

uma nova via terapêutica para tumores invasivos

Autores : Carolina de Araujo Pereira da Silva (aluna); Juliana do Carmo Godinho (coorientadora) ; Mariana Paranhos Stelling (orientadora)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – Campus Maracanã - Rio de Janeiro
carolinadapsilva@gmail.com

Introdução

O desequilíbrio de metais afeta o comportamento celular, uma vez que metais como o **manganês (Mn)** contribuem para a carcinogênese, promovendo alterações no ciclo celular, resistência à morte celular, invasão e malignidade. Para compreender o estabelecimento do desequilíbrio metalômico promovido pelo Mn, investigamos previamente as vias de transporte de metais, como o **DMT1, principal transportador de Mn** em mamíferos. Observamos anteriormente que a biodisponibilidade de Mn afeta a expressão do DMT1, criando um ciclo de promoção tumoral. Assim, transportadores transmembranares são alvos terapêuticos promissores. Inibidores como **salinomicina**, têm potencial para bloquear o DMT1, mas sua ação no transporte específico de Mn é pouco estudada. Neste viés, a salinomicina oferece um tratamento promissor em nosso modelo.

Hipótese

- ✓ A aplicação do inibidor SALINOMICINA no DMT1 afeta o potencial de membrana induzindo à morte celular das células tumorais;
- ✓ A inibição do DMT1 corrobora de forma terapêutica ao impedir o mecanismo estimulatório de malignidade de regulação do Mn pelo DMT1;
- ✓ A heparina pode ser coadjuvante ao tratamento com salinomicina de maneira a sequestrar o Mn liberado pelas células mortas, evitando sua recaptção no microambiente.

Objetivos

- ✓ Investigar o papel do Mn na progressão tumoral em células tumorais e sadias que acumulam esse metal;
- ✓ Descrever uma inibição seletiva através da utilização de inibidores (como a salinomicina) em alvos específicos do transporte de Mn em células tumorais, freando a progressão do câncer sem prejudicar células saudáveis;

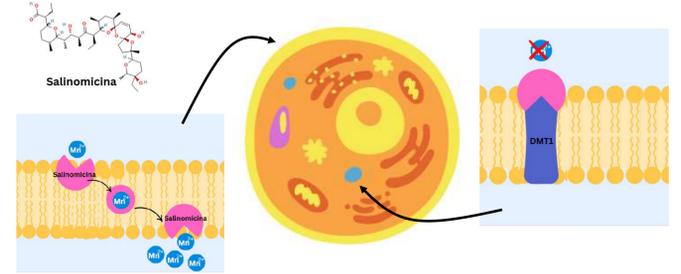


Figura 1. Visão geral de alvos da salinomicina e seu mecanismo de ação por meio da ação em células cancerosas

Metodologia

1. Cultura de células e ensaios de exposição ao Mn

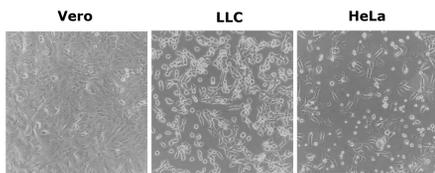


Figura 2. Linhagens celulares utilizadas no trabalho. Vero é uma linhagem sadia de epitélio renal de primata; LLC é um carcinoma pulmonar murino; HeLa é um carcinoma cervical humano. A linhagem LLC foi aplicada em diversos ensaios, enquanto as linhagens HeLa e Vero está na fase de ensaios iniciais.

2. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

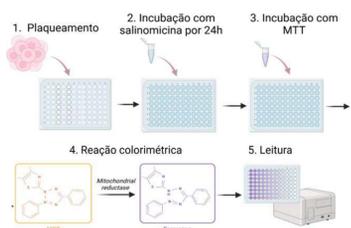


Figura 3. Esquema representativo do ensaio de MTT feito para as linhagens LLC, HeLa e Vero para testar a viabilidade das células frente a diferentes concentrações de salinomicina

3. Tratamento das células tumorais com o sal de salinomicina



Figura 4. Diagrama do ensaio de exposição à salinomicina

4. Ensaio de quantificação da migração celular

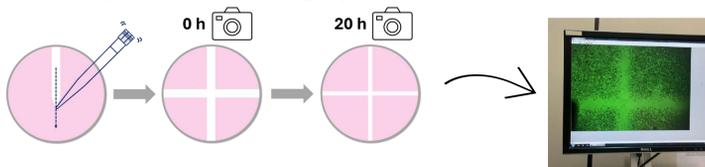


Figura 5. Diagrama do ensaio de migração.

5. Ensaio de sobrevivência celular (clonogênico)

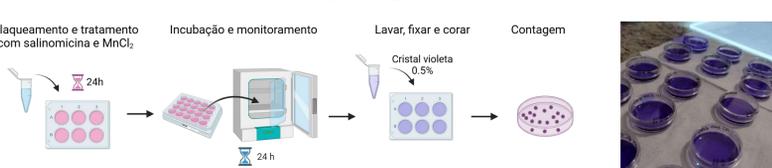


Figura 6. Diagrama do ensaio de sobrevivência celular.

6. Espectroscopia de emissão óptica para quantificação de elementos em solução

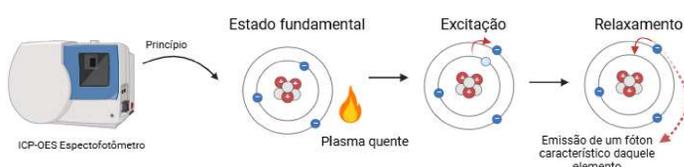


Figura 7. Esquema de funcionamento do ICP-OES

7. Fluorescência de raios-X (XRF)

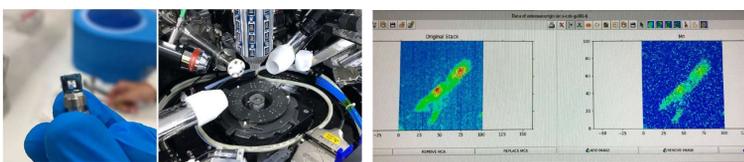


Figura 8. Fotos tiradas pelo grupo de pesquisa na linha de luz Carnauba, na fonte de luz Sirius (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, CNPEM).

Agradecimentos

Agradecemos aos colaboradores deste projeto: Laboratório de Espectroscopia (PUC/Rio), Simone Cardoso (UFRJ), Carlos Pérez (CNPEM), Bernardete Spisso (Fiocruz) e às agências de fomento – CNPq, CAPES, FAPERJ, CNPEM, Fundação do Câncer, IFRJ e instituições parceiras – pelo suporte financeiro essencial à realização deste projeto.



Resultados e discussão

1. O manganês (Mn) afeta a migração da célula tumoral LLC de forma refratária

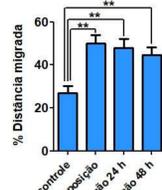


Gráfico 1. Atividade de migração de células LLC em diferentes momentos experimentais. **p<0,01; One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey. N = 4.

2. A salinomicina, inibidora do transportador de Mn, DMT1, pode ser utilizada para testes nas linhagens celulares na faixa, definida através do ensaio de viabilidade celular MTT, de 1 a 5 µM

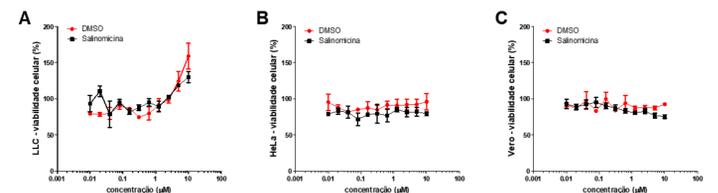


Gráfico 2. Viabilidade celular em concentrações crescentes de salinomicina e DMSO. (A) Linhagem LLC N1; (B) Linhagem HeLa N=3; (C) Linhagem Vero N=3. Fonte: Autoria própria.

3. A salinomicina induz a morte de células tumorais e seu efeito é acentuado em 5 µM, porém, a 1 µM ela também apresenta efeito significativo

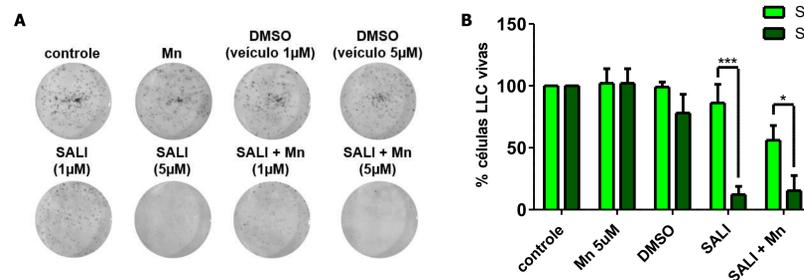


Figura 9. Células tumorais LLC expostas a meio de cultura suplementado com 5µM MnCl₂, salinomicina a 1 e 5µM e DMSO (veículo). As células foram analisadas através do ensaio clonogênico. N=4. 2-way Anova com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05, ***p<0,001.

4. A salinomicina 1 µM afeta a metalômica da célula LLC, selecionando células com menor conteúdo de Mn e Fe, indicando a especificidade de sua atividade sobre o transportador DMT1

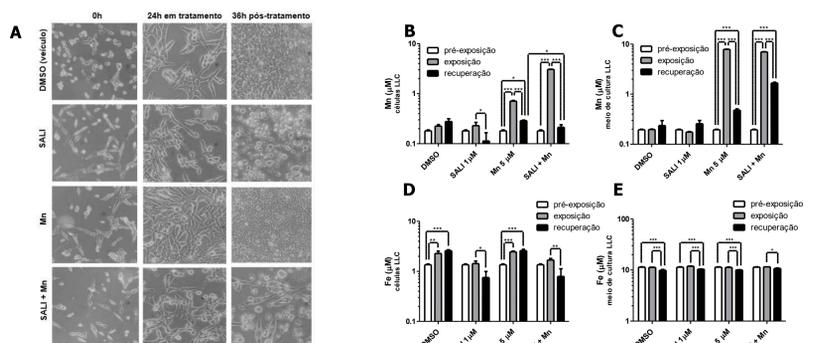


Figura 10. Células tumorais LLC expostas a meio de cultura suplementado com 5µM MnCl₂, salinomicina a 5µM e DMSO (veículo). As células remanescentes após 24h de incubação foram analisadas por ICP-OES para quantificação do Mn. N=3. 2-way Anova com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05, ***p<0,001.

5. A salinomicina 5 µM, além de eliminar 85% das células LLC, seleciona uma população de células com reduzida capacidade de acumular Mn

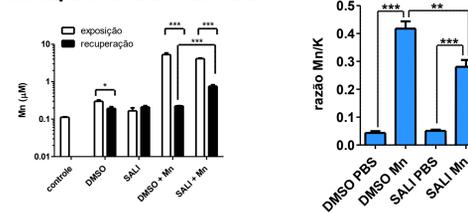


Figura 11. Células tumorais LLC expostas a meio de cultura suplementado com 5µM MnCl₂, salinomicina a 5µM e DMSO (veículo). As células remanescentes após 24h de incubação foram analisadas por ICP-OES para quantificação do Mn. N=3. 2-way Anova com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05, ***p<0,001.

6. A salinomicina afeta a distribuição de Mn na célula LLC, porém, não apresenta efeito evidente em células sadias da linhagem 3T3 de fibroblasto murino

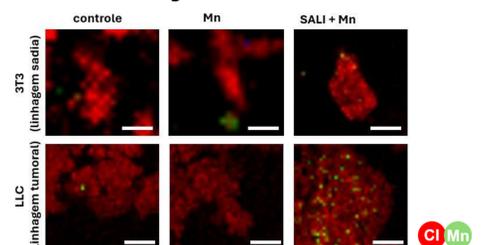


Figura 12. Células tumorais LLC tratadas com salinomicina 5 µM com manutenção das células sobreviventes e análise de sua capacidade de captação de Mn por ICP-OES. N=3. 1-way Anova com pós-teste de Bonferroni. **p<0,01, ***p<0,001.

Figura 13. Mapas multielementares de sobreposição dos elementos cloro (vermelho) e manganês (verde). Ambas as linhagens, 3T3 e LLC, foram cultivadas no mesmo meio de cultura e submetidas aos mesmos tratamentos: 1h de incubação com MnCl₂ (Mn) 5 µM, seguido de 3h de incubação com salinomicina (SALI) 5 µM. Fluorescência de raios-X de alta resolução por radiação síncrotron. Barra de escala: 10 µm.

Considerações finais

Os dados obtidos neste projeto mostram que o DMT1 é um alvo relevante no tratamento de tumores agressivos e responsivos a Mn e que inibidores como a salinomicina têm grande potencial para atuar sobre as vias de transporte do Mn. Mais estudos são necessários para se avaliar a especificidade e segurança do uso de inibidores de DMT1, assim como formulações que visem a entrega do fármaco diretamente ao tumor. Assim, nossas perspectivas incluem analisar a resposta de células sadias ao Mn e à salinomicina, assim como estudar as possíveis formas de administração da salinomicina.

Próximos passos

- ✓ Analisar a resposta de células sadias ao Mn, como da linhagem Vero;
- ✓ Realizar mais testes para a linhagem HeLa;
- ✓ Estudar possíveis formas de administração de salinomicina;
- ✓ Investigar heparina como uma estratégia de sequestro de Mn;
- ✓ Escrita de um artigo científico.