

Carolina A. P. da Silva, Isabella C. A. dos Santos, Mariana P. Stelling
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro

caroliiiinaaraujo123@gmail.com , isabella.abrahao2@gmail.com e mariana.stelling@ifrj.edu.br

INTRODUÇÃO

A progressão tumoral é um processo caracterizado pelo acúmulo de mutações que resultam na aquisição de propriedades malignas. O cátion divalente manganês (Mn) é um elemento central na progressão tumoral, que se encontra alterado in vivo, enquanto em modelo celular in vitro observa-se que ele intensifica comportamentos típicos da malignidade: migração aumentada (individual e coletiva) de células tumorais acumuladoras de Mn (Stelling et al, 2021). Sua biodisponibilidade varia no microambiente tumoral, dependendo de fatores como organização da matriz extracelular, organização do glicocálice das células locais, aporte dos vasos sanguíneos e **expressão de transportadores de metais**, gerando nichos de alto Mn associados a uma maior chance de geração de um foco metastático e um profundo desequilíbrio metalômico que envolve não somente o Mn, mas também os elementos Fe e Cu, possivelmente responsáveis pelo avanço da doença.

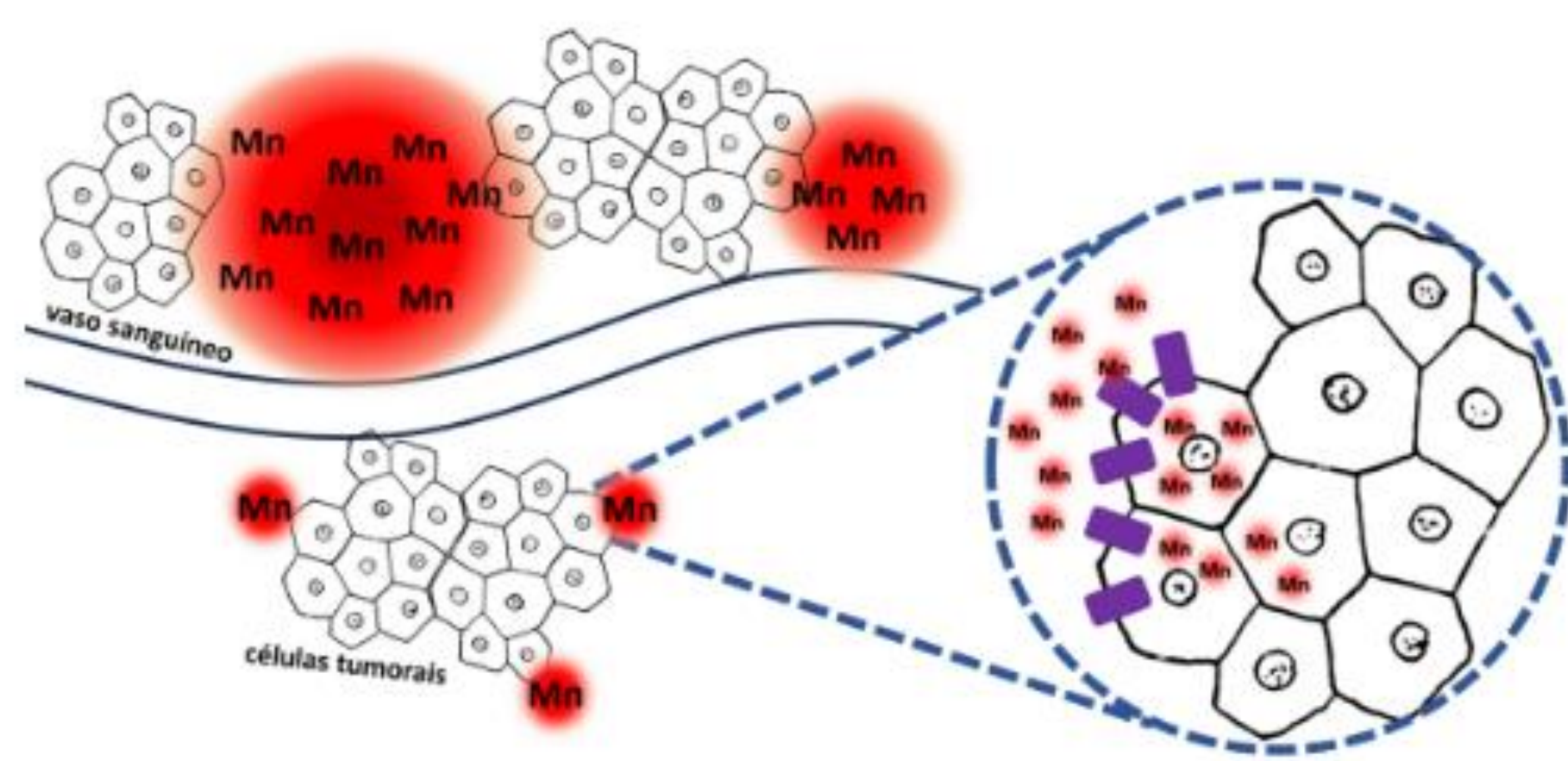


Figura 1. Representação esquemática das variações de Mn observadas no microambiente tumoral. Fonte: Stelling, Mariana; 2023.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Cultivo celular

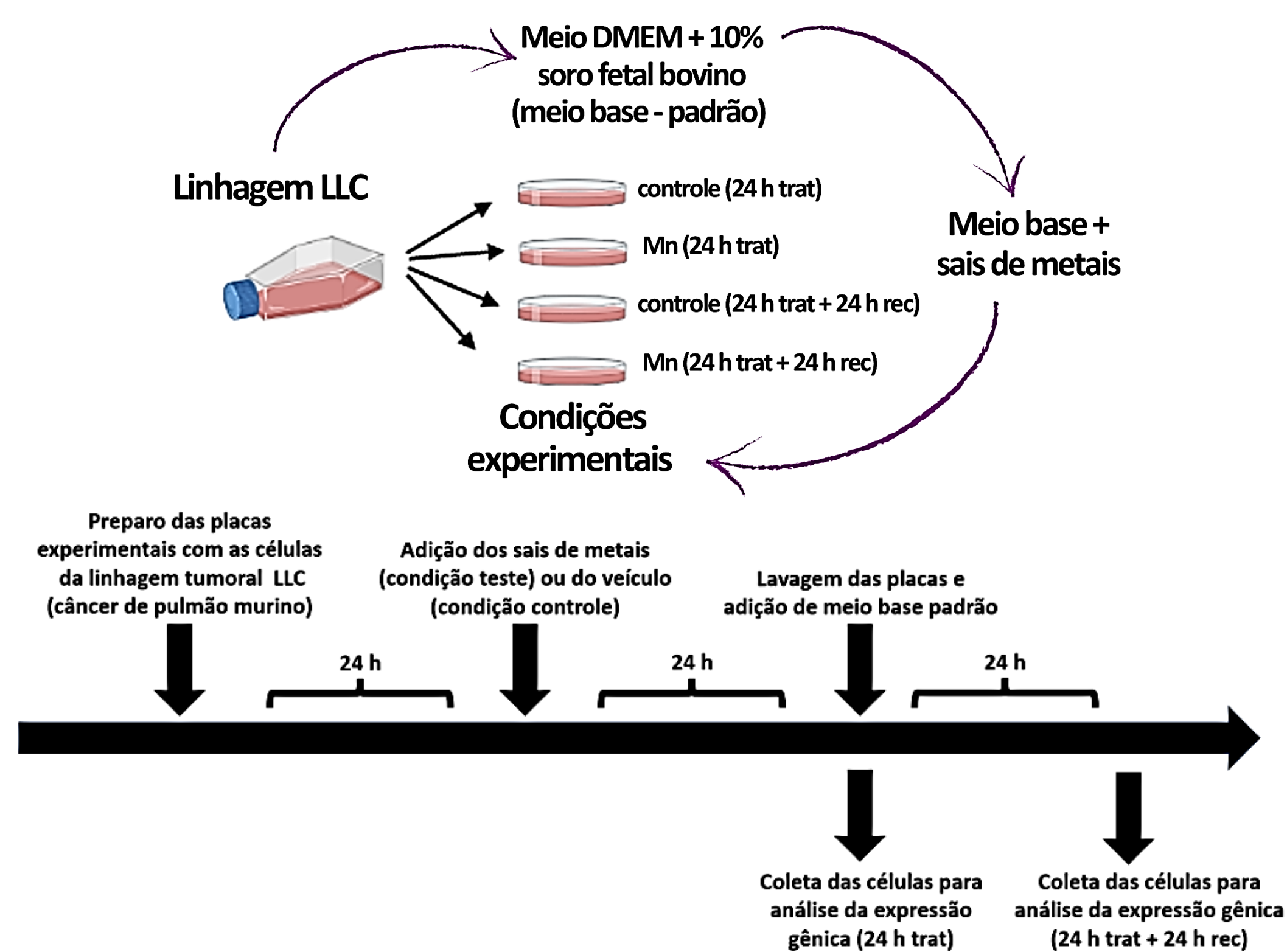


Figura 1. Esquemas representativos dos ensaios de exposição ao manganês e do protocolo experimental. Fonte: autoria própria.

2. Extração de mRNA

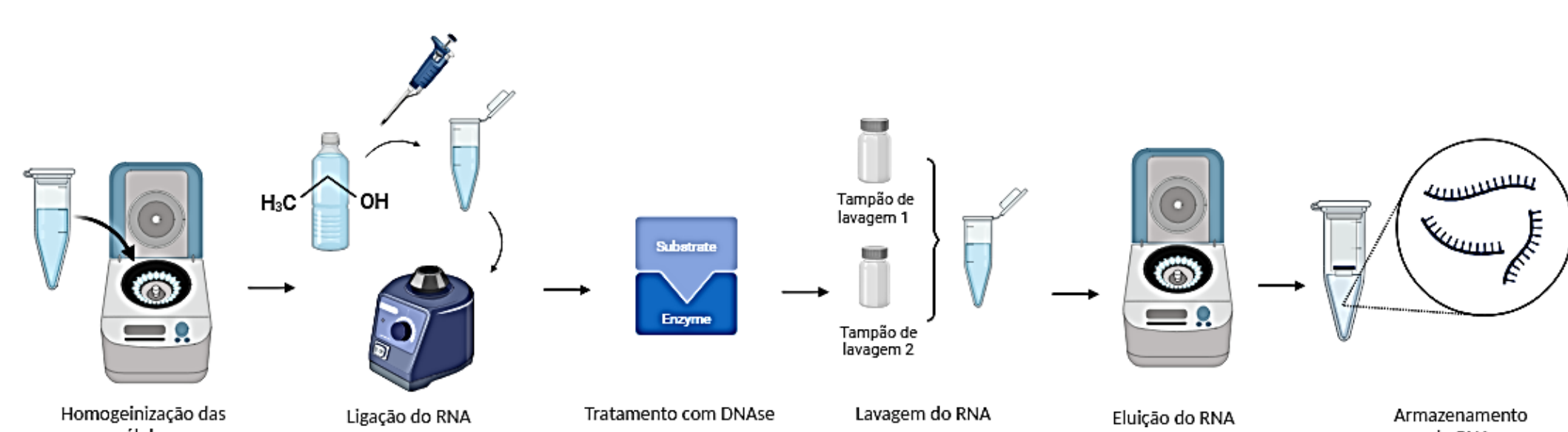


Figura 2. Protocolo de extração de mRNA em sistema de coluna. Fonte: autoria própria.

3. PCR em tempo real

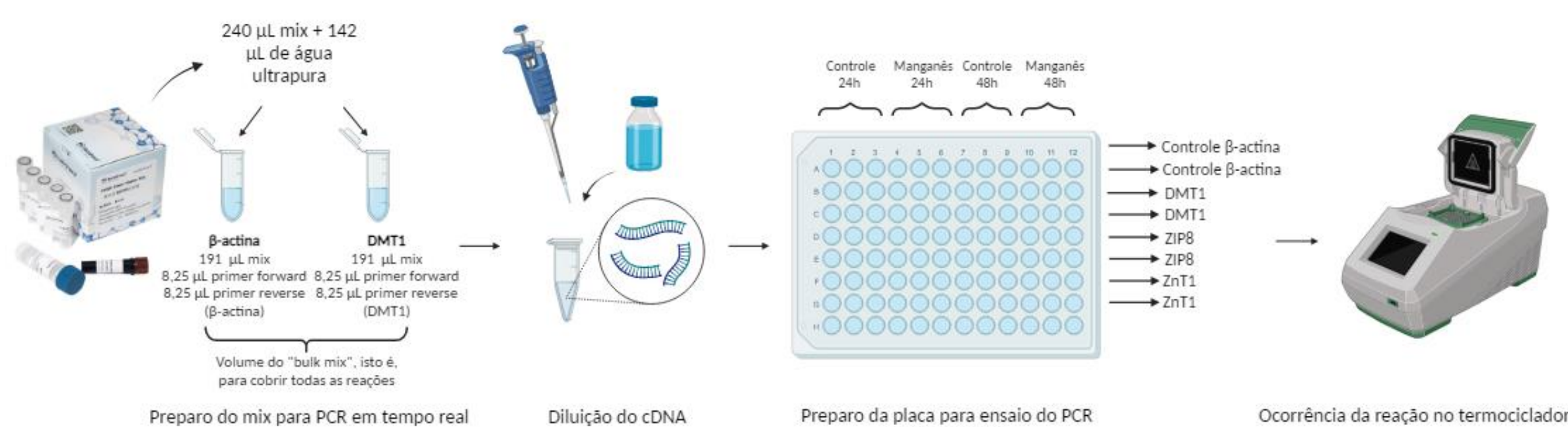


Figura 3. Procedimento para PCR em tempo real simplificado. Fonte: autoria própria.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. A adição de cloreto de manganês (II) não altera a morfologia da LLC

Após a suplementação do meio de cultura com cloreto de manganês (II) 5 µM, as células foram observadas quanto à manutenção da sua morfologia em relação às condições padrão de cultivo. As fotomicrografias apresentadas abaixo foram adquiridas 5 minutos depois do preparo das placas. Aspectos como densidade, circularidade, complexidade, dentre outros foram visualmente analisados.

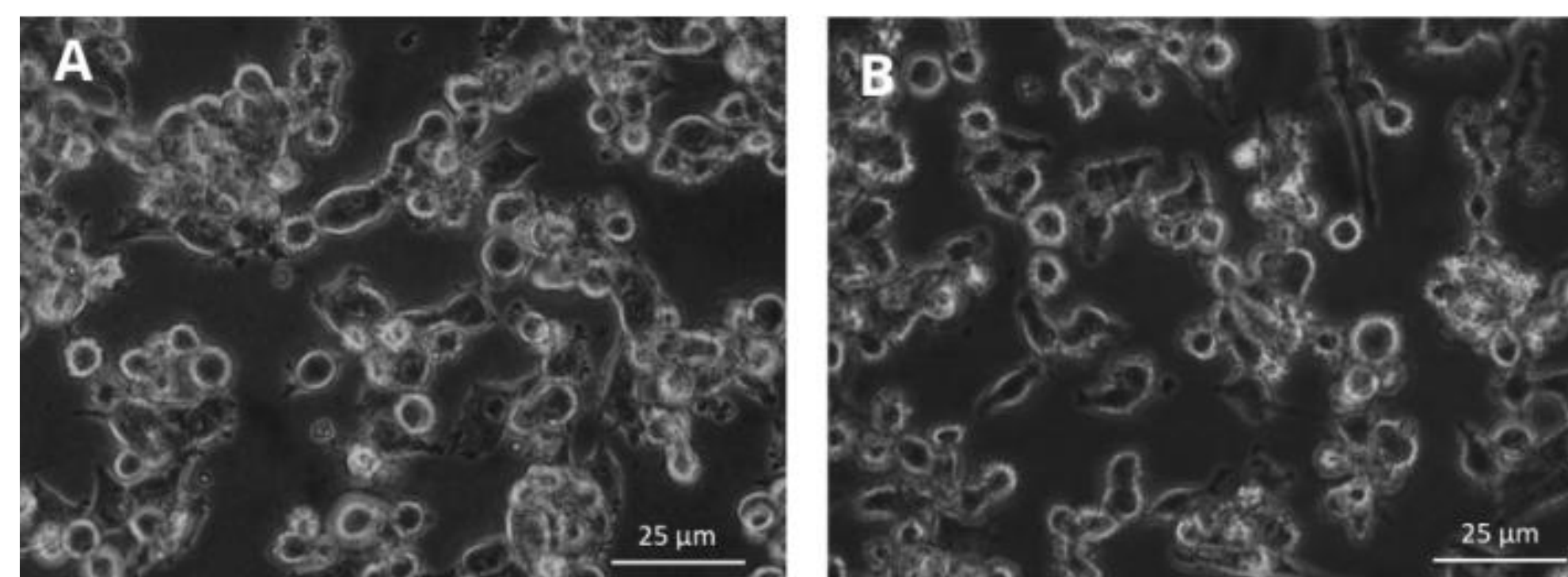


Figura 1. Fotomicrografias da linhagem tumoral murina de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC). Condição (A) controle; (B) cloreto de manganês (II) 5 µM. Barra de escala: 25 µm. Fonte: autoria própria.

2. A expressão dos transportadores DMT1, ZIP8, ZnT1 E FPN1 é influenciada por alterações da metalômica do microambiente tumoral de maneira tempo-dependente

Ao realizar a análise da expressão gênica dos transportadores expressos pela LLC após 24 h em condições de alto manganês e após 24 h de retorno às condições padrão de cultivo, observamos diferentes comportamentos de cada transportador analisado. Replicatas adicionais serão realizadas com o intuito de aumentar o número amostral.

2.1. O DMT1 RECUPERA SUA EXPRESSÃO APÓS 24 h DE RETORNO ÀS CONDIÇÕES PADRÃO DE CULTIVO

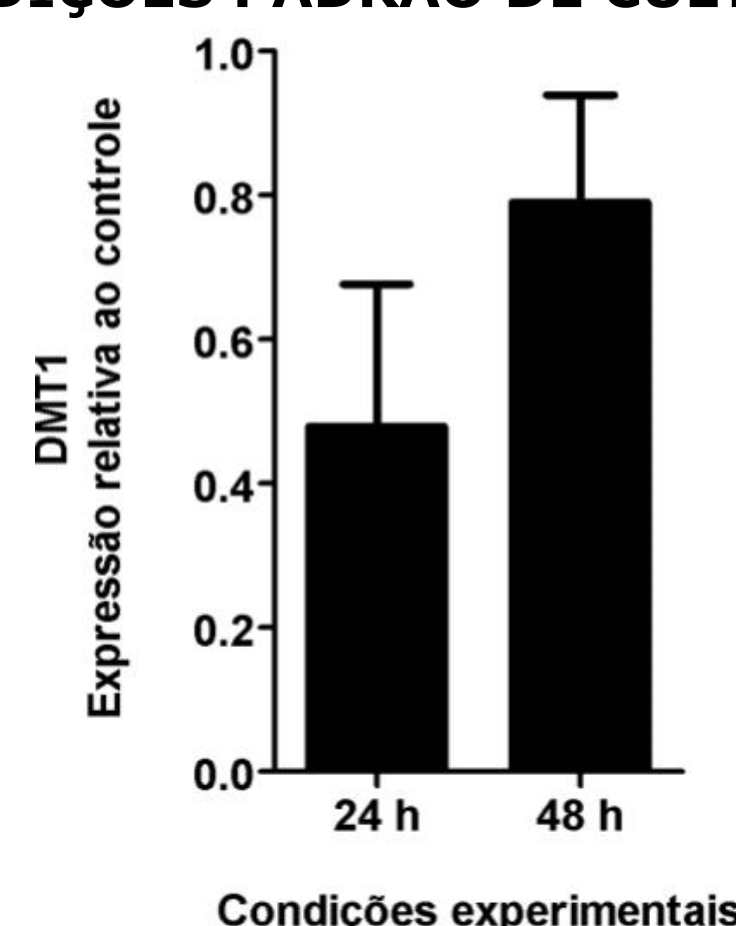


Gráfico 1. Expressão do transportador DMT1 nas células LLC após exposição por 24 h a Mn 5 µM. N = 5. Teste T, p=0,25. Fonte: autoria própria.

2.2. O ZIP8 E O ZnT1 SÃO AINDA MAIS SUBEXPRESSOS APÓS 24 h EM CONDIÇÕES PADRÃO DE CULTIVO

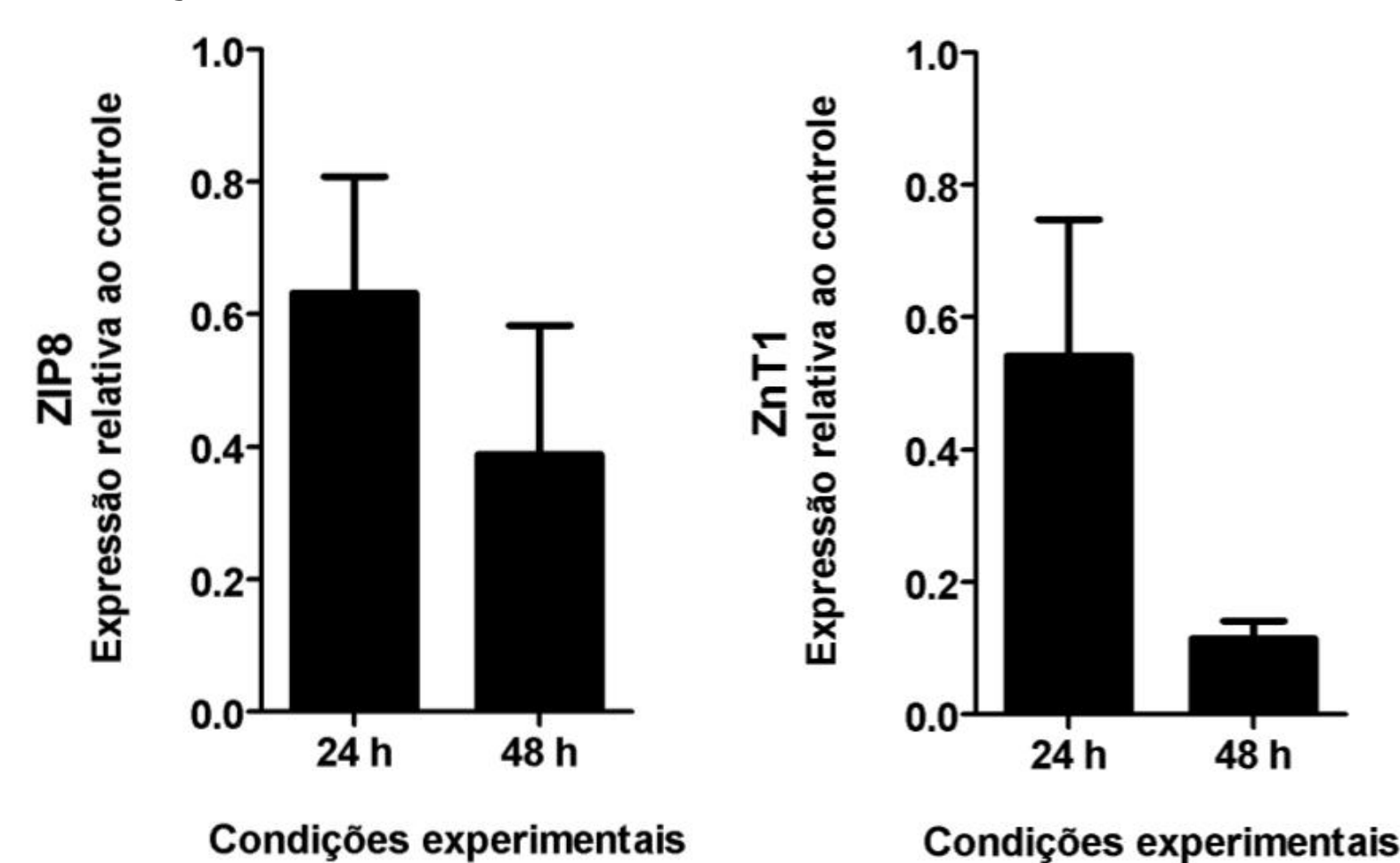


Gráfico 2. Expressão dos transportadores ZnT1 e ZIP8 nas células LLC após exposição por 24 h a Mn 5 µM. N = 5. p=0,10; p=0,38, respectivamente. Teste T. Fonte: autoria própria

2.3. A FPN1 MANTÉM O PADRÃO DE SUBEXPRESSÃO MESMO APÓS O RETORNO ÀS CONDIÇÕES PADRÃO DE CULTIVO

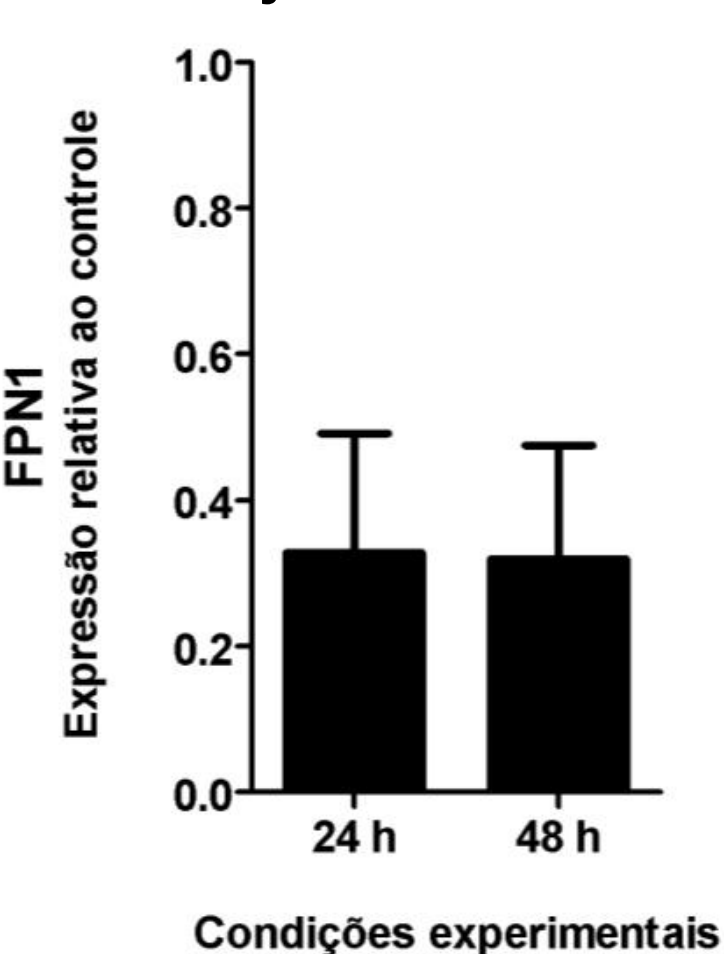


Gráfico 3. Expressão do transportador FPN1 nas células LLC após exposição por 24 h a Mn 5 µM. N = 3. Teste T, p=0,97. Fonte: autoria própria.

Sendo assim, A internalização de tais metais, se excessiva, pode se apresentar problemática, caso a célula alcance concentrações próximas à citotoxicidade. Com isso, o mecanismo detectado de regulação negativa dos transportadores pode ser observado como uma estratégia de proteção das células tumorais que assim se comportam.

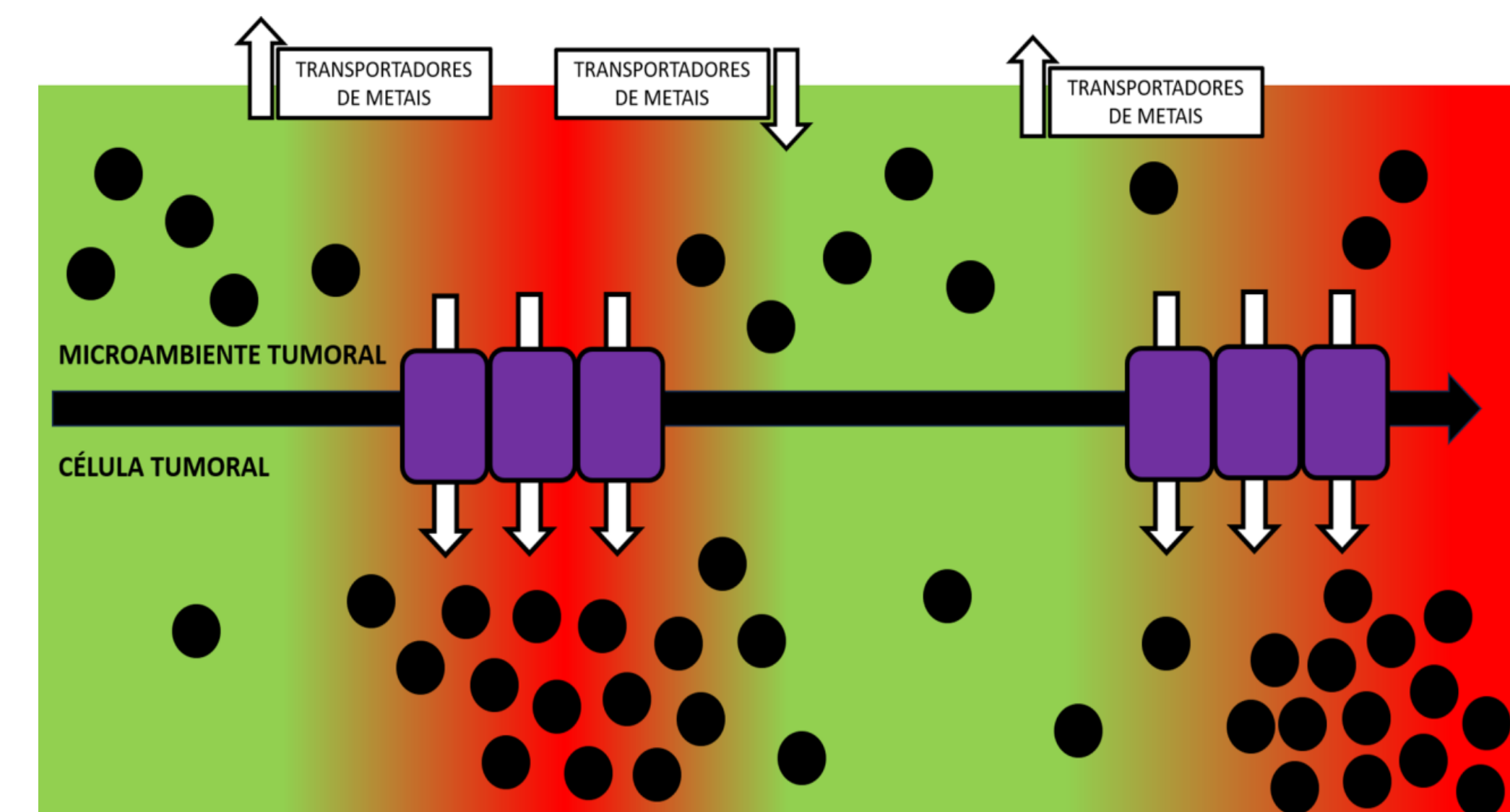


Figura 2. Esquema das hipóteses relativas à dinâmica da resposta celular tumoral às variações de metais do microambiente. Fonte: Stelling, Mariana; 2023.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluimos que variações do elemento Mn no microambiente tumoral simulado in vitro regula de maneira direta ou indireta a expressão de transportadores transmembranares de metais. Interessantemente, observamos variações na expressão dos transportadores diretamente envolvidos no transporte de Mn (DMT1 e ZIP8), assim como do transportador ZnT1, que não transporta Mn, indicando uma complexa rede regulatória da metalômica tumoral.

PERSPECTIVAS:

- Realizar ICP-OES para a quantificação multielementar do meio de cultura condicionado pela célula tumoral em diferentes condições experimentais simuladas que mimetizam a metalômica do microambiente;
- Realizar, através da linha de luz Carnaúba (Sirius, CNPEM), o imageamento dos íons metálicos presentes na linhagem LLC;
- Analisar a dinâmica de expressão de outros transportadores , como o ZIP14, com o objetivo de avaliarmos os diferentes mecanismos de transporte de manganês;
- Ensaio para a análise da viabilidade celular através do ensaio de MTT para estabelecer concentrações não tóxicas dos metais ferro, cobre e zinco para teste da expressão dos transportadores de metais DMT1, ZIP8, ZIP14, ZnT1 e FPN1 na presença destes metais;
- Avaliação da migração das células tumorais por meio de ensaio de cicatrização para avaliar o efeito de outros metais transportados pelo DMT1, ZIP8, ZIP14, ZnT1 e FPN1 (ferro, cobre e zinco) no comportamento da célula tumoral;
- Ensaio de citoimunomarcagem para detectar e quantificar os transportadores DMT1, ZIP8, ZIP14, ZnT1 e FPN1 nas células LLC.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos pelo apoio e suporte financeiro para o desenvolvimento deste projeto oferecido pelas agências CNPq, CAPES, FAPERJ, CNPEM, Fundação do Câncer e IFRJ e outras instituições parceiras.

REFERÊNCIAS

- STELLING, et al. Manganese systemic distribution is modulated in vivo during tumor progression and affects tumor cell migration and invasion in vitro. **Sci Rep** 11, 04 Aug 2021.
- STELLING, M.P. et al. Metal ions and the extracellular matrix in tumor migration. **FEBS J.** 2019;286(15):2950-2964. doi:10.1111/febs.14986.
- KREZEL, A. Metal Ions in Life Sciences, Vol. 12: Metallomics and the Cell. Edited by Lucia Banci. **ChemBioChem**, v. 15, n. 3, p. 473-474, 10 fev. 2014.