3)		0 (0,0)	
GLUT1			0,043		0,129
Normal	24	1 (4,2)		0 (0,0)	
Tumoral	14	3 (21,4)		2 (14,3)	
CA9			0,424		---
Normal	19	0 (0,0)		0 (0,0)	
Tumoral	14	1 (7,1)		0 (0,0)	

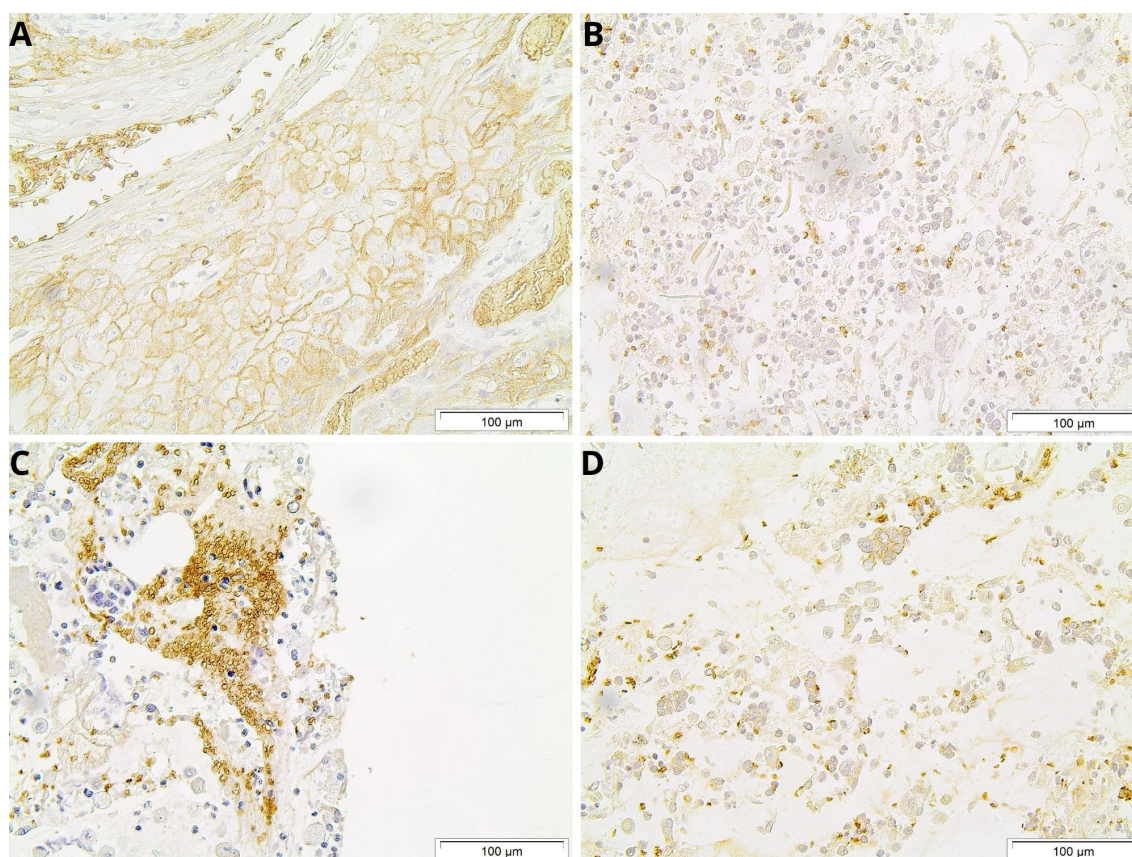


Figura 3. Fotomicrografias representativas da imunorreação para MCT1. A: cavidade oral (controle positivo); B: amostra normal negativa (epitélio respiratório); C: amostra tumoral negativa (marcação positiva nos eritrócitos); D: amostra tumoral positiva. Ampliação 400x.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram utilizadas amostras de lavado broncoalveolar armazenadas em meio líquido para produção de lâminas citológicas com o objetivo de realização de ICQ para marcadores de metabolismo. A técnica de citologia com escova para armazenamento de amostras em meio líquido (SurePath®) foi originalmente desenvolvida para amostras de colo uterino, apresentando uma grande utilidade em colpocitologia oncótica⁹. Este não é o primeiro estudo utilizando o meio líquido para armazenamento de amostras tumorais de outro tipo que não colo uterino. Em 2015, um estudo avaliou o uso de citologia líquida (CytoLyt) como técnica auxiliar para o diagnóstico de doenças primárias e metastáticas em derrames pericárdicos e pleurais, alcançando um resultado de 88% de sensibilidade, 98% de acurácia e 100% de especificidade, em amostras conservadas por 2 a 5 anos²⁶. Um outro

estudo, de 2019, contou com o meio líquido SurePath® para armazenamento de câncer de células escamosas no esôfago, por 5-6 anos, equiparando com amostras histopatológicas concordantes, e demonstrou alta especificidade (96,2%), sensibilidade (98,6%) e acurácia (97,5%). Para mais, o estudo também relata que a técnica é favorável porque admite eleger as células não coesivas e tende a cobrir uma maior área da lesão⁸. Vale esclarecer que o prazo recomendado de conservação para este tipo de amostra é de 6 meses em resfriamento (4°C), no entanto, as amostras deste estudo aparentam manter alguma integridade para análise citológica mesmo após 4-7 anos, o que está em concordância com estes estudos prévios^{8, 26}. No atual estudo, preferiu-se o uso do cell block uma vez que, em relação com as outras técnicas citológicas, apresenta várias vantagens. Quando a imunocitoquímica é feita em diferentes preparações que não o cell block (como o Prep Stain), as células ficam intactas e sobrepostas, o que pode

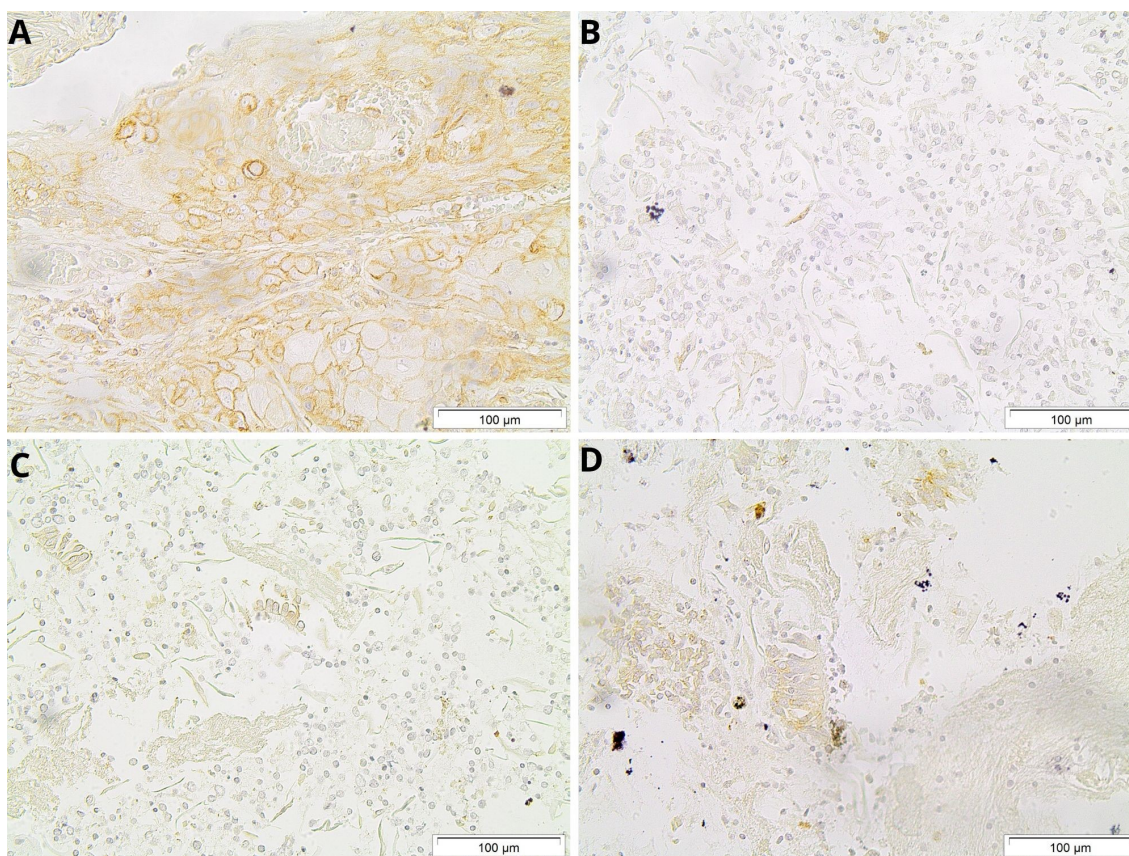


Figura 4. Fotomicrografias representativas da imunorreação para MCT4. A: cavidade oral (controle positivo); B: amostra normal negativa (epitélio respiratório); C: amostra tumoral negativa; D: amostra tumoral positiva. Ampliação 400x.

gerar imprecisão na distinção entre a coloração da membrana e a do citoplasma. Além disso, a técnica de cell block também permite a produção de secções equivalentes em mais de uma lâmina, proporcionando vários cortes que possibilitam analisar um painel de marcadores²⁷, como é o caso do presente estudo. Em 2019, foi publicado um artigo do Comitê de Patologia da Associação Internacional para o Estudo do Câncer de Pulmão que retrata que preparações citológicas de todos os tipos, incluindo cell blocks, lâminas fixadas em etanol e lâminas secas ao ar, podem ser utilizadas para imunocitoquímica²⁸. Com intensa otimização e legitimação, a imunocitoquímica pode ser feita em todos os tipos de citologia e é benéfica sobretudo em casos com células tumorais escassas²⁷. Todavia, para se obter um pellet de boa qualidade, é preciso uma quantidade de material profusa, difícil de ser obtida em órgãos profundos. Além disso, durante o processamento, há risco de perda de material citológico, em consequência do pequeno tamanho das amostras²⁹. De fato, no presente estudo, foi observada

uma perda significativa durante o processamento das amostras para construção das lâminas (44%), assim como durante a imunocitoquímica (33%), tanto por queda da amostra (9%) ou falta de células representativas do tecido normal ou tumoral (25%).

Em relação às características clinicopatológicas dos pacientes incluídos no estudo, é possível perceber que a idade média de 65,14 anos é próxima às de estudos prévios, que apontam 66³⁰ e 69,7 anos³¹. Com relação ao sexo biológico, os pacientes do presente estudo não apresentam uma polaridade, o que vai ao encontro de outro estudo que relatou 51% para o sexo feminino e 49% para o sexo masculino³⁰, porém, diverge de outro estudo em que houve um predomínio do sexo masculino, com 61%³¹. Além disso, tanto este estudo (85,2%) quanto outro (96%) relatam um predomínio de caucasianos³¹. Quanto aos hábitos de vida, o atual estudo demonstra altíssima taxa de tabagismo (100%) e um outro estudo encontrou um total de 88% de tabagistas, sendo 44% dos pacientes tabagistas atuais e 39% ex-tabagistas³¹.

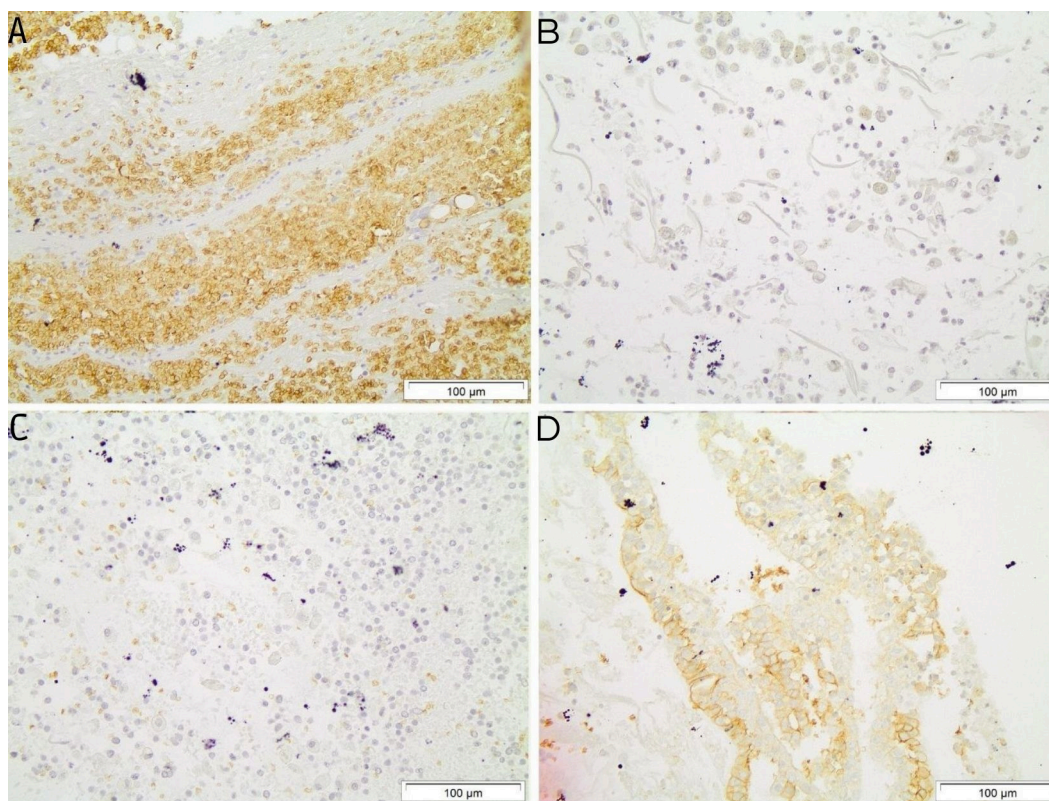


Figura 5. Fotomicrografias representativas da imunorreação para GLUT1. A: placenta (controle positivo); B: amostra normal negativa (epitélio respiratório); C: amostra tumoral negativa; D: amostra tumoral positiva. Ampliação 400x.

Sobre o metabolismo tumoral, sabe-se que quase todos os tumores sólidos apresentam uma reprogramação do seu metabolismo, na qual as vias metabólicas que viabilizam a produção de energia e geram macromoléculas são fundamentais para a sobrevivência, progressão e disseminação das células tumorais. Os propulsores exatos das alterações metabólicas do câncer ainda não são completamente conhecidos, mas se sabe que existe uma propensão para estímulo da via glicolítica³². Uma compreensão global das divergências metabólicas existentes entre células normais e tumorais apontam novas perspectivas de combate ao câncer³³. A inibição do metabolismo glicolítico tumoral por alvos moleculares confere um perfil mais benigno de toxicidade por ser alvo específico, o que não acontece com as terapias citotóxicas tradicionais. Esses podem ser usufruídos como alvo único ou analisados em conjunto com terapias já utilizadas atualmente, propiciando inibição da proliferação tumoral, indução de apoptose e autofagia nas células tumorais, restando assim a progressão da doença³², assim como elevação dos

níveis de espécies reativas de oxigênio intratumoral, atingindo a capacidade de invasão e sobrevivência tumoral³⁴.

Sabe-se que o CPPC possui como características a disseminação precoce, quimiorresistência e mau prognóstico³⁵. Neste contexto, um estudo descreveu diferenças entre a resposta celular a quimioterápicos de esferoides tumorais, agregados multicelulares, quando comparados com células tumorais circulantes em suspensão, sendo a primeira mais quimiorresistente por apresentar acessibilidade limitada às drogas, devido à presença de células quiescentes, efeitos de contato celular provocando uma função de barreira, além da presença de regiões de hipóxia celular³⁵. Um estudo realizado em pacientes com câncer de pulmão de pequenas e de não pequenas células avaliou a natureza dos componentes orgânicos voláteis expelidos antes e após um teste oral de tolerância à glicose, em pacientes que apresentavam estado hiperglicolítico comprovado pela tomografia por emissão de pósitrons associada à tomografia computadorizada (PET-CT,

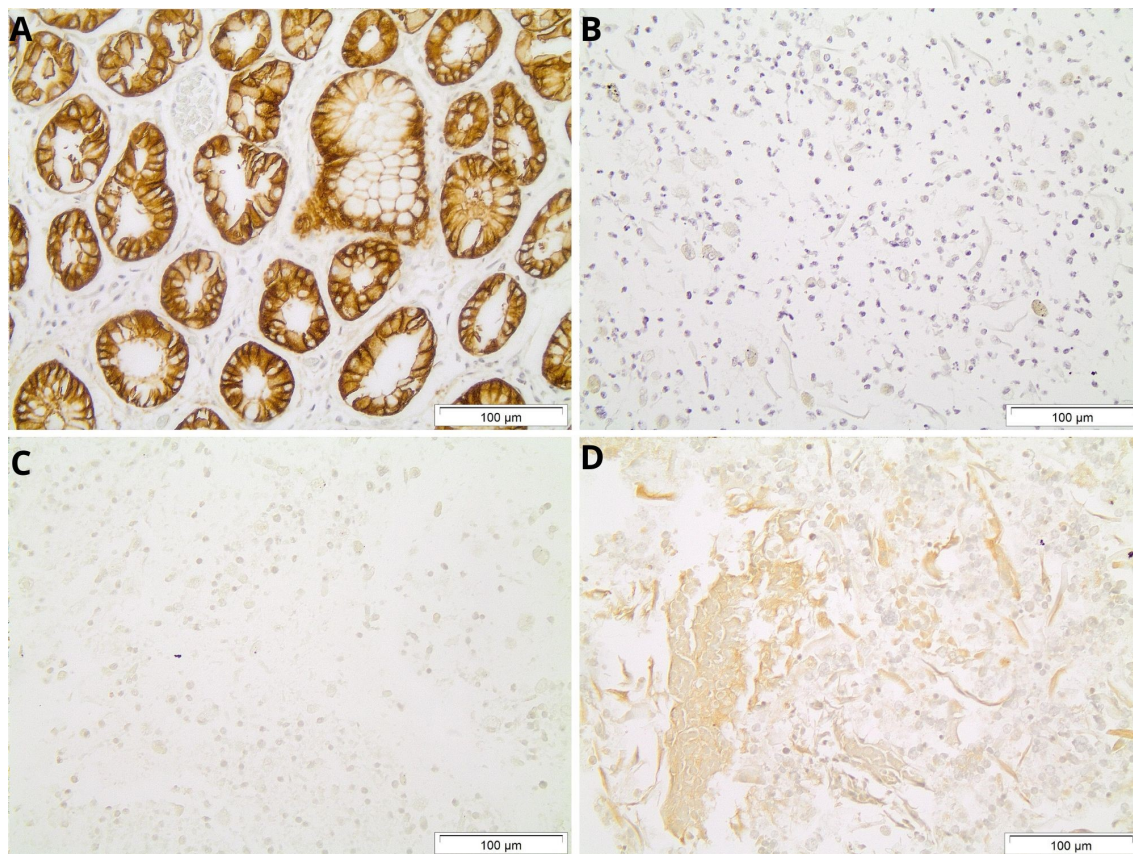


Figura 6. Fotomicrografias representativas da imunorreação para CA9. A: estômago (controle positivo); B: amostra normal negativa (epitélio respiratório); C: amostra tumoral negativa; D: amostra tumoral positiva. Ampliação 400x.

do inglês positron emission tomography associated with computed tomography) após administração de fluorodeoxiglicose marcada com flúor-18 (18F-FDG, do inglês (18)F-fluoro-2-deoxy-d-glucose). No grupo controle, formado por pacientes sem câncer, de gênero, histórico médico e histórico de tabagismo compatíveis com os pacientes do grupo com câncer de pulmão, ocorreu uma mudança intensa no padrão dos voláteis após a ingestão da glicose. Já nos pacientes com câncer de pulmão, houve apenas um efeito mínimo. A hipótese levantada pelo grupo do estudo é que ocorreu um “efeito teto” nos pacientes do grupo com câncer, ou seja, estes pacientes estariam normalmente em um estado hipermetabólico que reduz o limiar de sensibilidade à glicose e, assim, a glicose não alteraria drasticamente os padrões de atividade metabólica nesses pacientes, ao contrário do observado no grupo controle³⁶. Ainda, sabe-se que um elevado nível sérico de lactato desidrogenase (enzima que converte piruvato em lactato, com importante papel na reprogramação metabólica das células tumorais) pré-tratamento é

um fator de mau prognóstico em cânceres de pulmão de pequenas células extensivos (que acometem todo o tórax) e limitados (que acometem apenas um hemitórax ou pode ser enquadrado em apenas um campo de radiação), podendo ser considerado um biomarcador de altas taxas glicolíticas³¹. Ademais, o CPPC expressa PKM1, gene que codifica a enzima piruvato quinase da via celular glicolítica, em níveis elevados, promovendo proliferação e sobrevivência deste tipo tumoral³⁷. Nesse contexto de alterações metabólicas, pesquisas buscam avaliar o possível papel dos MCTs no CPPC, demonstrando que existe relação entre o uso de AZD3965, um inibidor de MCT1, e aumento da radiosensibilidade em xenoinxertos de CPPC, sustentando a ideia do uso combinado dessa medicação com radioterapia para testes clínicos em tumores sólidos de CPPC³⁸. O AZD3965 foi previamente testado em 7 linhagens de CPPC e foi observado que possui maior sensibilidade em algumas linhagens submetidas a situação de hipóxia. Porém, aquelas linhagens submetidas a

essa situação que apresentaram expressão elevada de MCT4, demonstraram uma certa resistência ao AZD3965. Testes feitos com ratos demonstraram que o AZD3965 diminuiu significativamente o crescimento do tumor, porém sem regressão completa, o que fortalece a hipótese que a inibição do MCT1 só é eficaz na parte hipóxica tumoral. A realização de imunohistoquímica em micro arranjos de tecidos de CPPC de 71 pacientes revelou uma expressão heterogênea de MCT1, MCT4 e CA9 (marcador de hipóxia); no entanto, de uma forma geral, foram encontrados níveis mais altos de expressão de MCT1 do que de MCT4²⁴. No presente estudo, foi observada uma baixa frequência de expressão dos marcadores nas lâminas de CPPC, o que não era esperado, visto a agressividade deste tipo tumoral⁶ e os resultados prévios descritos por outros estudos^{24, 38}. Apesar da baixa expressão, foi observado um aumento significativo na expressão citoplasmática de GLUT1 nas amostras tumorais, comparando às normais, apontando para um aumento das taxas glicolíticas nesse tipo tumoral. Entretanto, com base em estudos prévios, presumia-se uma frequência superior da expressão de GLUT1, como descrito em um estudo de 2011, que demonstrou a expressão de GLUT1 em 92% das amostras de CPPC analisadas³⁹. Acreditamos que essa baixa expressão foi influenciada pelo longo período de armazenamento das amostras em meio líquido que, apesar de ter mantido a integridade das amostras para análise citológica, conforme observado por meio de marcação com H&E, pode ter levado a uma perda de antigenicidade, assim como já existem relatos da perda de antigenicidade para detecção de receptores hormonais após o uso de fixadores de base alcóolica⁴⁰. Outro estudo mostrou que uma pequena quantidade de formaldeído no Surepath[®] parece afetar a imunorreatividade das células e a pós fixação com formalina deve ser omitida nos protocolos de coleta de amostras. O aumento no tempo de pré-tratamento parece retornar quase toda a antigenicidade das células⁴¹.

O presente estudo foi comprometido pelas altas taxas de perda de amostra, o que ocasionou um pequeno tamanho amostral, assim como o tempo de armazenamento das amostras, resultando num baixo número de casos positivos.

CONCLUSÃO

Em conclusão, a expressão de MCT1, MCT4 e CA9 foi observada em poucas amostras, não sendo observada diferença entre amostras normais e tumorais. Para GLUT1, observou-se um aumento significativo da expressão citoplasmática nas amostras tumorais quando comparado às normais.

REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
2. Estimativa I. Incidência de câncer no Brasil. Rio de janeiro: INCA; 2019. 2020.
3. Marshall AL, Christiani DC. Genetic susceptibility to lung cancer--light at the end of the tunnel? *Carcinogenesis.* 2013;34(3):487-502.
4. Zamboni M. Epidemiologia do câncer do pulmão. *J Pneumol.* 2002;28:41-7.
5. Ganti AK, West WW, Zhen W. Current concepts in the management of small cell lung cancer. *Indian J Med Res.* 2013;137(6):1043-51.
6. Kazarian M, Laird-Offringa IA. Small-cell lung cancer-associated autoantibodies: potential applications to cancer diagnosis, early detection, and therapy. *Mol Cancer.* 2011;10:33.
7. Song JA, Yang HS, Lee J, Kwon S, Jung KJ, Heo JD, et al. Standardization of bronchoalveolar lavage method based on suction frequency number and lavage fraction number using rats. *Toxicol Res.* 2010;26(3):203-8.
8. Mariano VS, Pastrez PRA, Mafra Costa A, Guimaraes DP, Cunha TR, Neto SAZ, et al. Impact of Brush Cytology Analysis for the Diagnosis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma: The Quality of Liquid-Based Preparation of Cytological Slides. *Acta Cytol.* 2019;63(3):240-6.
9. LINS Bea. Citologia oncológica: aplicabilidade e atuação do profissional biomédico na área. 2014.
10. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309-14.
11. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
12. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(2):85-95.
13. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004;4(11):891-9.
14. Bai Y, Huang W, Ma LT, Jiang JL, Chen ZN. Importance of N-glycosylation on CD147 for its biological functions. *Int J Mol Sci.* 2014;15(4):6356-77.
15. Halestrap AP. The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB Life.* 2012;64(1):1-9.

16. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Azevedo-Silva J, Casal M, Schmitt FC, Baltazar F. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J Bioenerg Biomembr.* 2012;44(1):127-39.
17. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:441-64.
18. Pastorek J, Pastorekova S, Callebaut I, Mornon JP, Zelnik V, Opavsky R, et al. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene.* 1994;9(10):2877-88.
19. Liao SY, Lerman MI, Stanbridge EJ. Expression of transmembrane carbonic anhydrases, CAIX and CAXII, in human development. *BMC Dev Biol.* 2009;9:22.
20. Mollaoglu G, Guthrie MR, Bohm S, Bragelmann J, Can I, Ballieu PM, et al. MYC Drives Progression of Small Cell Lung Cancer to a Variant Neuroendocrine Subtype with Vulnerability to Aurora Kinase Inhibition. *Cancer Cell.* 2017;31(2):270-85.
21. Vousden KH, Ryan KM. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(10):691-700.
22. Pedersen MW, Holm S, Lund EL, Hojgaard L, Kristjansen PE. Coregulation of glucose uptake and vascular endothelial growth factor (VEGF) in two small-cell lung cancer (SCLC) sublines in vivo and in vitro. *Neoplasia.* 2001;3(1):80-7.
23. Ioannou M, Papamichali R, Kouvaras E, Mylonis I, Vageli D, Kerenidou T, et al. Hypoxia inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor in biopsies of small cell lung carcinoma. *Lung.* 2009;187(5):321-9.
24. Polanski R, Hodgkinson CL, Fusi A, Nonaka D, Priest L, Kelly P, et al. Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor AZD3965 in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2014;20(4):926-37.
25. Pinheiro C, Sousa B, Albergaria A, Paredes J, Dufloth R, Vieira D, et al. GLUT1 and CAIX expression profiles in breast cancer correlate with adverse prognostic factors and MCT1 overexpression. *Histol Histopathol.* 2011;26(10):1279-86.
26. Rossi ED, Bizzarro T, Schmitt F, Longatto-Filho A. The role of liquid-based cytology and ancillary techniques in pleural and pericardic effusions: an institutional experience. *Cancer Cytopathol.* 2015;123(4):258-66.
27. Roy-Chowdhuri S. Immunocytochemistry of cytology specimens for predictive biomarkers in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2020;9(3):898-905.
28. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, Warth A, Russell PA, Lantuejoul S, et al. Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2019;14(3):377-407.
29. Jain D, Mathur SR, Iyer VK. Cell blocks in cytopathology: a review of preparative methods, utility in diagnosis and role in ancillary studies. *Cytopathology.* 2014;25(6):356-71.
30. El-Helw LM, Rogers TK, Hatton MQ. Small-cell lung cancer: 8 years experience of a single multidisciplinary team. *J Oncol.* 2008;2008:150760.
31. Hsieh AH, Tahkar H, Koczwara B, Kichenadasse G, Beckmann K, Karapetis C, et al. Pre-treatment serum lactate dehydrogenase as a biomarker in small cell lung cancer. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2018;14(2):e64-e70.
32. Nagarajan A, Malvi P, Wajapeyee N. Oncogene-directed alterations in cancer cell metabolism. *Trends Cancer.* 2016;2(7):365-77.
33. Baig MH, Adil M, Khan R, Dhadi S, Ahmad K, Rabbani G, et al. Enzyme targeting strategies for prevention and treatment of cancer: Implications for cancer therapy. *Semin Cancer Biol.* 2019;56:1-11.
34. El Hassouni B, Granchi C, Valles-Marti A, Supadmanaba IGP, Bononi G, Tuccinardi T, et al. The dichotomous role of the glycolytic metabolism pathway in cancer metastasis: Interplay with the complex tumor microenvironment and novel therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol.* 2020;60:238-48.
35. Klameth L, Rath B, Hochmaier M, Moser D, Redl M, Mungenast F, et al. Small cell lung cancer: model of circulating tumor cell tumorspheres in chemoresistance. *Sci Rep.* 2017;7(1):5337.
36. Feinberg T, Alkoby-Meshulam L, Herbig J, Cancilla JC, Torrecilla JS, Gai Mor N, et al. Cancerous glucose metabolism in lung cancer-evidence from exhaled breath analysis. *J Breath Res.* 2016;10(2):026012.
37. Nomura M, Morita M, Tanuma N. A metabolic vulnerability of small-cell lung cancer. *Oncotarget.* 2018;9(64):32278-9.
38. Bola BM, Chadwick AL, Michopoulos F, Blount KG, Telfer BA, Williams KJ, et al. Inhibition of monocarboxylate transporter-1 (MCT1) by AZD3965 enhances radiosensitivity by reducing lactate transport. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(12):2805-16.
39. Kaira K, Ohde Y, Endo M, Nakagawa K, Okumura T, Takahashi T, et al. Expression of 4F2hc (CD98) in pulmonary neuroendocrine tumors. *Oncol Rep.* 2011;26(4):931-7.
40. Jain D, Mathur S, Iyer VJC. Cell blocks in cytopathology: a review of preparative methods, utility in diagnosis and role in ancillary studies. 2014;25(6):356-71.
41. Bjønness-Jacobsen EC, Eriksen AK, Hagen VN, Østbye KM, Wittersø A, Pedersen MK, et al. The effect of the small amount of formaldehyde in the SurePath liquid when establishing protocols for immunocytochemistry. *CytoJournal.* 2016;13:27.

AUTOR DE CORRESPONDÊNCIA

Ayra Daneluzzi Quinelato

ayra__@hotmail.com

Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr Paulo Prata – FACISB

Avenida Loja Maçônica Renovadora 68, 100

CEP 14785-002, Barretos/SP, Brasil

Telefone (17) 3321-3060

Recebido: 08.11.2022

Aceito: 19.12.2022