

Juliana do Carmo Godinho¹, Ananda de Araujo Bento¹, Mariana Paranhos Stelling¹

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (Campus Rio de Janeiro)
julianacarmog15@gmail.com

INTRODUÇÃO

Alterações do padrão de distribuição e concentração de metais podem levar ao descontrole do ciclo celular, resistência à morte celular e malignidade. Foi demonstrado que células tumorais da linhagem LLC (**Carcinoma Pulmonar Murino**), apresentam alterações em seu perfil metalômico, deflagradas pelo acúmulo de manganês disponível no microambiente tumoral (Figura 1). Considerando os diversos caminhos de transporte e distribuição de metais envolvidos neste processo, o **DMT1 (Transportador de Metais Divalentes 1)** se mostrou um candidato promissor na investigação do desequilíbrio metalômico, uma vez que os metais alterados em nosso modelo são os transportados pelo DMT1.

1. Modelo de vias de transporte de metais na linhagem LLC

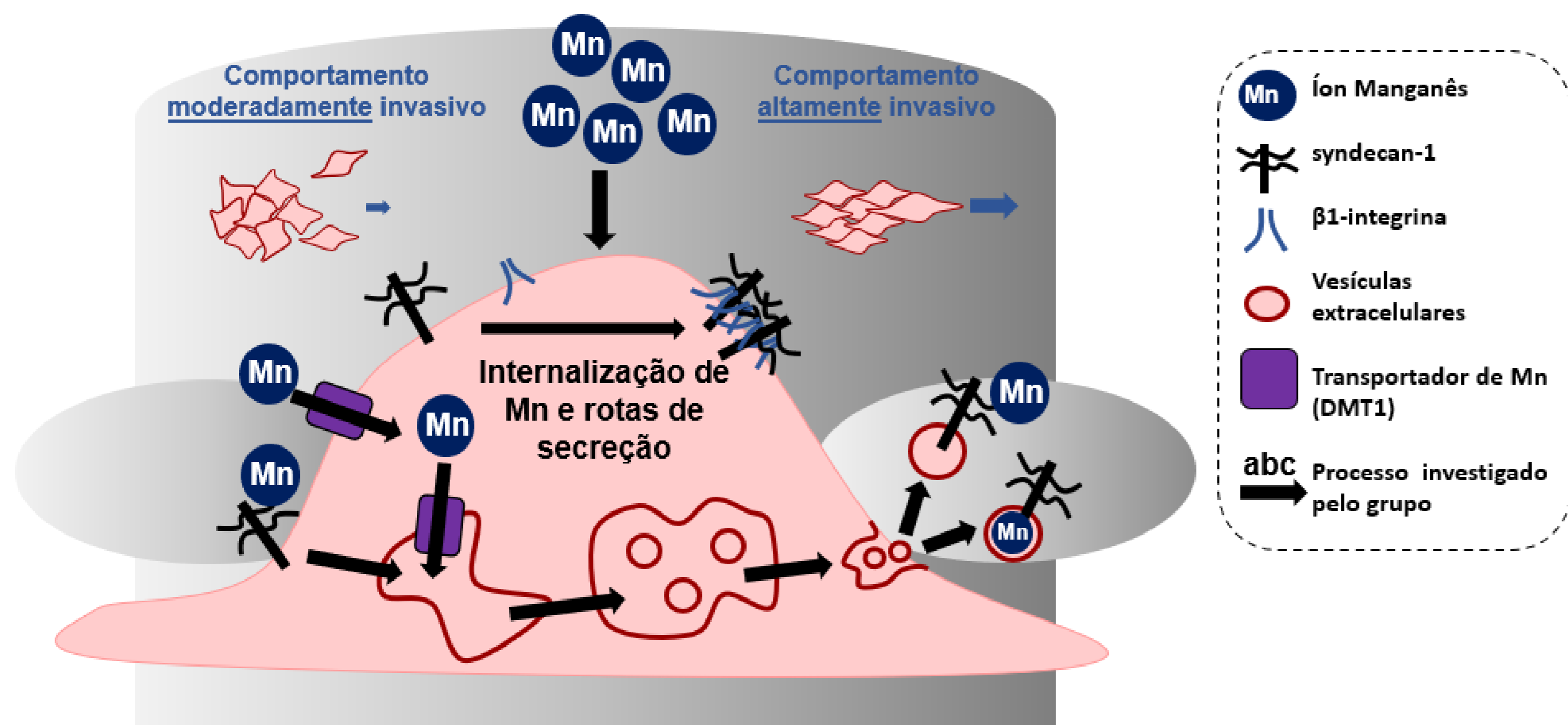


Figura 1: Resultados da pesquisa de nosso grupo e novas hipóteses sobre o transporte de manganês e sua correlação com a progressão tumoral. O manganês participa da progressão tumoral desde os estágios iniciais até os avançados, afetando o microambiente e modificando o comportamento das células tumorais. Nossos dados *in vitro* mostram que após exposição breve ou contínua ao meio de cultura contendo uma alta concentração de MnCl₂, as células tumorais LLC mudam seu padrão de migração de invasivo para altamente invasivo com aumento dos eventos de migração coletiva. As vesículas extracelulares também apresentam maior teor de Mn após uma breve exposição a uma alta concentração de Mn. Nossa hipótese envolve um transportador de metais responsável pelo desequilíbrio metalômico observado. O DMT1 é expresso nas membranas plasmáticas e nos endossomos e é um candidato promissor para participar da progressão tumoral associada ao desequilíbrio metálico.

OBJETIVOS

- Avaliar em um modelo celular se as vias de captação e distribuição de manganês dependem do transportador de metais divalentes DMT1, indicando-o como alvo relevante no câncer.
- Compreender como as vias de transporte de metais divalentes estão envolvidas no desequilíbrio metalômico de certos tipos de câncer.

METODOLOGIA

As células tumorais foram tratadas em cultura com uma concentração não tóxica de cloreto de manganês de 5 μM e direcionadas para as seguintes análises:

- Análise da expressão gênica do DMT1 (Níveis de expressão de mRNA do DMT1 analisados por PCR em tempo real);
- Mapeamento multielementar por fluorescência de raios X (XRF);
- Quantificação multielementar por ICP-OES (espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado).

2. Cultura de células LLC

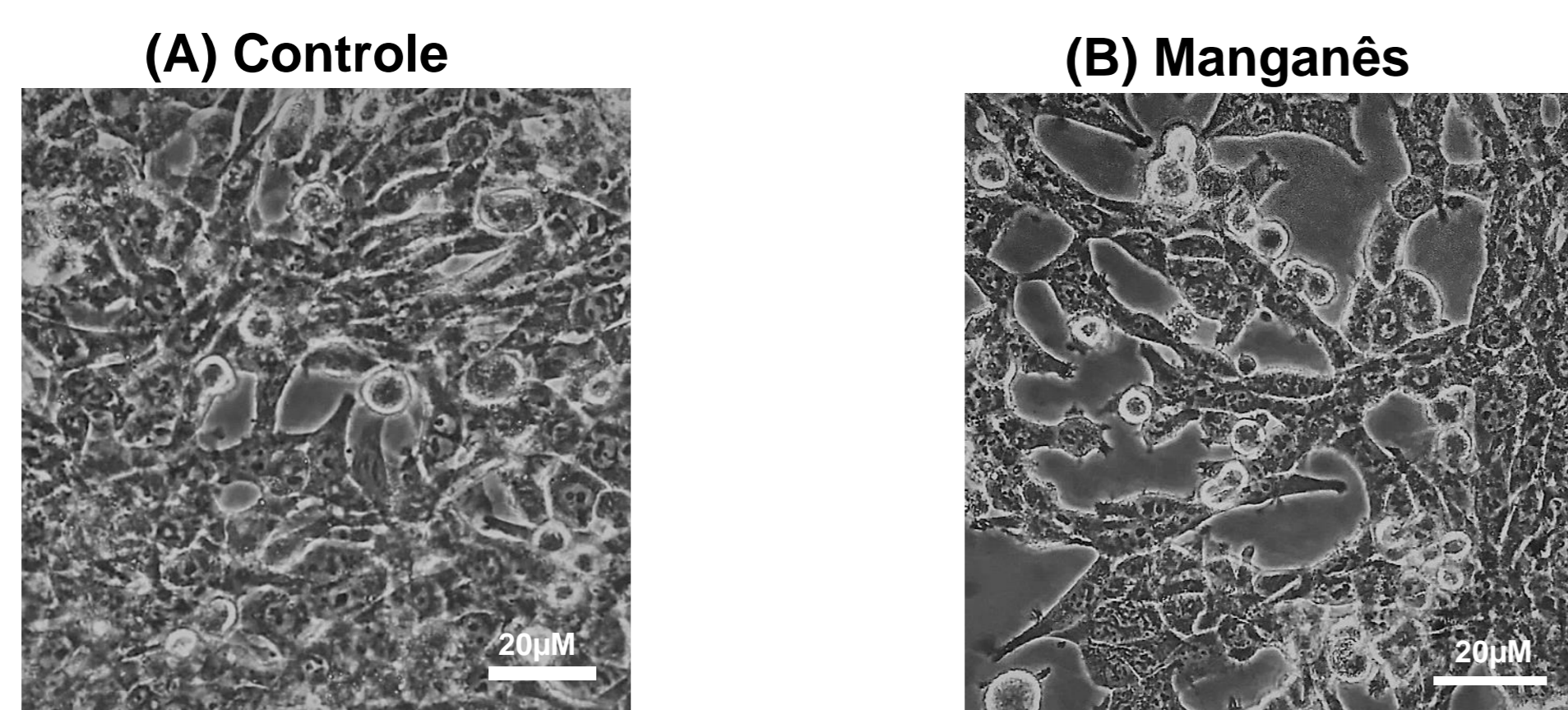


Figura 2: Morfologia de células LLC após exposição ao Mn. As células tumorais foram tratadas em cultura em condições de controle (A); e com a concentração não tóxica de cloreto de manganês de 5 μM por 24h (B). Escala: 20μM.

3. Análise da expressão do transportador DMT1

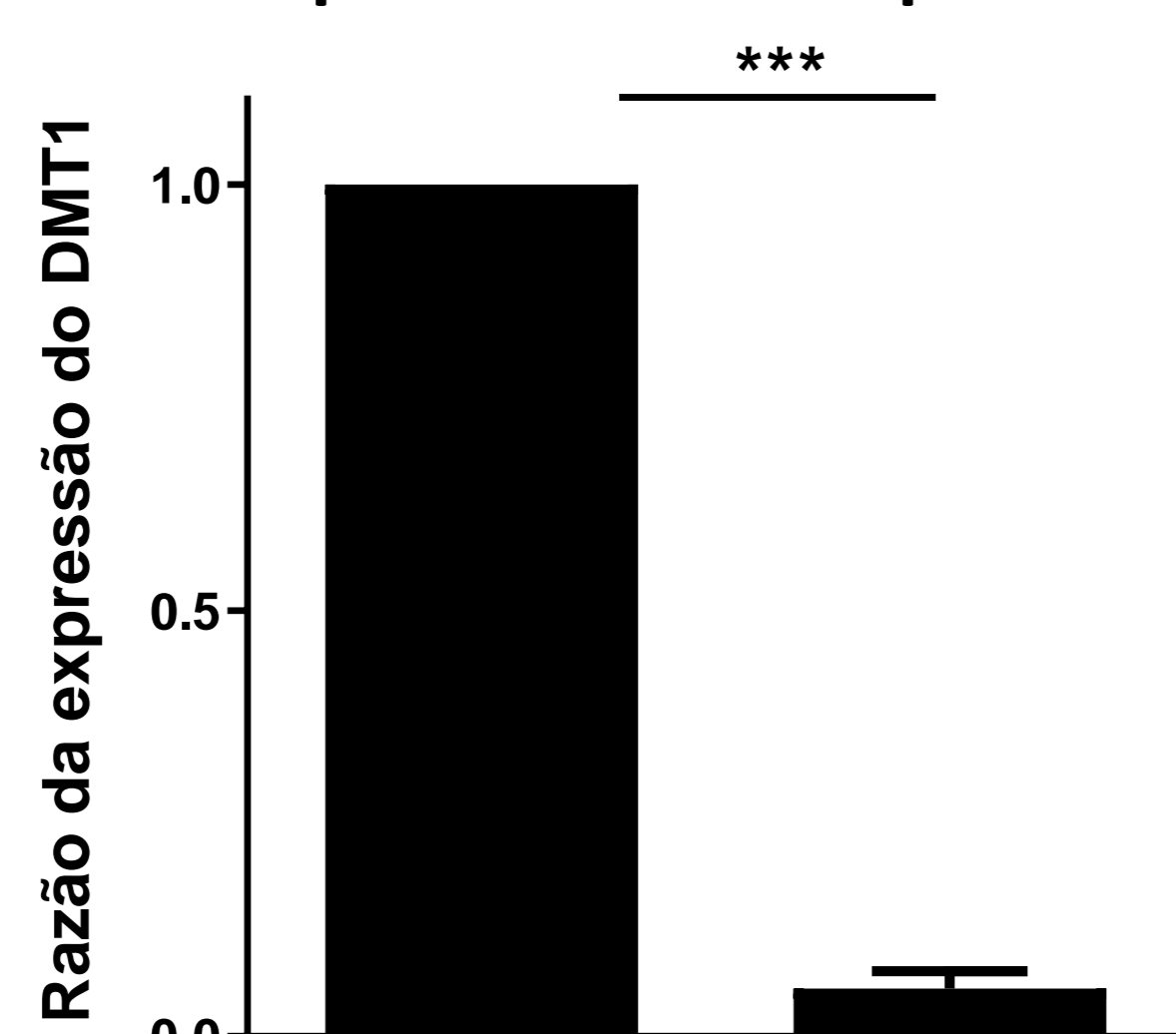


Figura 3: Análise dos níveis de expressão do transportador DMT1 na condição de exposição ao manganês em comparação à condição controle. As amostras foram suplementadas com 5 μM de cloreto de manganês por 24 horas, para a simulação de um microambiente tumoral com concentração elevada de manganês. As células foram analisadas quanto à expressão do transportador DMT1 por PCR em tempo real. N=5. Teste T de Student, ***p<0.0001

RESULTADOS

4. Análises de fluorescência de raios-X de células LLC

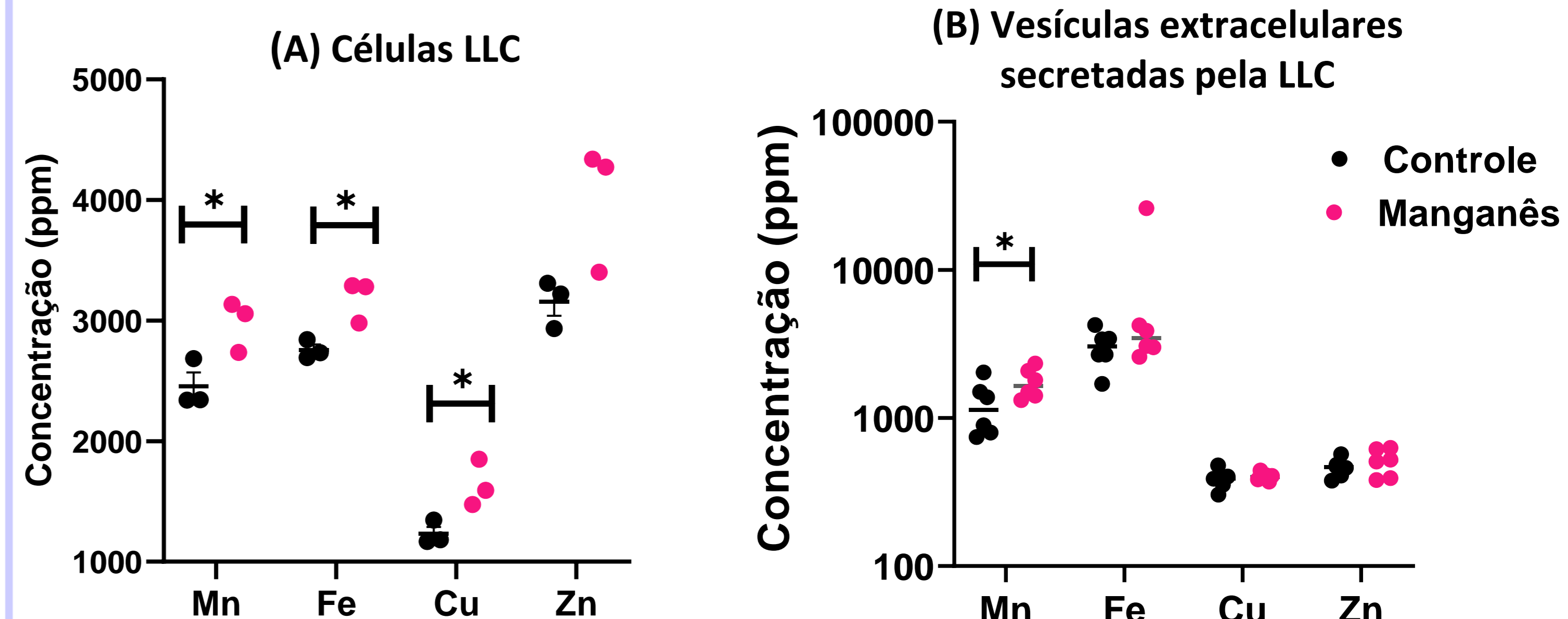


Figura 4: Quantificação dos elementos presentes nas amostras através de fluorescência de raio x das células LLC. (A) Células LLC expostas à alta concentração de manganês demonstram o aumento neste mesmo elemento, além de ferro e cobre, portanto deflagram desequilíbrio metalômico após exposição ao Mn. N=3. Teste T de Student, *p < 0,05 (B) Vesículas extracelulares derivadas de células LLC apresentam apenas elevação nos níveis de Mn, e não de cobre, revelando assim uma rota para a distribuição local e sistêmica de Mn durante a progressão do tumor. Teste T de Student. N=6. *p < 0,05.

5. Detecção da composição elementar das células LLC por ICP-OES

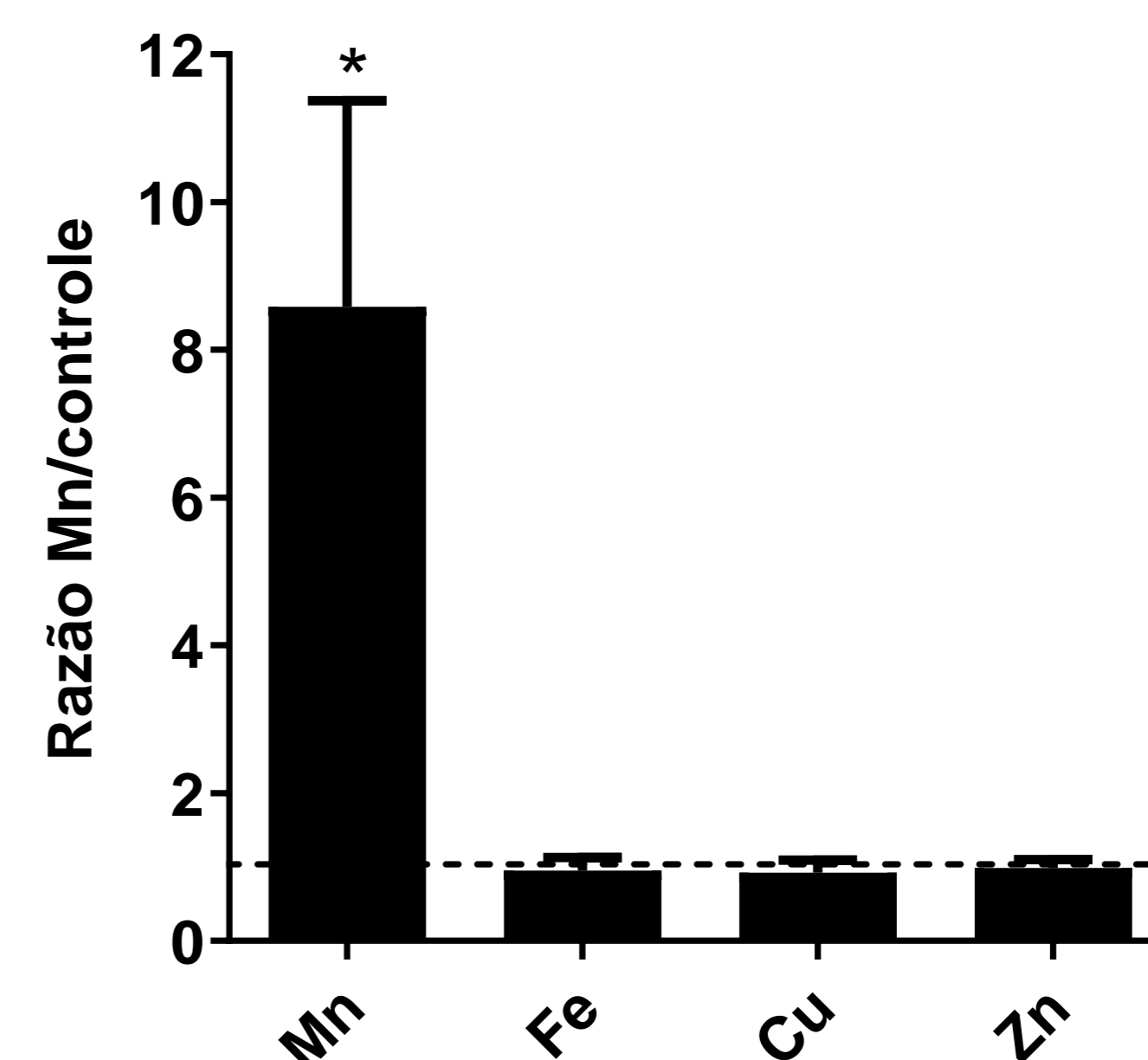


Figura 5: Detecção multielementar de metais transportados pelo DMT1 em células LLC tratadas com manganês. Através da técnica de ICP-OES (espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado), foi determinado que o manganês é o único metal encontrado alterado no componente intracelular da célula LLC

CONCLUSÃO E PRÓXIMOS PASSOS

Nossos resultados mostram que o transportador DMT1 é subexpresso após 24 horas de exposição ao Mn nas células LLC, entretanto, foi possível encontrar uma alta concentração desse elemento retido na célula. Este dado indica que a célula tumoral é capaz de reter esse elemento, mas também de subregular o transportador DMT1, o que é um indício de uma estratégia de captação do Mn pra aumento da malignidade, com uma regulação que favorece a proteção da célula contra os efeitos citotóxicos do acúmulo de Mn.

Nossas principais conclusões são:

- A expressão de DMT1 é afetada pela concentração local de Mn;
- A metalômica da célula LLC é perturbada pelo desequilíbrio de Mn;
- O desequilíbrio do metal da célula tumoral afeta especificamente o microambiente tumoral, pois apenas o Mn é alterado nas vesículas extracelulares derivadas das células tumorais.

Perspectivas futuras:

- Analisar a expressão de transportadores de extrusão de metais (ex: Hamp2 e SLC30A10) para avaliar a capacidade da célula de auto regular a sua concentração interna de Mn
- Analisar a capacidade de recuperação dos níveis de expressão do transportador DMT1 após a exposição da célula LLC ao manganês.
- Mapear a distribuição de metais transportados por transportadores como o DMT1 em resolução subcelular por fluorescência de raios X na linha de luz Carnaúba para definir a rota intracelular do manganês em tumores celulares.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho, oferecido pelas agências de fomento (CNPq, CAPES, FAPERJ, CNPEM, Fundação do Câncer e IFRJ) e instituições parceiras, e também à nossa instituição, IFRJ, pelo inestimável apoio.

REFERÊNCIAS

- STELLING, et al. *Sci Rep* 11, 15833 (2021).
- GARRICK, et al. *Biomaterials*, v. 16, n. 1, p. 41–54 (2003)
- MOUNICOU, et al. *Chemical Society Reviews*, v. 38, n. 4, p. 1119–1138 (2009)

Apoio: