

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE ZINCO E DO  
PERFIL DE EXPRESSÃO DE SEUS TRANSPORTADORES NA LINHAGEM  
CELULAR DE ADENOCARCINOMA RENAL HUMANO**

Programa 8 - BIOTECNOLOGIA

Atividade 820 - Biofármacos

**Coordenação** - Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena Bellini Marumo

**Equipe** –

Dr. Julio Takehiro Marumo – Gerente da Gerência de Rejeitos  
Radioativos

Tania Regina de Borba – doutoranda - CB

Luiz Felipe Teixeira – mestrando - CB

## Resumo

O carcinoma de células renais (CCR) representa, aproximadamente, 2 a 3% dos tumores malignos humanos e é o mais agressivo dos tumores urológicos. O subtipo mais frequente de CCR é o de células claras (CCRcc). A maioria dos pacientes com CCRcc possui mutação no gene supressor tumoral de vonHippel-Lindau (VHL) o que resulta em um aumento da transcrição de vários fatores angiogênicos. A identificação do carcinoma de células renais ocorre, em geral, de forma incidental por meio de uma tomografia abdominal, visto que não apresenta sintomas. Este é um dos principais motivos pelos quais, muitas vezes, o diagnóstico é feito tardiamente, o que reduz as chances de maior sobrevida. Sabe-se que o fator de transcrição nuclear KB (NF-kB) está presente em todos os tipos celulares e que regula processos patológicos de inflamação e resposta imune, estresse oxidativo, carcinogênese, sobrevivência celular e apoptose. Quando NF-kB é ativado, migra para o núcleo e ativa transcrição de genes relacionados ao CRR, como é o caso da p.50. Como revela a literatura, o Zinco está envolvido em uma série de funções fisiológicas, incluindo a regulação da rota do NF-kB, além disso, observou-se que os pacientes com CCR e mesmo outros tipos de carcinomas, têm taxas reduzidas de Zinco, o que leva a inferir que possa existir alguma relação com os transportadores de Zn. Este trabalho se propõe a investigar papel na homeostase do Zinco e seus transportadores no CCRcc e nas células do epitélio tubular renal.

Palavras-chave: CCR, Zinco, ZIP, ZNT, ICP-OES

# 1. Introdução

## Carcinoma de células renais

O termo carcinoma de células renais (CCR) refere-se às neoplasias epiteliais do parênquima renal com potencial maligno e engloba um grupo heterogêneo de tumores.<sup>1</sup>

Este tipo de câncer é único por apresentar resistência às terapias tradicionais para o câncer, como a radioterapia e quimioterapia padrão.<sup>2</sup> Histologicamente, segundo a classificação de Heidelberg, existem quatro tipos principais de tumores: o CCR de células claras (70%), o tumor papilífero (10 -15%) o tumor cromóforo (4-5%), o carcinoma do ducto coletor (1%).<sup>3</sup> Outros tipos patológicos como o carcinoma associado à translocação Xp11, o carcinoma renal mucinoso de células tubulares e fusiformes e o carcinoma cístico multilocular foram adicionados à lista, todos compondo < 1% dos casos (tabela 1).

Tabela 1. Principais subtipos histológicos do CRR – epidemiologia, histologia e características de imagem.<sup>4</sup>

Subtipo	Incidência	Origem, histologia	Idade	Padrão de sinal/densidade	Comportamento biológico	Padrão hemodinâmico após contraste	Associações e predisposições
Células claras	75%	Néfron proximal, epitélio tubular	Acima de 50 anos	Densidade/sinal heterogêneos	Agressivo, de acordo com o estágio, grau de Furhman e alterações sarcomatoides	Hipovascular	Von Hippel-Lindau (25-45%), esclerose tuberosa (2%)
Papilífero	10%	Néfron distal, epitélio tubular	Acima de 50 anos	Baixo sinal T2, hipodenso	Agressivo, de acordo com o estágio, grau de Furhman e alterações sarcomatoides	Hipovascular	CCR papilífero hereditário
Cromóforo	5%	Néfron distal, células intercalares dos túbulos distais	Acima de 50 anos	Hipodenso, sinal intermediário	Baixa mortalidade (10%)	Hipovascular	Síndrome de Birt-Hogg-Dubé (em associação com oncocitomas)
Cístico-sólido	1-4%	Semelhante ao células claras, sem nódulos sólidos	Quarta e quinta décadas de vida	Alto sinal T2, densidade líquida	Indolente, sem metástases	Realce de porções sólidas e septos	Predomínio no gênero masculino
Dutos coletores (Bellini)	1%	Túbulos coletores	Acima de 50 anos	Baixo sinal T2, heterogêneo	Muito agressivo, mortalidade de 70% em dois anos	Hipovascular	Discreto predomínio no gênero masculino
Medular	1%	Néfron distal	Segunda e terceira décadas de vida	Heterogêneo, infiltrativo	Extremamente agressivo	Hipovascular	Associado a anemia falciforme
Translocação Xp11	Raro	Néfron distal/proximal, pode se assemelhar ao papilífero ou células claras	Crianças (primeira infância)	Hipodenso, sinal intermediário T2	Indolente	Hipovascular	Gene TFE3 envolvido em sua gênese
Tubulomucinoso e de células fusiformes	Raro	Néfron distal, células tubulares	Quarta e quinta década de vida	Discreto hipersinal T2, pode ter cicatriz central	Crescimento lento, metástases raras	Hipovascular	Predomínio no gênero feminino
Associado a neuroblastoma	Raro	Epitélio tubular proximal	Adolescência (média: 13 anos)	Hipodenso, sinal intermediário T2	Indolente	Hipovascular	História pregressa de neuroblastoma
Não classificado	4-6%	Variável	Variável	Variável	Alta mortalidade	Variável	—

O CCR representa 2 - 3% dos tumores malignos humanos e, aproximadamente, 90% das neoplasias malignas renais. <sup>1</sup> Dentre os tumores urológicos, o CCR ocupa o terceiro lugar em incidência e o primeiro lugar em mortalidade. <sup>6, 7</sup> A incidência do CCR varia substancialmente no mundo, com taxas mais baixas na Ásia e África e taxas mais altas na América do Norte e Europa. Recentemente, foi observada a estabilização ou queda da incidência do CCR em alguns países do norte europeu, especificamente, a Suécia. <sup>5,1</sup>. No Brasil, dados epidemiológicos nacionais do CCR são escassos. Pesquisas regionais sugerem que o CCR representa, aproximadamente, 1,2% dos casos de câncer de todo o país. <sup>6</sup>

A classificação histológica do tumor renal é fundamental para determinação do subtipo, visto que há significativas implicações prognósticas e terapêuticas. A caracterização histopatológica do RCC é realizada por biópsia percutânea guiada com acurácia de 70 a 90%. Apesar desta metodologia ser minimamente invasiva, somente é recomendada somente em casos pré-operatórios para os casos em que a caracterização radiológica não é possível. <sup>9</sup>

A sobrevida de pacientes com CCR depende do estágio da progressão tumoral que ele se encontra no momento do diagnóstico. As taxas de sobrevida de 5 anos variam de 86% para pacientes no estágio T1 e T2 até 20% no estágio N2 e 0% no estágio N3. <sup>7</sup> Esses dados refletem a precariedade na sobrevida de pacientes com a enfermidade metastática.

A maioria dos pacientes com CCR de células claras possui mutação no gene supressor tumoral de von Hippel-Lindau (VHL). O gene VHL codifica uma proteína, a VHL, é capaz de regular negativamente uma série de proteínas intracelulares dentre elas, o fator induzível por hipóxia (HIF). O HIF é o fator de transcrição heterodimérico (HIF  $\alpha/\beta$ ) que regula a expressão de genes que facilitam a adaptação de tecidos à hipóxia. Em condições de oxigenação normal, a proteína VHL está envolvida na degradação da subunidade HIF  $\alpha$ . A perda de função do gene VHL, mesmo em pressões de oxigênio normais, acarreta um aumento (HIF) e, conseqüentemente, o aumento da transcrição de vários fatores angiogênicos tais como: fator de crescimento endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e o fator básico de crescimento de fibroblastos. <sup>10,11</sup> A presença desses fatores angiogênicos justifica a intensa vascularização do CCR e explica a alta prevalência de metástase (30-40%) no diagnóstico inicial da doença. Estes dados estão representados na figura 1.

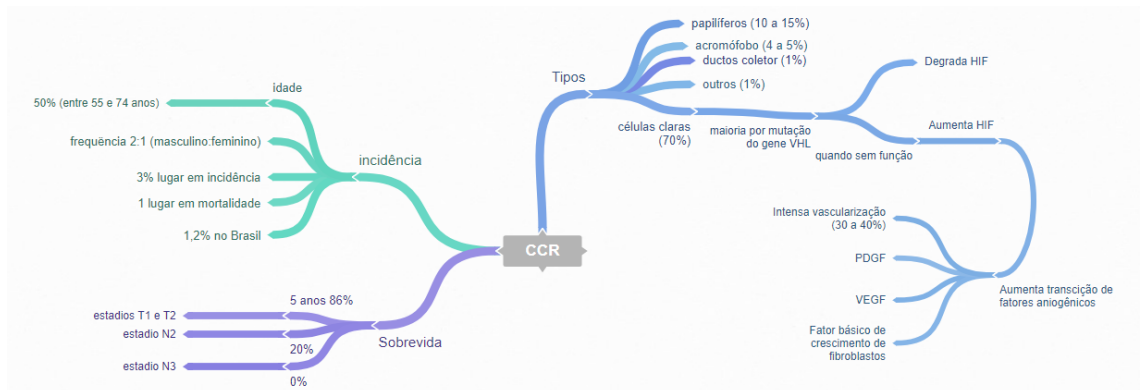


Figura. 1 - Dados numéricos sobre o CCR

Os progressos nos campos de biologia molecular e celular do CCR levaram ao desenvolvimento de drogas capazes de bloquear vias específicas de sinalização celular. Em 2006, seis drogas foram aprovadas pelo Food Drug Administration – US (FDA).<sup>11</sup> O uso desses agentes é denominado de terapia-alvo. Atualmente, há duas classes de antagonistas; os antagonistas da via de sinalização do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e os bloqueadores da via alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). No primeiro grupo, estão o Sunitinib (Pfizer), Sorafenid (Bayer), Bevacizumab (Genentech/Roche) Pazopanib (LC Laboratories). No grupo dos bloqueadores da mTOR, estão: o Temsirolimus (Wyeth Pharmaceuticals) e o Everolimus (Novartis).<sup>12, 13</sup>

A utilização da terapia-alvo e sua associação com drogas tradicionais tem apresentado resultados promissores no tratamento do CCR metastático (CCRm).<sup>14</sup> Drogas como o Sunitinib, Sorafenib, Temsirolimus, e Bevacizumab tem causado um aumento significativo da sobrevida dos pacientes. Estudos clínicos estão em andamento para avaliação de combinações terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas, além disso, novas drogas-alvo estão sendo estudadas.<sup>15</sup>

## Zinco

Cátions divalentes são essenciais para a homeostase celular. Entre esses cátions, os elementos traços  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  e  $Cu^{+2}$  participam de numerosas funções fisiológicas (por exemplo: síntese de ácidos nucleicos e proteínas, reações enzimáticas, estabilização de membranas, funcionamento do sistema imune, defesa antioxidante, fosforilação oxidativa, entre outras). Esses metais são efetivos em concentrações

extremamente baixas, porém, sua deficiência ou excesso podem causar doenças e até morte.<sup>16</sup>

O zinco (Zn), após o ferro, é o segundo elemento traço mais prevalente no corpo humano. No adulto, o montante total de zinco é cerca de 1,4 a 2,3g., porém, existem variações significativas entre os tecidos. Cerca de 50% do zinco encontra-se na musculatura esquelética e 95% deste íon é intracelular. No sangue, 80% do zinco encontra-se nos eritrócitos e 16% no plasma.<sup>17</sup>

Por apresentar o orbital d completo, o Zn só faz ligações covalentes dativas e por isto, não participa de reações oxidativas mas funciona como cofator em reações que necessitam de íon redox-estável.<sup>18</sup>

O Zn está presente em proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucléicos, com funções catalítica e estrutural. Os conhecidos “dedos de zinco” são, geralmente, proteínas de baixo peso molecular formando com o zinco, estruturas compactas que estão envolvidas na replicação, reparo, transcrição, translocação, metabolismo, sinalização, proliferação celular e apoptose.<sup>19</sup>

Cerca de 2800 moléculas e, aproximadamente 300 enzimas, têm o Zn como elemento essencial para suas estruturas e funções. Este elemento participa da constituição de cerca de 10% de proteínas, incluindo fatores de transcrição e chave dos processos de regulação enzimática celular e sinalização celular de rotas. O íon é criticamente responsável pela proliferação celular, diferenciação e apoptose.

O Zn é um componente estrutural de uma proteína denominada metalotioneína (MT), que é uma proteína rica em cisteína e com grande afinidade para íons metálicos, principalmente o Zn. A MT é antioxidante em condições de exposição à radiação, drogas e metais pesados, inibindo propagação de radicais livres.<sup>20</sup> Também de forma estrutural, o Zn participa da SOD (superóxido-dismutase), enzima presente no citoplasma de todas as células e que catalisa a conversão de dois radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, reduzindo a toxicidade de espécies reativas.

Este íon antioxidante é indispensável para ação de enzimas na síntese de proteínas, tem efeito modulador e protetor para o crescimento de células cancerosas, influencia na divisão celular e atua como fator de transcrição de genes. O estado nutricional do zinco tem efeitos diretos na modulação da atividade enzimática ou moléculas sinalizadoras que dependem do zinco.

A carência de Zn pode ocorrer por deficiência nutricional, por danos da barreira da mucosa do trato gastrointestinal, o que aumenta a susceptibilidade a infecções, por

doenças crônicas como diabetes e insuficiência renal ou ainda por disfunções dos transportadores de membrana.

A deficiência do zinco provoca inibição do crescimento, visto que influencia o processo de divisão celular e regulação hormonal. Compromete o desenvolvimento físico, mental e sexual de crianças e adolescentes, produz alterações neuro sensoriais, cutâneas, imunidade e cicatrização.<sup>21</sup> Além disto, de acordo com Fernandes e Mafra (2005), as células ficam mais sensíveis às substâncias tóxicas e aumenta a taxa de apoptose e atrofia por redução de mitoses; também causa atrofia tímica, linfopenia e diminuição de imunoglobulinas. Diversas fontes bibliográficas levantadas por Santos & Fonseca (2012), fizeram referências à relação entre a carência de zinco e diversos tipos de cânceres.<sup>22</sup>

Quanto à imunidade, existem a imunidade inata e a específica ou adquirida de acordo com Delves & Roitt (2000), a primeira é devida às células NK (natural killer) que são fundamentais contra infecções e tumores. As NK dependem do zinco para reconhecer a histocompatibilidade da classe I e, na carência deste íon, são alteradas as atividades de fagocitose por macrófagos e leucócitos, gerando danos oxidativos e queda do número de granulócitos. A imunidade específica é a de contato, quando ocorre a proliferação de linfócitos B e T; os linfócitos B secretam imunoglobulinas para destruir os patógenos extracelulares e os linfócitos T auxiliam os linfócitos B a produzir anticorpos para erradicar os patógenos intracelulares, ativando os macrófagos.<sup>23</sup> Na deficiência de Zn, o número de linfócitos B cai porque o zinco participa da maturação destas células, ocorrendo o mesmo com os linfócitos T visto que estes sofrem maturação no timo e, sem zinco, ocorre atrofia deste órgão.<sup>24</sup>

O Zn atua como cofator da timulina, proteína que atua na diferenciação de linfócitos T imaturos, modula e libera citocinas para células mononucleadas, induz a proliferação dos linfócitos T e diminui a resposta à deficiência do zinco.<sup>25</sup>

A ingestão compensada de Zn ocorre entre 6 e 12 dias, mas, pode demorar mais se o estado nutricional de zinco estiver muito baixo.<sup>41</sup> A homeostase é mantida por mecanismos primários do trato gastrointestinal e pela presença dos transportadores de membrana (tabela 2), já que o zinco não atravessa a membrana por diferença de concentração.

Tabela.2 Transportadores de zinco em membrana.<sup>26, 27</sup>

Transportadores	Localização/ função
ZnT-1	Membrana basolateral de eritrócitos e células tubulares renais
ZnT-2	Intestino, rins e testículos
ZnT-3	Vesículas neuronais e testículos
ZnT-4	Neurônios e glândulas mamárias
ZnT-6	Transporta o Zn do citoplasma para o Complexo Golgiense
ZnT9	Transporta o Zn no retículo endoplasmático rugoso
ZIP	11 tipos diferentes – aumentam o Zn citoplasmáico por influxo

Os transportadores ZIP foram encontrados em todas as classes filogenéticas, de bactérias a mamíferos. Muitas proteínas ZIP têm oito domínios transmembrana e de similares topologias com N e C terminais das proteínas localizadas na face externa das membranas plasmática. (fig.5) <sup>29</sup>

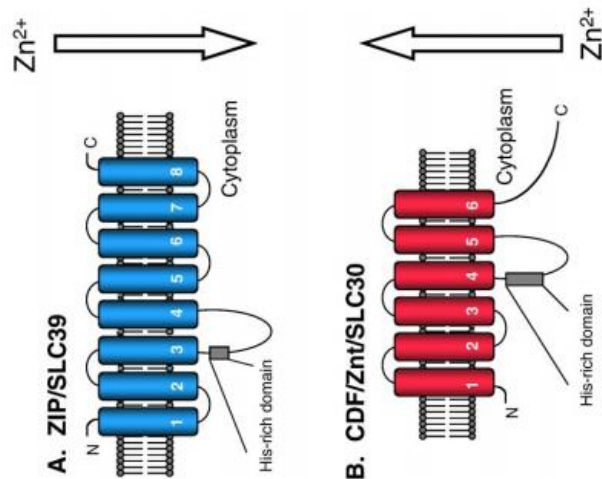


Figura.5 – Esquema representativo dos transportadores de membrana e sua topologia ZIP e ZnT. <sup>36</sup>

Perdas renais de zinco são menores que perdas fecais e perdas adicionais por suor, sêmen, menstruação, crescimento de cabelos e unhas. Estas perdas variam antes



que ocorra a diminuição de níveis séricos, o que significa que os níveis séricos não são bons para detecção de deficiência grave deste mineral.<sup>30, 31</sup>

A redução do consumo de zinco provoca catabolismo de tecidos que contém este mineral para sua liberação na circulação.<sup>32</sup>

A toxicidade aguda por ingestão de zinco provoca náuseas, vômitos, dor abdominal, gosto metálico na boca e cefaleia.<sup>33, 34</sup> O aumento de zinco também produz influência sobre apoptose, tendo efeito sobre vários reguladores de morte celular programada, incluindo capases, proteínas BCL e famílias Bax ou também por inibição do metabolismo celular.<sup>35, 36</sup> Um dos órgãos nos quais o zinco promove morte celular é o cérebro sendo a toxicidade devida a isquemia ou trauma com acúmulo de zinco livre.<sup>36</sup>

Pacientes com qualquer tipo de câncer apresentam, antes de qualquer tratamento, níveis baixos de Zn no plasma. Estudos revelam que a concentração que a concentração plasmática de indivíduos com câncer é menor do que doentes para o mesmo órgão e maior para pacientes saudáveis.<sup>37</sup>

A pesquisa por agentes anticancerígenos é urgente. Um agente potencial é o zinco, que decresce no desenvolvimento de alguns tipos de cânceres visto que evita os efeitos citotóxicos e é supressor de células malignas.<sup>35</sup>

Kuo *et al.* (2002), sugerem que o cobre e o zinco possam ser usados como marcadores no processo de carcinogênese, inclusive para avaliar o sucesso de cirurgias de retirada de tumores e presença de metástases.<sup>36</sup>

Segundo Lang e colaboradores (2015), os transportadores de zinco são críticos na regulação das concentrações normais nas células humanas. Estudos revelaram que as disfunções dos transportadores de zinco levam ao desenvolvimento de cânceres urológicos. Existem sete variantes do ZIP 11 que foram associados ao RCC, estes transportadores importam zinco para as células. O knockdown deste gene pode provocar o decréscimo da concentração de zinco celular e níveis de metalotioninas, o que parece ter associação aos cânceres de bexiga e renal (RCC).<sup>38,39</sup>

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

- Identificação do potencial dos transportadores de zinco como alvos terapêuticos do adenocarcinoma renal humano.

## **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a concentração intracelular de Zn nas linhagens 786-0 e HK2.
- Avaliar os níveis de expressão dos transportadores de membrana: ZIPs e ZnT nas linhagens 786-0 e HK2.
- Análise do papel dos transportadores de zinco na homeostase do adenocarcinoma renal humano e das células epiteliais tubulares renais.

## **3. CENTROS PARTICIPANTES**

- Centro de Biotecnologia
- Gerência de Rejeitos Radioativos

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Linhagens celulares:**

A linhagem celular 786-0 (adenocarcinoma renal humano de células claras humanas com a mutação do gene VHL) e a HK2 (células tubulares renais) foram adquiridas da ATCC. As linhagens serão cultivadas em meio RPMI 1640 (Life Technologies, MD, EUA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Life Technologies, MD, EUA), 300µg/ml de estreptomicina e 100 U/ml de penicilina (Life Technologies, MD, EUA).

### **4.2 Quantificação do Zn intracelular por IPC-OES**

**Abertura química das amostras:** cada amostra 15 mL de cultura celular, serão transferidos para um béquer em chapa aquecedora dentro de uma capela. Em seguida ácido nítrico 65% e peróxido de hidrogênio 34% serão adicionados e a

amostra será aquecida a 200°C até todo o líquido vaporizar. A adição de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, seguida de aquecimento, deverá ser repetida até o precipitado adquirir coloração branca.

O precipitado será então dissolvido em 10 mL de ácido nítrico 5%, transferido para tubo cônico e analisado por ICP-OES para determinar as concentrações Zn.

**Diluição:** Para a determinação das concentrações de zinco em cada amostra, 5 mL de amostra de cultura celular serão misturados com 5 mL de ácido nítrico 10% em tubo cônico e analisados por ICP-OES.

### 4.3 Análise por ICP-OES

**Preparo de padrões:** As análises irão requerer o preparo de quatro padrões de calibração de 20 mL nas concentrações 0,1 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm e 5 ppm.

No preparo dos padrões será utilizada uma solução mãe contendo 30 elementos (cobre, zinco e selênio entre eles) em concentração de 10 ppm. Cálculos prévios determinarão o volume necessário da solução mãe para o preparo de 20 mL dos quatro padrões nas concentrações desejadas. Para o preparo de cada padrão o volume necessário da solução mãe será transferido com o uso de micropipeta para um tubo cônico em uma balança analítica tarada, onde a massa será observada. Em seguida ácido nítrico suprapur 5% será pipetado ao tubo cônico até a massa da solução estar o mais próximo possível de 20 g e a massa final da solução foi observada. Com os valores das massas da solução mãe pipetada e da solução final a concentração real do padrão poderá ser calculada e utilizada na calibração do espectrômetro para maior precisão.

**Condições de análise:** As análises serão realizadas com o espectrômetro PerkinElmer Optima 7000 DV alimentado pelos gases argônio, nitrogênio e oxigênio e conectado a um computador contendo o software WinLab32 for ICP-OES. As condições instrumentais de operação serão: Fluxo de gás do plasma: 15 L/min, Fluxo de gás auxiliar: 0,2 L/min, Potência: 1300 Watts, Fluxo de gás nebulizador: 0,8 L/min., Taxa de fluxo de amostra: 1 mL/min, Visão do plasma: Axial.

O comprimento de onda escolhido para observação do elemento no espectrômetro é : Zn: 206.200

**Processo de análise:** Primeiramente uma solução de ácido nítrico suprapur 5% será analisada no espectrômetro como solução branco, seguida por análise dos quatro padrões de calibração para que uma curva de calibração seja formada. Por fim, serão realizadas as análises das amostras da cultura celular tratadas pelo processo de abertura, seguidas pelas análises das amostras que diluídas em ácido nítrico 10%.

Essas análises serão realizadas na Gerência de Rejeitos Radioativos sob a supervisão do Dr. Júlio Takehiro Marumo.

#### **4.4 Extração de RNA**

Após a realização da co-cultura em normóxia e hipóxia, ao atingirem aproximadamente 90% de confluência, as células serão lavadas com PBS e a extração do RNA se dará utilizando TRIzol® Reagent (Life Technologies, NY, EUA). Em seguida, será adicionado clorofórmio e a amostra será centrifugada a 13.500 g por 10 minutos. O sobrenadante será transferido a um microtubo e em seguida adicionado álcool isopropílico, sendo posteriormente incubado por 20 minutos à -20°C seguido de uma incubação em temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugado a 13.500 g por 10 minutos. O sobrenadante será removido e adicionado ao pellet álcool 75% estéril gelado, homogeneizando e após será centrifugado novamente a 13.500 g por 10 minutos, o sobrenadante será descartado. Os microtubos permanecerão em temperatura ambiente para volatização do álcool e o pellet contendo RNA será ressuspenso com água DEPC. As amostras serão armazenadas a -80°C. A concentração (ng/uL) e a pureza (260/280) do RNA obtido será determinada pela espectrofotometria no Nanodrop® ND-100 (ThermoScientific).

#### **4.5 Síntese de DNA complementar (cDNA)**

Será utilizado o kit QuantiTec Reverse Transcription® (Qiagen, Valencia, CA, USA). O cDNA será sintetizado utilizando-se 2ug do RNA total seguida de uma etapa de eliminação do DNA genômico com o buffer do próprio kit confeccionando um mix, em seguida será realizada a incubação no termociclador a 42°C por 2 minutos e permanecerá no gelo logo em seguida. Será preparado um segundo mix, complementando o anterior, contendo o RT primer, seguido de 1 ciclo a 42°C por 15

minutos e a parada da reação com um ciclo de 95°C por 3 minutos, as amostras serão submetidas a um banho de gelo por 2 minutos e armazenadas a -20°C até a realização da qRT-PCR.

### 3.5 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A qRT-PCR será realizada utilizando o SYBR Green® (AppliedBiosystems, NY, EUA). Para a amplificação será utilizado o StepOne Plus® (AppliedBiosystems, NY, EUA) e o método de execução seguirá da seguinte maneira: 2 minutos a 50°C e 10 minutos a 95°C; duas repetições de 15 segundos a 95°C e 1 hora a 60°C (completando 40 ciclos), finalizando com 15 segundos a 95°C. A determinação dos níveis de expressão dos genes alvo será realizada pela quantificação relativa =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Os genes humanos utilizados serão: *hif-1a*, *vegf-a*, *vegf-r2*, *IL-6*, *IL-8* e o normalizador *gapdh* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). As fitas forward e reverse serão desenhadas através do site da AppliedBiosystems (Tabela 3). O programa Primer Express 3.0 (Life Technologies, MD, EUA) foi utilizado para confirmação das sequências humanas no BLAST.

**Tabela 3.** Sequência de primers utilizados para avaliar a expressão gênica relativa.

Gene		Forward	Reverse
SLC30A1	ZnT1	GCCTTGGGTTTCAGTGATTGTAGT	CCCCTTCAGAACAACCTTTCC
SLC30A2	ZnT2	CGTCCGAGCTGCCTTCA	GACACCCATGCTCTGCATAAAG
SLC30A4	ZnT4	TCCAGGAGGTTGAGGCTACAGT	GCTCCATCACCCAGGCTAGAG
SLC30A9	ZnT9	CACTTGCATGGGCCTTACTTC	GCCCACACCCAAAGAACCT
SLC39A1	ZIP1	TGCTGTGGAACGGGTATGG	TGAAATGGGCTAGGACCAACA
SLC39A4	ZIP4	GCCTGTTCCCTCTACGTAGCACTCT	GCGGGTCCCGTACTTTCA
SLC39A5	ZIP5	AGGCGAAAACGAAGGAATCTC	GCCATCCCCTGCCATTCT
SLC39A10	ZIP10	GCCCAAGGCCTCAGCAA	GCGTGGAGCGCCCTTTA
SLC39A11	ZIP11	CCTTGGAGCGGCTTTTGTGTC	CTTCTGCTGCACCCAAGTGA
SLC39A14	ZIP14	CACTACCAATGCCTGAGCTTTTC	CAAAACGGATGCTGCTTGTG

#### **4.6 Extração de proteínas**

A extração de proteínas será realizada utilizando o reagente CellLytic™ M (Sigma) seguindo as especificações do fabricante.

#### **4.7 Dosagem da concentração proteica**

A dosagem da concentração proteica será realizada com base no método de LOWRY, utilizando o *Kit BCA protein* (Bioagency, Brasil) seguindo as especificações do fabricante (Spectra Max 190, Molecular Devices).

#### **4.8 SDS-PAGE**

A eletroforese será realizada em gel de poliacrilamida 12,5% e gel de empilhamento a 3%. Será adicionado às amostras: Tris 50mM pH 6,8, DTT (Ditiotreitol) 25mM, glicerol 10%, SDS 10%, azul de bromofenol 0,008 mg/mL e  $\beta$ -mercaptoetanol 1%. A corrida de separação será realizada a 30mA. O gel será corado com Coomassie Brilliant Blue R 0,5% (BioRad, San Diego USA).

#### **4.9 Western Blotting**

A eletroforese será realizada em gel de poliacrilamida a 10% e gel de empilhamento a 3%. Para a análise de proteínas totais serão utilizadas 50 ug por amostra. Será adicionado o tampão de amostra: Tris 50mM, pH 6,8, DTT 25mM, glicerol 10%, SDS 10%, azul de bromofenol 0,008 mg/mL e  $\beta$ -mercaptoetanol 1%. O padrão de peso molecular utilizado será o marcador Prec Plus STD Kaleidoscope (BioRad, San Diego USA). Os géis serão submetidos a uma corrente de 200V por, aproximadamente uma hora, até a saída do corante de bromofenol do gel. Após a eletroforese será realizada a transferência úmida para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Hybond-ECL, Amersham Bioscience, USA). A transferência ocorrerá por 2 horas e 30 minutos a 200mV constante e a 300 V no gelo. Após o tempo decorrido a membrana será lavada três vezes com TBS 1X e deixada em agitação por 1 hora em leite desnatada 5% a fim de efetuar o bloqueio de reações inespecíficas. Após lavagens

a membrana será incubada por 16 horas a 4°C com anticorpo primário diluído 1:500 em leite desnatado a 5% sob leve agitação. Após a incubação com anticorpo primário a membrana será lavada três vezes com TBS 1X e incubada com anticorpo secundário conjugado com HRP processo semelhante ao realizado com o primário diluído em leite desnatado a 5% em 1:1000 e ficará incubando por 2 horas em temperatura ambiente sob leve agitação.

A revelação será realizada utilizando o kit SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoScientific, EUA). A fotodocumentação será realizada utilizando o equipamento Alliance 4,7 Uvitec Cambridge do Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional, ICB III, Universidade de São Paulo ou Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, ICB II.

## 5. Imunofluorescência

Para a realização deste ensaio serão semeadas  $2,0 \times 10^3$  células por poço em *chambers slides* de 4 poços. As células serão deixadas por 48 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células lavadas 3 vezes com PBS estéril e fixadas durante 10 minutos com 400 µL de metanol gelado. Após a fixação, mais 3 lavagens serão realizadas com PBS e incubou por 30 minutos em solução de bloqueio de reações inespecíficas e permeabilização em leite a 5% diluído em PBS com 0,2% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Após lavagens, as células serão incubadas *overnight* com 200 µL do anticorpo primário em câmara úmida a 4°C. No dia seguinte, serão lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com 200 µL do anticorpo secundário em câmara úmida escura em temperatura ambiente durante 2 horas. Após a incubação, serão feitas 3 lavagens com PBS e se adicionará o meio de montagem ProLong® Gold com DAPI (catálogo nº P36931 ThermoFisher Scientific), selando as lâminas com lamínulas de vidro. As lâminas serão observadas em microscópio confocal Leica TCS SP8 CARS do Laboratório Multiusuário do ICB IV Universidade de São Paulo.

## 6. Análise estatística

A análise estatística será realizada usando o programa GraphPadPrism versão 5.0 do Windows® (GraphPad® Software, San Diego, CA, USA), <http://www.graphpad.com>. As comparações simples de médias serão realizadas pelo Test T de Student, as comparações múltiplas de médias serão realizadas usando one-way ANOVA, seguida pelo Teste de Bonferroni. Em todos os testes os valores de probabilidade (P) inferiores a 0,05 serão considerados estatisticamente diferentes.

## 7. Contribuições científicas ou tecnológicas da proposta;

- Identificação de novos alvos terapêutico para o RCC.

## 8. Orçamento detalhado. O respectivo orçamento deverá ser apresentado utilizando-se um "Template" específico, disponível na página do EGP no Portal do IPEN; Anexo 2

Atividade	1º ano												2º ano											
Cultura celular																								
Determinação do Zn intracelular																								
Extração de RNA																								
Síntese do cDNA e RT-PCR																								
Avaliação da expressão proteica ; western e imunofluorescência																								
Análise estatística																								
Preparação de resumos para congressos e trabalhos científicos																								



## 5. Participantes do projeto

Dr. Julio Takehiro Marumo – Gerente da Gerência de Rejeitos Radioativos

Tania Regina de Borba – doutoranda - CB

Luiz Felipe Teixeira – mestrando - CB

**8 - Disponibilidade efetiva de infraestrutura e de apoio técnico para o desenvolvimento do projeto, estimativa dos recursos financeiros de outras fontes, se pertinente, e a anuência do responsável pela unidade do IPEN;**

O CB e GRR apresentam infraestrutura necessária para a execução do projeto.

**9 - Duas publicações e duas participações em congressos um mestrado concluído.**

## 6. Bibliografia

1. OOSTERWJIK, W. J. C. *et al.* Effect of tyrosine kinase inhibitor treatment of renal cell carcinoma on the accumulation of carbonic anhydrase IX-specific chimeric monoclonal antibody cG250. **BJU International**, 107 (1):118-25, 2011.
2. PORTER, J. R. The Role of Lymphadenectomy for Renal Cell Carcinoma: Are we any Closer to an Answer? **European Urology** 71 568–569, 2017.
3. PRASAD, S. R. *et al.* Common and uncommon histologic subtypes of renal cell carcinoma: imaging spectrum with pathologic correlation. **Radiographics** 26:1795-806, 2011.
4. MUGLIA, V. F.; PRANDO, A. Carcinoma de células renais: classificação histológica e correlação com métodos de imagem. **Radiol Bras.** Mai/Jun;48(3):166–174, 2015.
5. WEIKERT, S.; LJUNGBERG, B. Contemporary epidemiology of renal cell carcinoma: perspectives of primary prevention. **World J Urol** 28:247-52, 2010.
6. CHOW, W.H.; DONG, L.M.; DEVESA, S.S. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. **Nat. Rev. Urol.** 7:245-57, 2010.
7. NARDI, A.C. Epidemiologic characteristics of renal cell carcinoma in Brazil. **IntBraz J. Urol** 36:151-7, 2010.
8. MUGLIA, V.F.; PRANDO, A. Carcinoma de células renais: classificação histológica e correlação com métodos de imagem. **Radiol Bras.** 48(3) 166-74, 2015.

9. ATHER, M. H. *et al.* Current management of advanced and metastatic renal cell carcinoma **Urol J.** v.7, p. 1-9, 2010.
10. MUELLER-LISE, U.G. *et al.* Staging of renal cell carcinoma. **EurRadiol** 17:2268-2277, 2007.
11. RINI, B. I. ATKINS, M.B. Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. **Lancet Oncol** 10:992-10000, 2009.
12. DUFFY, A. M.; BOUCHIER-HAYES, D.J.; MARMEY, J.H. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF. **Landes Bioscience**, 2013.
13. NAOYO, N. *et al.* Angiogenesis in Cancer. **Vasc Health Risk Manag** 2(3): 213-219, 2006.
14. ATHER, M. H.; MASOOD, N.; SIDDIQUI, T. Current management of advanced and metastatic renal cell carcinoma. **Urol J** , 7:1-9, 2010.
15. HOLMS, D. I.; ZACHAY, I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) Family: angiogenic factors in health and disease. **Genome Biol** 6(2):209, 2005.
16. **MASUNURO, K.** The Hope and Hype of CRISPR-Cas9 Genome Editing: A Review **JAMA Cardiol.** Aug 1;2(8):914-919. doi: 10.1001/jamacardio.2017.1713, 2017
17. BARBIER, O.; JACQUILLET, G.; TAUC, M.; COUGNON, M.; POUJEOL, P. Effect of Heavy Metals on, and Handling by, the Kidney. **Nephron Physiology.** 99:p.105-110, 2005.
18. TABERNERO, J. The Role of VEGF and EGFR Inhibition: Implications for Combining Anti-VEGF and Anti-EGFR Agents. **Mol Cancer Res.** 5(3), 2007.
19. PRASAD, A. S.; BAO, B.; BECK, F.W.J.; SARKAR, F.H. Zinc Activates NF-kB in HUT-78 cells. **J. of Laboratory and Clinical Medicine.** Volume 138, Issue 4, Pages 250–256, 2002.
20. FERNANDES, A.G.; MAFRA, D. Zinco e Câncer: uma revisão. **Ver.Saúde Com** 1(2): 144-156, 2005.
21. SANTOS, C.; FONSECA, J. Zinco: fisiologia, clínica e nutrição. **ANEP** vol VI nº 1, 2002.
22. HENG, D. *et al.* Cross-talk between endothelial and tumor cells via basic fibroblast growth factor signaling promotes lung cancer growth and angiogenesis. **Oncol Lett.** 9(3): 1089-1094, 2015.
23. DELVES, P.J.; ROITT, I.M. The immune system. **The New England Journal of Medicine.** V.343, n.2, 2000.
24. IBS, K.H.; RINK, L. Zinc altered immune function. **J. Nutr.**, 130: 1452-56, 2000.
25. KING, J.C.; SHAMES, D.M. WOODHOUSE, L.R. Zinc Homeostasis in Humans. **J.Nutr.** (130) 1360S-1366S, 2000.
26. COUSINS, R.J.; BLANCHARD, R.K. MOORE, J.B., CUI, L.; GREEN, C.L.; LIUZZI, J.P. Regulation of zinc metabolism and genomic outcomes. **J. Nutr** 133:1521-6, 2003
27. EIDE, D.J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. **Biochimica et Biophysica Acta** 1763: 711-722, 2006.
28. WOOD, R.J. Assessment of Marginal Zinc Status in Human. **J.Nutr** 130: 1350-54, 2000.
29. TAPIEIRO, H., TEW, K. D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 57:399-11, 2003.
30. ATHER, M.H. *et al.* Current management of advanced and metastatic renal cell carcinoma. **Urol J.** v.7, p. 1-9, 2010.

31. SHA, W.C.; BERG, A. A.; BRONSON, R.T.; BALTIMORE, D. Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. **Genes & Dev.**, 9:2736-2746, 1995
32. ANDERSON, J.B.J. Minerais. In: Mahan, K.; Escott-Stump K. Alimentos, nutrição e dietoterapia. São Paulo: Rocca, p. 106-45, 2002.
33. BORGES, V.C., FERRINI, M.T.; WAITZBERG, D.L. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. São Paulo: Atheneu, p. 117-48, 2002.
34. POO, J.L.; ROMERO, R.R.; ROBLES, J.A. MONTEMAYOR, A.C.; ISOARD, F.; ESTANES, A. Diagnostic value of the coope/zinc ratio in digestive câncer: a case control study. **Arch Med Res** 28:259-63, 1997.
35. COSTELLO, L.C.; FRANKLIN, R.B. Cytotoxic/tumor suppressor role of zinc for the treatment of cancer: an enigma and an opportunity. **Expert Rev. Anticancer Ther** 12(1): 121-128, 2012.
36. KUO, H.W., CHEN,S.F.; WU, C.C.; CHEN, D.R.; LEE, J.H. Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. **Biol Trace Elem Res** 89: 1-11, 2002.
37. LANG, W.; CHAFFEE, K.G.; PARKER, A.S.; SICOTTE, H.; PETERSEN, G. M. Zinc transporter genes and urological cancers: Integrated analysis suggests a role for ZIP11 in bladder cancer. **Tumour Biol.** 36(10): 7431-37, 2015.
38. HERBEIN, G.; VARIN, A.; FULOP, T. NF-kB, AP-1, Zinc Deficiency and aging. **Biogerontology**, Volume 7, Issue 5–6, pp 409–419, 2006.
39. MACKENZIE, G.G.; KEEN, C.L.; OTEIZA, P.I. Microtubules are required for NF-Kappa B nuclear translocation in neuroblastoma IMR- 32 cells: modulation by zinc. **Journal of Neurochemistry**, v.99, n.2, p.402-415, 2006.