

INTRODUÇÃO

A progressão tumoral é um processo caracterizado pelo acúmulo de mutações que resultam na aquisição de propriedades malignas. O manganês (Mn) é um elemento central na progressão tumoral, capaz de intensificar comportamentos típicos da malignidade: migração aumentada (individual e coletiva) de células tumorais acumuladoras de Mn (Stelling et al, 2021). Considerando sua biodisponibilidade variada no microambiente tumoral, a **expressão de transportadores de metais** possui potencial associação com a formação de nichos de alto Mn e um profundo desequilíbrio metalômico que envolve não somente o Mn, mas também outros metais.

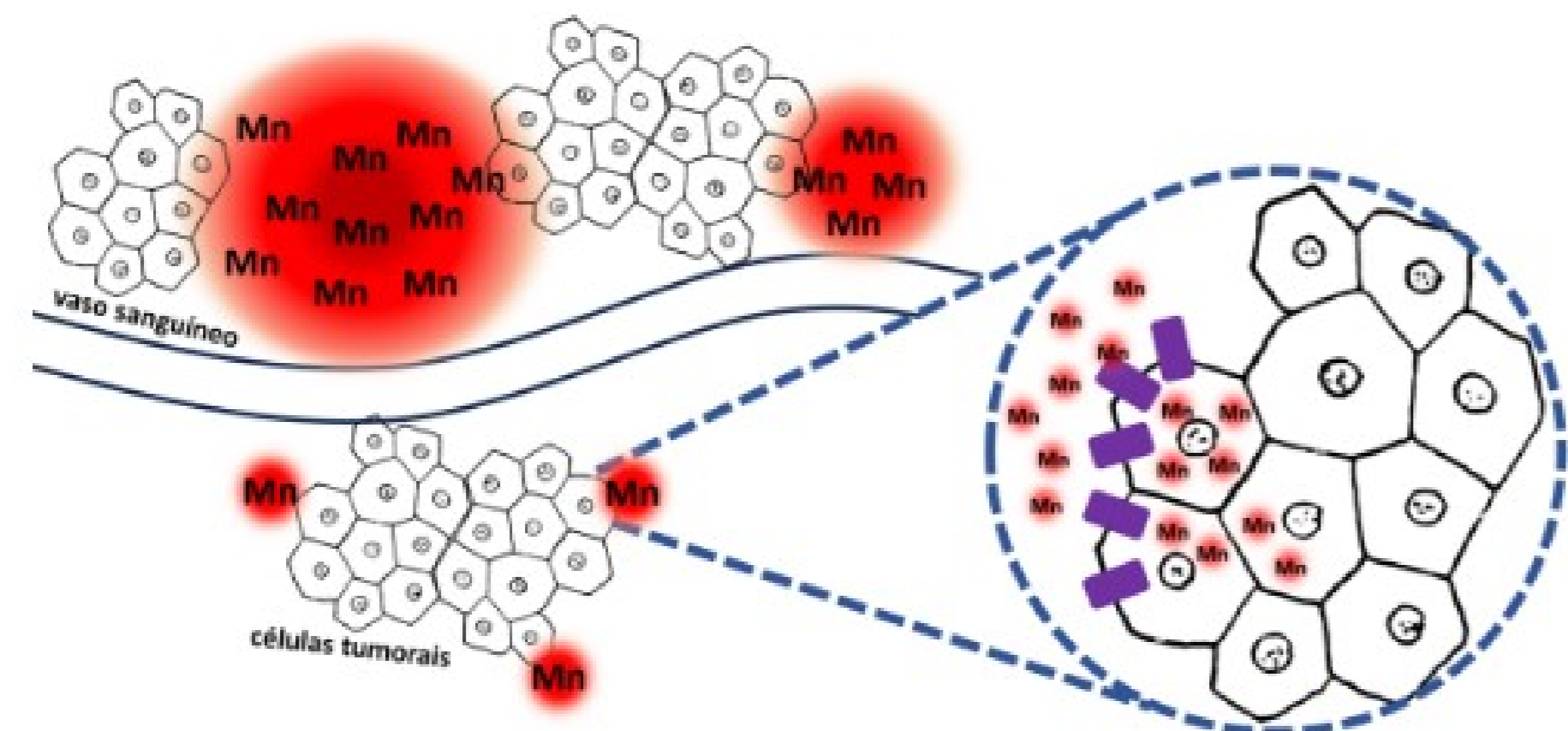


Figura 1. Representação esquemática das variações de Mn observadas no microambiente tumoral. Fonte: Stelling, Mariana; 2023.

OBJETIVOS

- Descrever a dinâmica de expressão gênica dos transportadores de metais, como o DMT1, ZIP8, ZIP14, ZnT1 e FPN1 em modelo celular de progressão tumoral com exposição a altas, porém não-tóxicas, concentrações de manganês.
- Investigar o papel do manganês, ferro, cobre e zinco como relação de causa e/ou consequência do desequilíbrio metalômico em células tumorais acumuladoras de manganês;

METODOLOGIA

1. Cultivo celular e exposição a sais de metais

O cultivo celular consiste na manutenção e crescimento das células em um ambiente artificial, permitindo realizar uma série de experimentos, como a **simulação de um microambiente tumoral**.

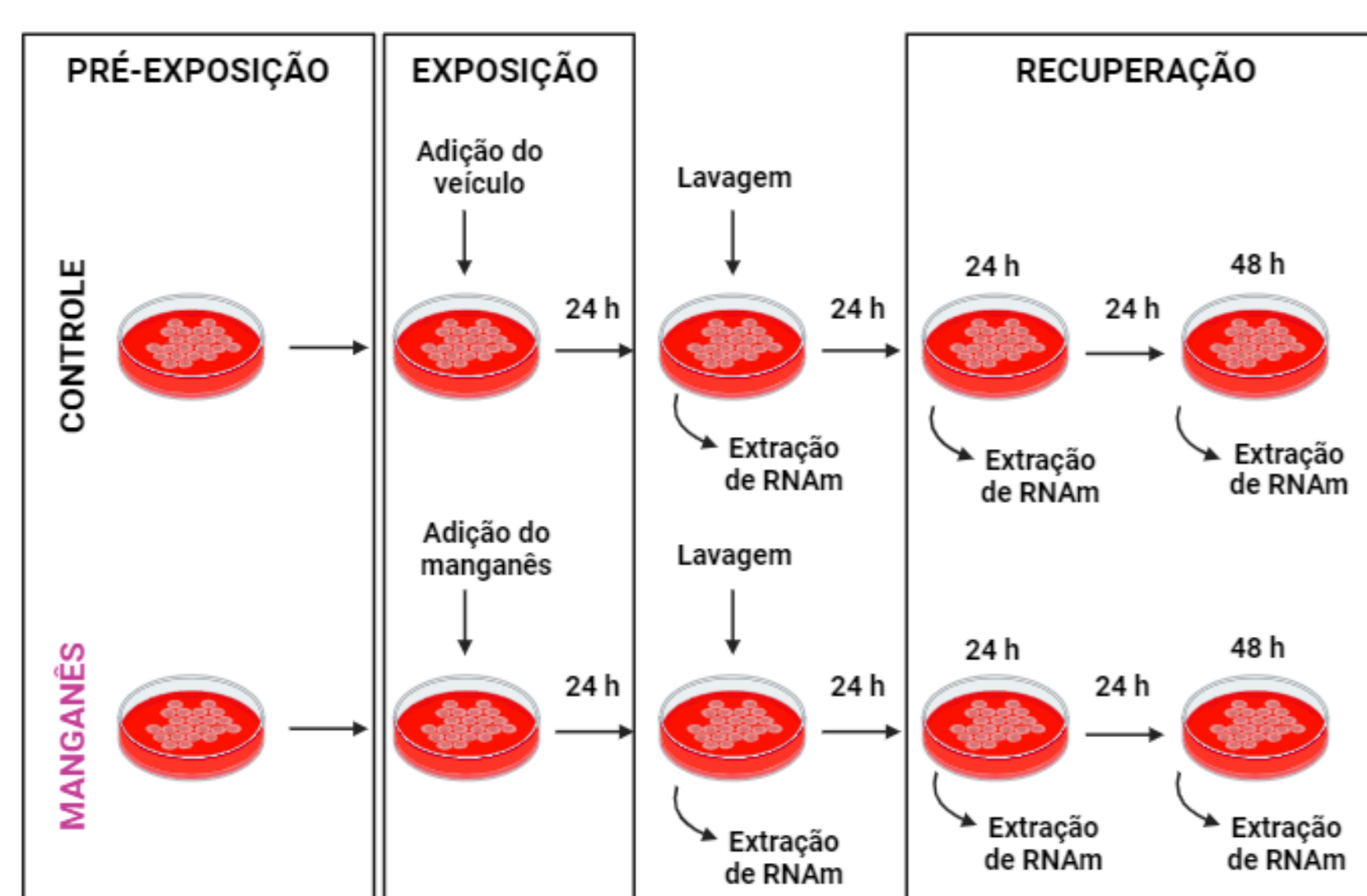


Figura 2. Esquemas representativos dos ensaios de exposição ao manganês e do protocolo experimental. Fonte: autoria própria.

2. Extração de RNAm e PCR em tempo real

Após os ensaios de exposição ao manganês, as células são coletadas para a extração de RNA mensageiro (RNAm) a partir de um minikit comercial a fim de se analisar a expressão de genes de interesse.

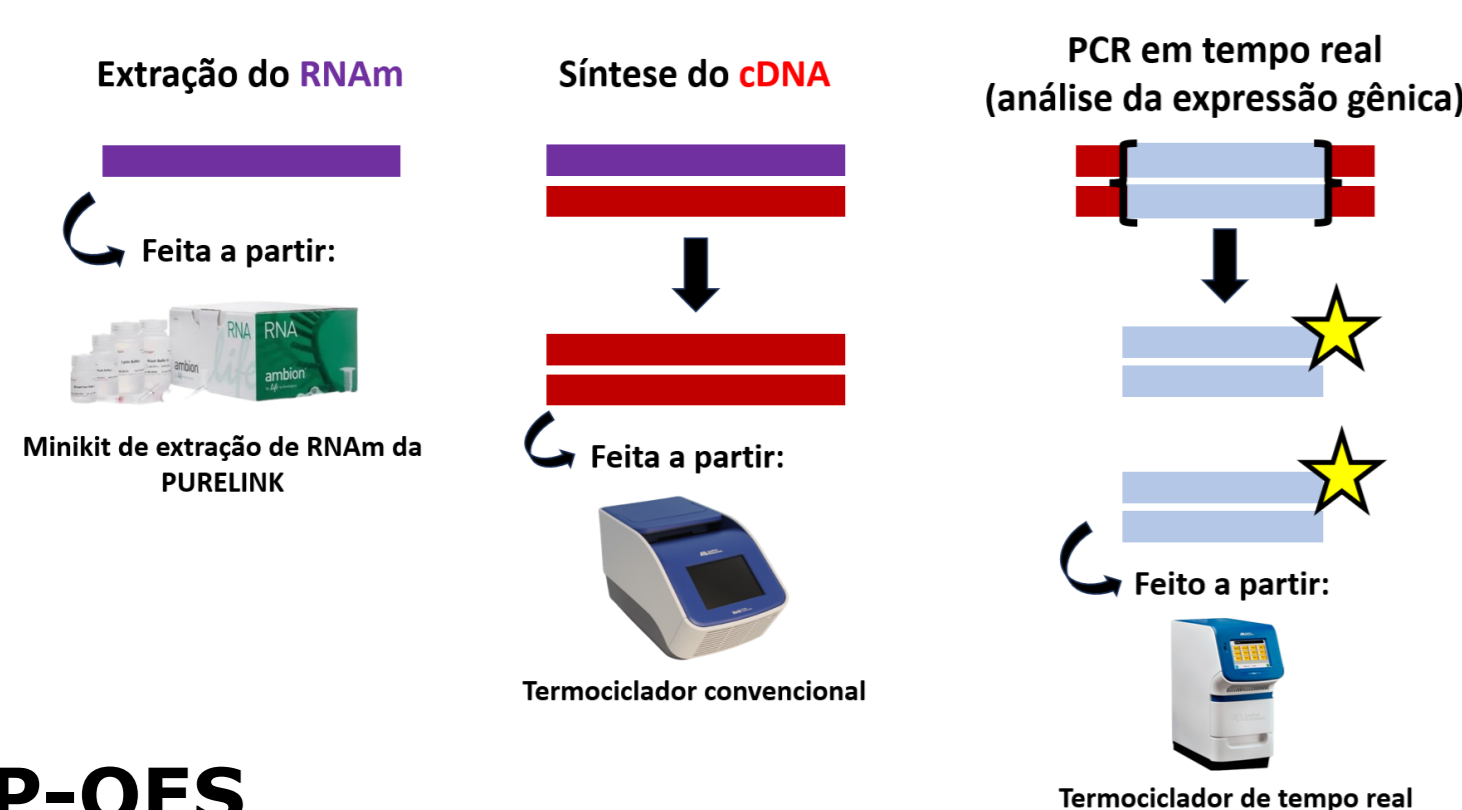


Figura 3. Procedimento de extração de RNAm e de PCR em tempo real simplificado. Fonte: autoria própria.

3. ICP-OES

A composição multielementar da fração solúvel de células LLC foi analisada por Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES), utilizando-se alíquotas do meio de cultura das células condicionadas em diferentes momentos do experimento.

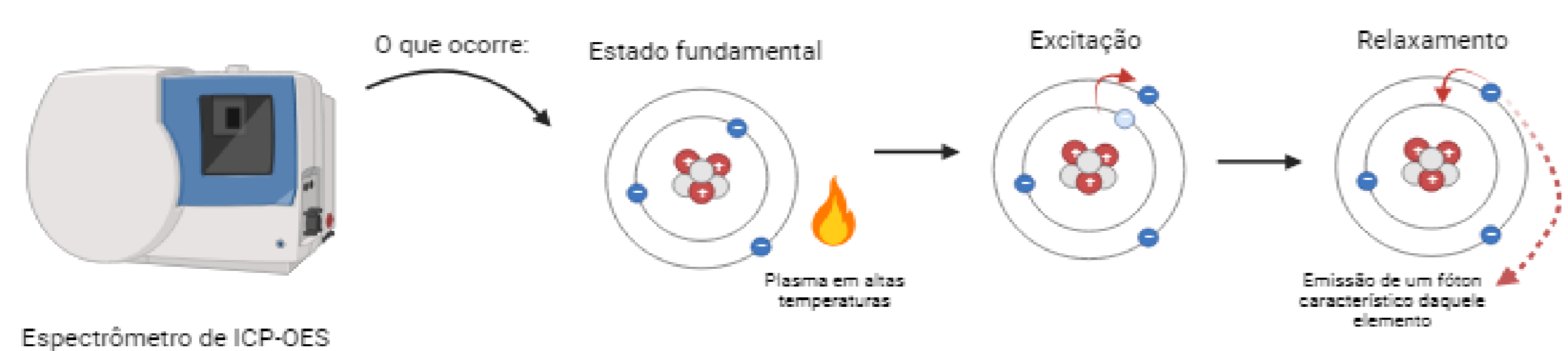


Figura 4. Esquema representativo do princípio da técnica de ICP-OES. Fonte: autoria própria.

RESULTADOS

1. A morfologia da célula tumoral da linhagem LLC não é alterada após longa exposição ao cloreto de manganês (II)

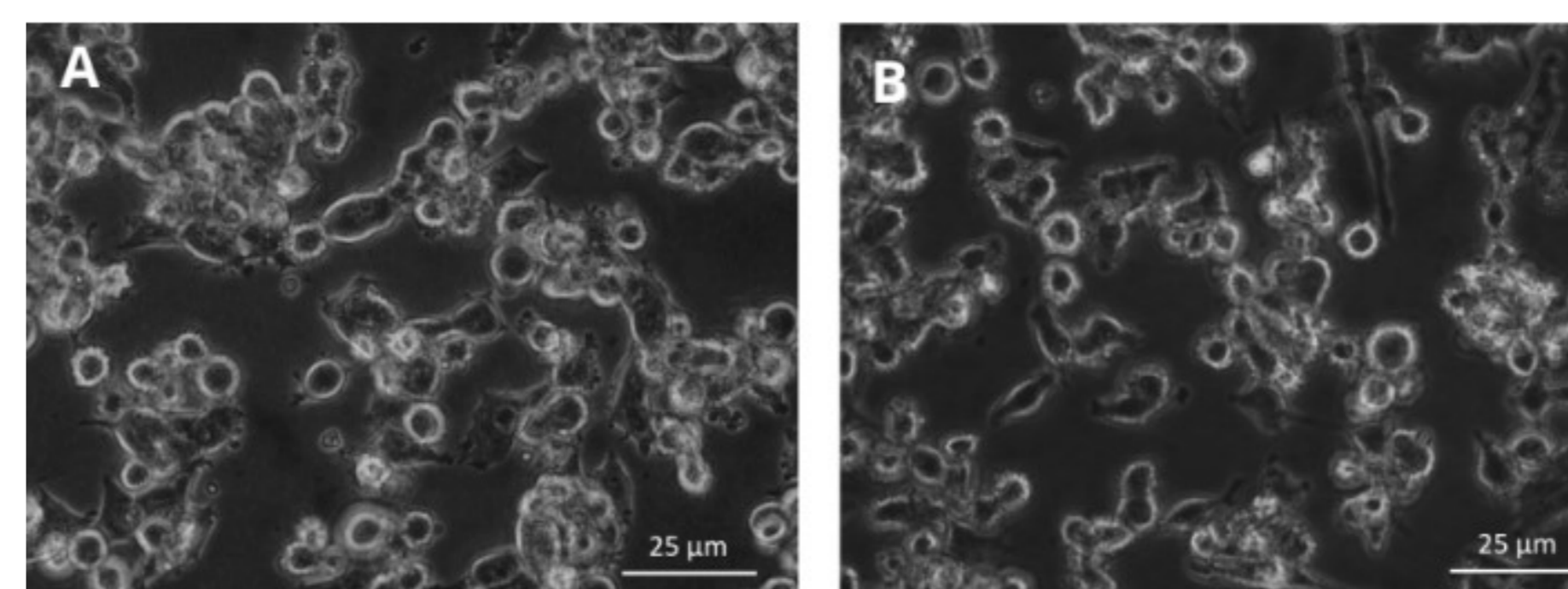


Figura 5. Fotomicrografias da linhagem tumoral murina de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC). Condição (A) controle; (B) cloreto de manganês (II) 5 µM. Barra de escala: 25 µm. Fonte: autoria própria.

2. As células LLC absorvem o manganês do meio e o secretam de volta posteriormente, modulando a metalômica do microambiente tumoral

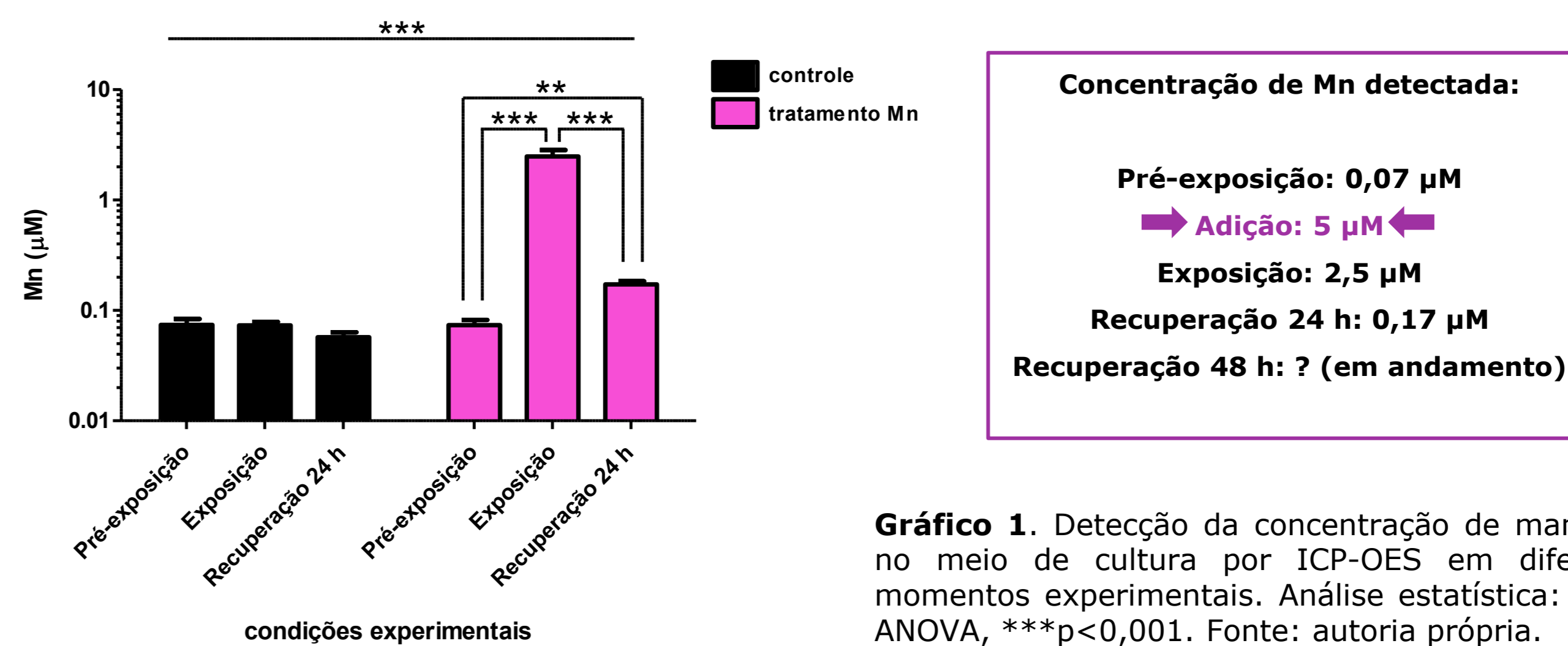
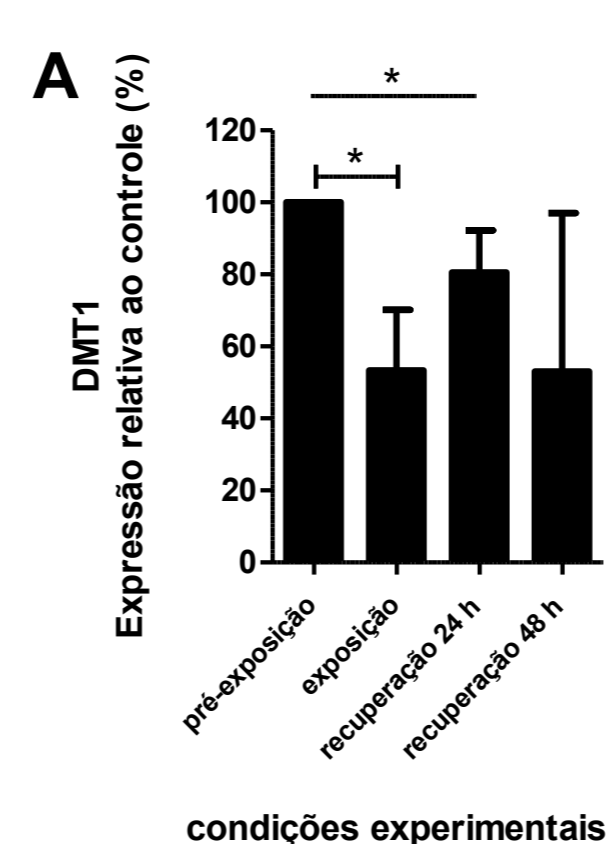


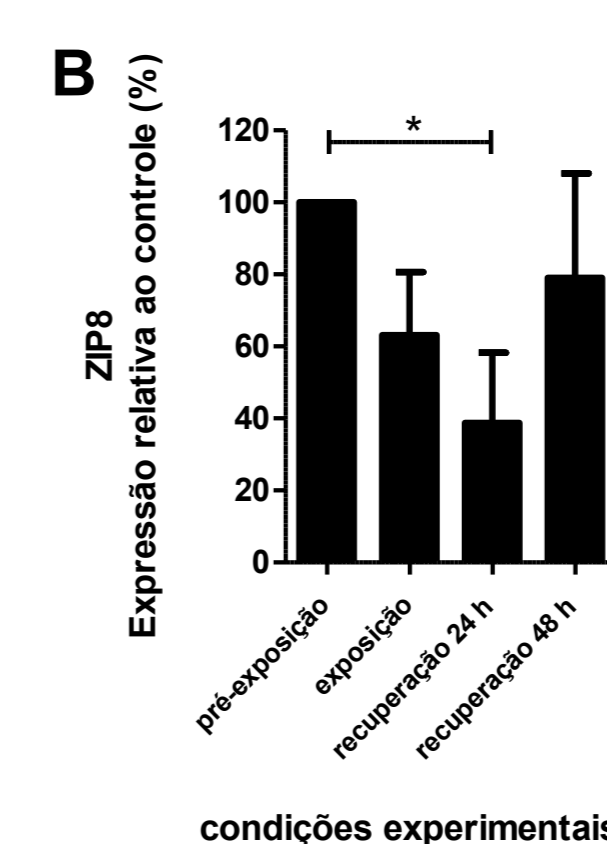
Gráfico 1. Detecção da concentração de manganês no meio de cultura por ICP-OES em diferentes momentos experimentais. Análise estatística: 2-way ANOVA, ***p<0,001. Fonte: autoria própria.

3. O manganês modula a expressão de transportadores de metais nas células tumorais LLC

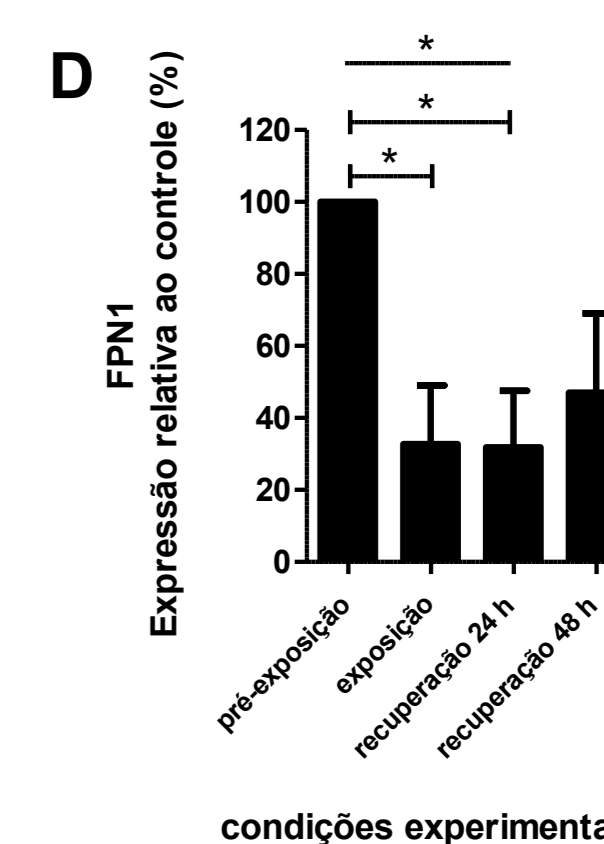
3.1. A EXPRESSÃO DE DMT1 OSCILA DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO DE Mn NO MEIO DE CULTURA



3.2. A EXPRESSÃO DE ZIP8 E O ZnT1 É AFETADA DE FORMA MAIS SENSÍVEL APÓS EXPOSIÇÃO AO Mn



3.3. A FPN1, UM EXPORTADOR DE Mn, MANTÉM SUBEXPRESSION LATENTE



Gráficos 2 a 5. Análise dos níveis de expressão gênica dos transportadores de metais (A) DMT1 (N=5), (B) ZIP8 (N=5), (C) ZnT1 (N=3) e (D) FPN1 (N=3). A condição "recuperação 48 h" possui apenas N=2 para todos os transportadores. Análises estatísticas: ANOVA com pós-teste de Tukey. *p<0,05, **p<0,01. Fonte: autoria própria.

ANÁLISE E CONCLUSÃO

Os diferentes perfis de modulação dos transportadores na presença de um meio enriquecido em manganês indicam sua relevante ação moduladora da metalômica tumoral. Os mecanismos de regulação cíclica aqui descritos podem ser interpretados como mecanismos de proteção da célula tumoral contra o acúmulo exacerbado de manganês (efeitos citotóxicos), além de trazer à luz uma estratégia de perpetuação de um microambiente rico em Mn que, consequentemente, intensifica a malignidade.

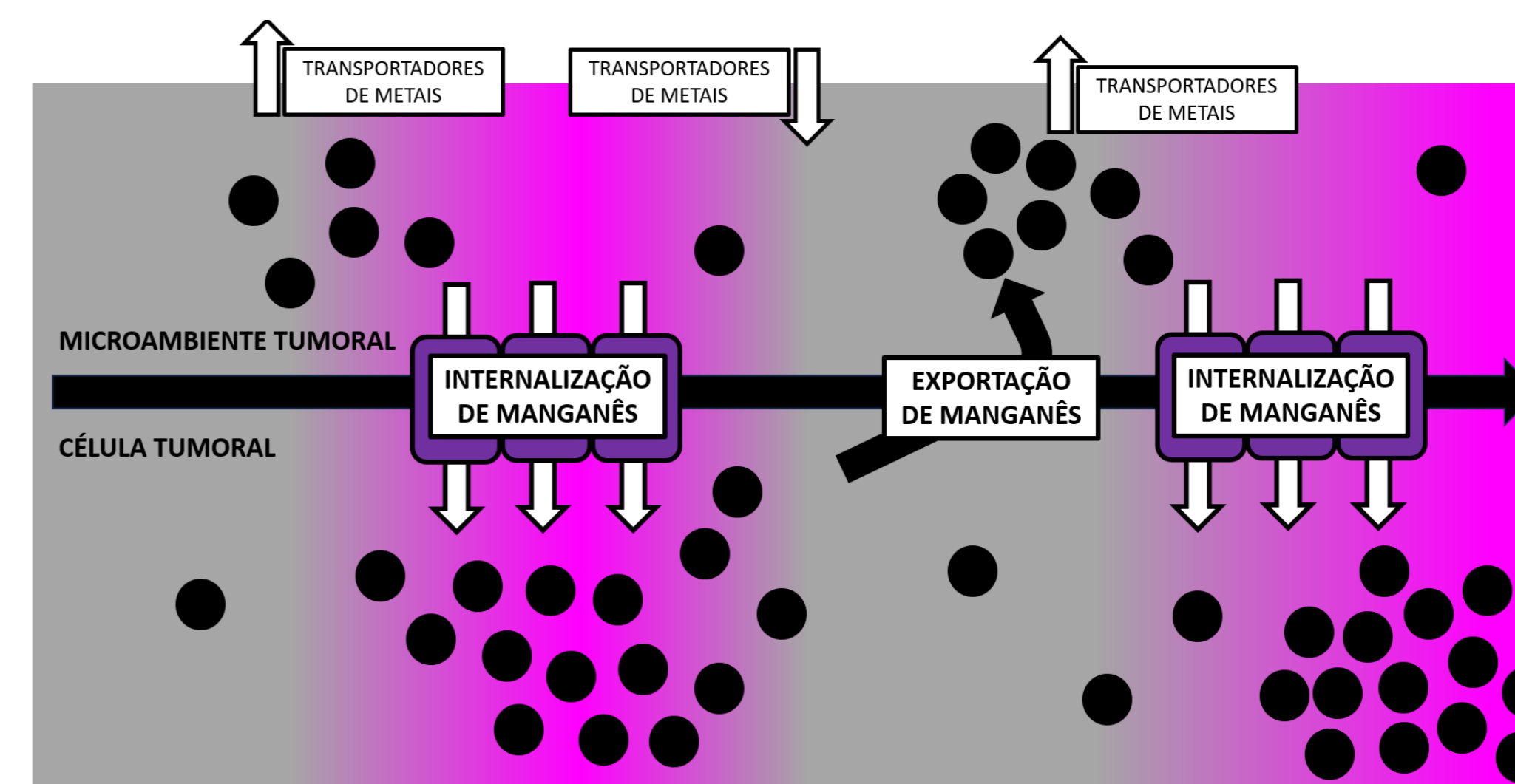


Figura 6. Esquema das hipóteses relativas à dinâmica da resposta celular tumoral às variações de metais do microambiente. Fonte: Stelling, Mariana; 2023.

Concluímos 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, ZIP8 e FPN1), assim como do transportador ZnT1, que não transporta Mn, indicando uma **complexa rede regulatória da metalômica tumoral**. Ainda, as medidas dos níveis de manganês no meio de cultura antes, durante e após a exposição ao manganês indicam que as **células tumorais que acumulam manganês em momentos em que este elemento se encontra em abundância no microambiente, também são capazes de secretá-lo quando este se encontra em concentrações discretas no microambiente**, tal mecanismo é capaz de potencializar a malignidade promovida pelo manganês.

PRÓXIMOS PASSOS

1. Quantificação do Mn por ICP-OES da condição "recuperação 48 h" no meio de cultura;
2. Analisar o perfil de expressão gênica dos transportadores, assim como a concentração de Mn no meio de cultura em períodos mais longos;
3. Análise do perfil de expressão do transportador ZIP14;
4. Imageamento do Mn em resolução subcelular por fluorescência de raios-X na fonte de luz síncrotron, Sirius (CNPEM, SP);
5. Escrita do manuscrito para publicação do trabalho em revista científica internacional e indexada.

REFERÊNCIAS & AGRADECIMENTOS

1. 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.
2. 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.
3. 6. 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.

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. Também agradecemos aos colaboradores do projeto na UFRJ, na PUC-Rio e no CNPEM que contribuíram valiosamente para o avanço de nossa pesquisa.

