



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Autarquia Associada à Universidade de São Paulo**

**Efeito da hipóxia na expressão de transportadores de zinco em linhagem de  
adenocarcinoma renal**

**LUANA DA SILVA FERREIRA**

**Dissertação apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de  
Mestre em Ciências na Área  
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientadora  
Profa. Dra. Maria Helena Bellini**

**São Paulo  
2023**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES  
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Efeito da hipóxia na expressão de transportadores de zinco em  
linhagem de adenocarcinoma renal**

Versão Corrigida  
Versão Original disponível no IPEN

**LUANA DA SILVA FERREIRA**

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau de  
Mestre em Ciências na Área de  
Tecnologia Nuclear - Aplicações

**Orientadora:**  
**Profa. Dra. Maria Helena Bellini**

São Paulo  
2023

Fonte de Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Projeto Intercentros IPEN 2018.05.IPEN.08

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

DA SILVA FERREIRA, L. . ***Efeito da hipóxia na expressão de transportadores de zinco em linhagem de adenocarcinoma renal***. 2023. 45 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

da Silva Ferreira, Luana  
Efeito da hipóxia na expressão de transportadores de zinco em linhagem de adenocarcinoma renal / Luana da Silva Ferreira; orientadora Profa. Dra. Maria Helena Bellini Bellini. -- São Paulo, 2023.  
48 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2023.

1. Adenocarcinoma renal. 2. Hipóxia. 3. Transportadores de zinco. I. Bellini, Profa. Dra. Maria Helena Bellini, orient.  
II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Maria Helena Bellini, pelo cuidado em orientar com amor a profissão, dedicação aos seus alunos e parceria nessa trajetória. Obrigada pela oportunidade e aprendizado!

A minha família, em especial Zenilda, Flávia e Fábio, por acreditarem em minha capacidade e por todo apoio na minha vida.

Meus colegas de profissão e equipe do IPEN, sem eles nada disso seria possível.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao projeto Intercentros IPEN 2018.05.IPEN.08 pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

## RESUMO

DA SILVA FERREIRA, L. **Efeito da hipóxia na expressão de transportadores de zinco em linhagem de adenocarcinoma renal**. 2023. 45 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Aplicações), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo.

O carcinoma de células renais (CCR) é um tumor sólido, maligno e heterogêneo, de origem no epitélio tubular renal. Existem diversas classificações histopatológicas, sendo de maior ocorrência a de células claras (CCRcc). Seu surgimento está associado à síndrome de von Hippel-Lindau, um regulador de resposta ao estresse, divisão, morte e diferenciação celular, e a perda de sua funcionalidade faz com que a degradação do fator induzido por hipóxia (HIF) seja afetado. Por sua vez, a subunidade HIF $\alpha$  se torna altamente expressa devido ao microambiente tumoral hipóxico ocasionado pelo tumor sólido, uma característica importante deste tipo de tumor. HIF $\alpha$  superexpresso se torna um dímero junto a subunidade HIF- $\beta$  no núcleo celular, ativando diversas vias favoráveis para a progressão do tumor. Zinco (Zn) é o segundo oligoelemento mais abundante do corpo humano, sendo assim, pequenas variações da sua concentração poderão afetar o ambiente celular. Os transportadores de zinco possuem papel fundamental na homeostase deste oligoelemento, os ZnTs e ZIPs possuem papéis opostos nessa regulação, mas orquestram a homeostase em conjunto. O perfil de expressão destes transportadores no adenocarcinoma renal ainda não está esclarecido, bem como o efeito da hipóxia sobre eles. Na linhagem celular imortalizada 786-0, a técnica de RT-qPCR foi capaz de verificar um aumento na expressão do RNA mensageiro (RNAm) de HIF1- $\alpha$ , comprovando a eficiência da técnica de indução da hipóxia. Os canais ZnT1, ZnT2 e ZIP14 apresentaram um aumento de sua expressão, enquanto os canais ZnT9, ZIP1, ZIP4 ZIP10 e ZIP11 apresentaram diminuição da expressão. Através da técnica de western blot, foi verificado um aumento do nível proteico de ZnT1 e ZIP14, e uma diminuição de ZnT9 e ZIP1. Tais resultados indicam que a hipóxia é capaz de modular os transportadores de zinco, trazendo novas perspectivas para modelos de estudos.

Palavras-chaves: Adenocarcinoma renal (CCR); hipóxia e transportadores de zinco.

## ABSTRACT

DA SILVA FERREIRA, L. **Effect of hypoxia on the expression of zinc transporters in renal adenocarcinoma cell line**. 2023. 45 p. Dissertation (Master in Nuclear Technology - Applications), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo.

Renal cell carcinoma (RCC) is a solid, malignant, and heterogeneous tumor originating from the renal tubular epithelium. There are several histopathological classifications, with clear cell carcinoma (ccRCC) being the most common. Its occurrence is associated with von Hippel-Lindau syndrome, a regulator of cellular response to stress, division, death, and differentiation. The loss of its functionality affects the degradation of hypoxia-inducible factor (HIF). In turn, HIF $\alpha$  subunit becomes highly expressed due to the hypoxic tumor microenvironment caused by the solid tumor, which is an important characteristic of this type of tumor. Overexpressed HIF $\alpha$  forms a dimer with the HIF- $\beta$  subunit in the cell nucleus, activating various transcription, which are favorable for tumor progression. Zinc (Zn) is the second most abundant trace element in the human body, and small variations in its concentration can lead to disturbances in the cellular environment. Zinc transporters play a fundamental role in the homeostasis of this trace element, with ZnTs and ZIPs having opposing roles in this regulation but working together to maintain homeostasis. The expression profile of these transporters in renal adenocarcinoma is still unclear, as well as the effect of hypoxia on them. In the immortalized cell line 786-0, the RT-qPCR technique was able to detect an increase in the messenger RNA (mRNA) expression of HIF1- $\alpha$ , confirming the effectiveness of the hypoxia induction technique. ZnT1, ZnT2, and ZIP14 channels showed a decrease in their expression, while ZnT9, ZIP1, ZIP10, ZIP11, and ZIP14 channels showed increased expression. Western blot confirmed an increase in protein accumulation of ZnT1 and ZIP14, and a decrease in ZnT9 and ZIP1. These results indicate that hypoxia is capable of modulating zinc transporters, bringing new perspectives to research models.

Keywords: Renal Cell Adenocarcinoma, hypoxia and zinc transporters

## SUMÁRIO

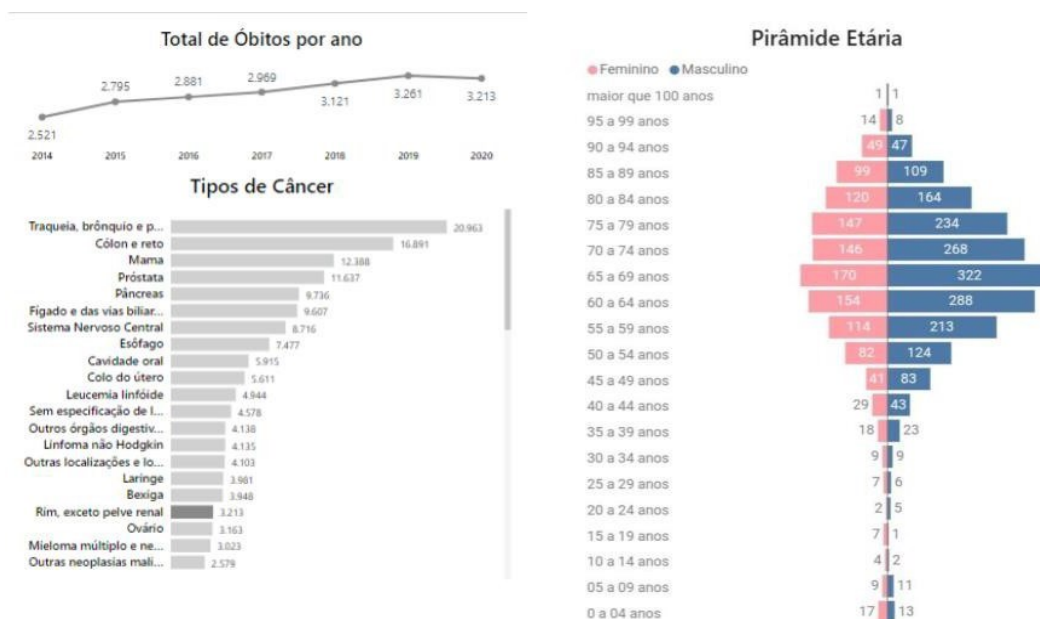
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
<b>2.1 Objetivos específicos</b> .....	16
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	17
<b>3.1 Delineamento experimental</b> .....	17
<b>3.2 Cultura celular</b> .....	17
<b>3.3 Indução de hipóxia</b> .....	18
<b>3.4 Extração de RNA</b> .....	18
<b>3.5 Ensaio de viabilidade celular</b> .....	18
<b>3.6 Síntese de DNA complementar (cDNA)</b> .....	19
<b>3.7 RT-qPCR</b> .....	19
<b>3.8 Extração de proteínas</b> .....	20
<b>3.9 Western Blot</b> .....	21
<b>3.10 Análise Estatística</b> .....	22
<b>4 RESULTADOS</b> .....	23
<b>4.1 Determinação do tempo de exposição á hipóxia</b> .....	23
4.1.1 Determinação quantitativa e qualitativa do RNA proveniente da linhagem celular 786-0 em normóxia e hipóxia .....	23
4.1.2 Determinação do tempo de hipóxia experimental da linhagem 786-0 por RT-qPCR	24
4.1.3 Comprovação por western blot dos resultados obtidos na análise por RT-qPCR dos tempos de hipóxia experimental .....	25
4.1.4 Avaliação morfológica e análise de viabilidade celular das linhagens 786-0 e HK-2 em normóxia e hipóxia 8 horas.....	27
4.1.5 Modulação gênica e proteica de HIF1- $\alpha$ na comparação da linhagem 786-0 normóxia e hipóxia 8 horas .....	29
4.2 Avaliação da modulação da expressão dos genes dos transportadores de zinco na linhagem 786-0 por RT-qPCR.....	30
4.2.1 Validação dos dados obtidos no RT-qPCR por western blot.....	32
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	40
<b>7 BIBLIOGRAFIA</b> .....	41

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células renais (CCR) é um tumor sólido, maligno e heterogêneo, responsável por cerca de 80% do total de neoplasias renais, costuma ocorrer de maneira esporádica ou familiar, e sua causa exata é desconhecida (PANDEY, J; SYED, W, 2020).

Segundo o Observatório de Oncologia (2023), entre o período de 2014 e 2020, o câncer de rim ficou em 18º lugar entre os cânceres de maior mortalidade no Brasil, sendo sua maior parte homens adultos entre 60 e 69 anos. Ainda não é clara a razão dessa diferença em número de óbitos, mas fatores hormonais, maior propensão ao tabagismo, álcool e exposição ocupacional de risco poderá aumentar sua incidência. É importante relatar que o Brasil enfrenta dificuldades em coletar dados de saúde em seu território, a coleta de dados do DATASUS e IBGE depende da colaboração das unidades de saúde públicas e privadas em transferir corretamente os dados para as plataformas, portanto, o número de casos poderá ser ainda maior (ONCOLOGIA, 2023).

**Figura 1** - Número de óbitos no Brasil em decorrência do câncer de rim, exceto pelve renal, entre o período de 2014 - 2020. Divisão por faixa etária e sexo



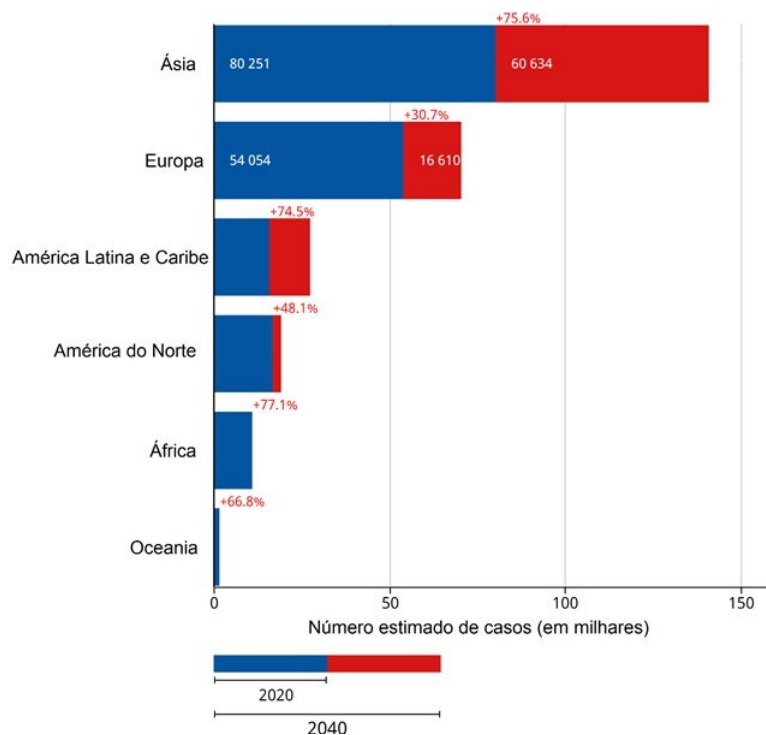
**Fonte:** Observatório de oncologia (2023).



A idade avançada é um importante fator no surgimento do adenocarcinoma renal, pois sabe-se que a idade favorece o acúmulo de mutações que podem acarretar o surgimento do tumor, além de outros fatores como obesidade, tabagismo e doenças crônicas que são muito bem correlacionadas ao surgimento de câncer. A Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) (2023), estima um aumento de 74,5% no número de mortes em decorrência do câncer renal e da pelve entre 2020 e 2040 na América Latina e Caribe. Números ainda maiores são encontrados na Ásia e Europa, o que pode ser explicado por uma tendência de envelhecimento dessa população, entre outros fatores (Garfield, 2020).

**Figura 2** - Número estimado de mortes para o período de 2020-2040. Ranking de Continentes

Número estimado de mortes entre 2020 e 2040. Ambos sexos, idades [0-85+]  
Rim e pelve renal



**Fonte:** Global Cancer Observatory (2023).

De origem no epitélio tubular renal, possui diversos subtipos histológicos, sendo o mais comum o CCR de células claras (CCRcc), encontrado na maioria das metástases. Este subtipo específico está frequentemente associado à mutação no

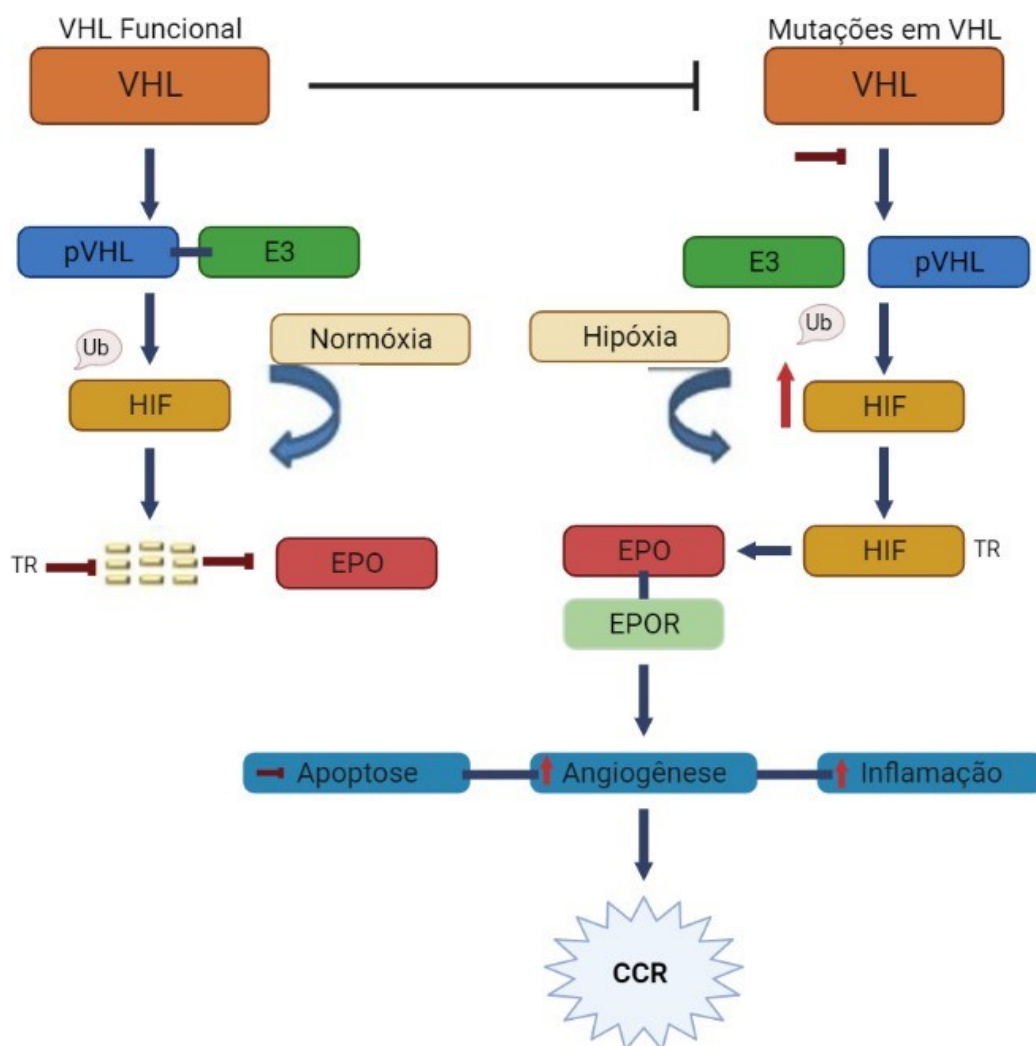
gene de von Hippel-Lindau (VHL), localizado no braço curto (3p25) do cromossomo 3. O gene VHL é conhecido como um supressor tumoral capaz de regular a resposta ao estresse, a divisão, morte e diferenciação celular. A perda de pelo menos uma cópia do cromossomo 3p é observada em mais de 90% dos casos de CCRcc (CHOUEIRI, T; KAELIN, W, 2020; GARFIELD, K; A LAGRANGE, C, 2020; KIM et al, 2021).

O produto do gene VHL é a proteína VHL (pVHL), que quando funcional, é capaz de degradar HIF1- $\alpha$  e HIF2- $\alpha$ , conhecidos como fatores induzíveis por hipóxia, que são regulados pela tensão de oxigênio intracelular, aumentando sua concentração em ambientes hipóxicos, mas degradado por a proteína VHL (pVHL) quando atinge sua função. Sabe-se que em tumores, principalmente os sólidos como no caso do CCR, é característico um microambiente tumoral hipóxico, devido principalmente ao seu rápido crescimento e demanda por nutrientes. Essa incompatibilidade entre oferta e consumo faz com que a tensão de oxigênio no tecido caia de 40-60 mmHg para cerca de 10 mmHg de forma crônica, fazendo com que as células tumorais sofram um ciclo de hipóxia e reoxigenação, proporcionando uma adaptação para um fenótipo mais agressivo (GARFIELD, K; A LAGRANGE, C, 2020; LI et al., 2021; PANDEY, J; SYED, W, 2020).

Quando o gene VHL sofre uma mutação, o complexo ubiquitina ligase deixa de se ligar a pVHL, que por sua vez, perde seu controle de degradação sob as subunidades de HIF $\alpha$ , gerando acúmulo, que como consequência serão translocadas ao núcleo, se dimerizando com HIF $\beta$  que se ligam ao DNA em locais específicos denominados como elementos de resposta à hipóxia (HREs). O acúmulo e translocação de HIF $\alpha$  para o núcleo, está envolvido em vias oncogênicas críticas. O HIF $\alpha$  é capaz de orquestrar as respostas adaptativas das células tumorais que atuam regulando processos biológicos que favorecem a progressão do tumor. Em uma alta taxa de proliferação de células tumorais, o HIF-1 $\alpha$  proporciona às células uma mudança do metabolismo da glicose, que costuma ocorrer através da fosforilação oxidativa, do qual é o processo mais eficiente, para a via glicolítica, menos eficiente, mas que manterá a produção de energia necessária, consumindo mais glicose que as células normais, o chamado efeito Warburg. Tal efeito ocorre através da conversão metabólica pelas enzimas envolvidas na via de glicólise e super expressão do transportador de glicose (GLUT). HIF $\alpha$  também é capaz de ativar a transcrição do fator de

crescimento endotelial vascular (VEGF), do qual terá por objetivo criar novos vasos sanguíneos e busca de uma melhor oxigenação para as células tumorais (MASOUD; LI, 2015).

**Figura 3** - Esquemática da via de VHL com e sem mutação. O acúmulo de HIF $\alpha$  é capaz de ativar vias oncogênicas críticas, inibindo a apoptose e favorecendo a angiogênese e inflamação



Quando o gene VHL é funcional, a proteína VHL (pVHL) é capaz de se ligar a enzima ubiquitina ligase (E3), do qual medeia a poli ubiquitinação e degrada HIF. O gene VHL que sofre mutação, tem sua ligação com E3 é impossibilitada, impedindo a degradação de HIF, que por sua vez é translocada ao núcleo, ativando vias responsivas a HIF, como a eritropoetina, que se liga ao seu receptor (EPOR), que altamente expresso é capaz de ativar processos favoráveis a progressão do tumor.

**Fonte:** Adaptado de MORAIS, C et al, 2013.

Em linhagem celular *in vitro*, é possível mimetizar o ambiente hipóxico de algumas formas. A mais antiga e mais conhecida delas, é através do cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ), um composto capaz de inibir uma enzima crucial na síntese de

heme, componente essencial para o transporte de oxigênio nas células do qual está diretamente ligada a produção de hemoglobina e mioglobina. Sem esse transporte adequado de oxigênio, o ambiente se torna hipóxico, ativando vias de transcrição de resposta à hipóxia, como HIF $\alpha$ . Entretanto, é muito bem esclarecido que este método não é similar ao que ocorre na hipóxia fisiológica, portanto há limitações que devem ser consideradas, além do fato que ao introduzir um componente químico nas células, é difícil esclarecer os efeitos que poderá acarretar em outros componentes celulares (MUÑOZ-SÁNCHEZ; CHÁNEZ-CÁRDENAS, 2018).

Um outro método que ganhou espaço, foi através das câmaras incubadoras que mimetizam a hipóxia através da modulação de gases em ambiente fechado. Para isso, é possível adquirir desde um equipamento de custo alto, com tecnologia precisa, até câmaras de hipóxia portáteis de fácil manuseio. O problema, é que além do alto custo, há uma grande dificuldade em manter a regulação e monitoramento desses gases, as tornando imprecisas (NASCIMENTO FILHO, C, 2018; RINDERKNECHT et al., 2021).

Os absorvedores de oxigênio foram desenvolvidos por volta de 1940, um sachê composto por agentes químicos como ferro, carvão ativado, enzimas entre outros, que são capazes de reagir e absorver o oxigênio ( $O_2$ ) do ambiente, formando um composto estável. Inicialmente utilizado para conservação de produtos alimentícios e farmacêuticos, hoje é também utilizado na pesquisa como método de reduzir a tensão de  $O_2$  em ambiente fechado, ocasionando um ambiente hipóxico. Apesar de ser um método ainda pouco conhecido e com limitações, dentro das poucas possibilidades, é um método a ser considerado ao selecionar a melhor metodologia para a pesquisa em questão (NASCIMENTO FILHO, C, 2018; RINDERKNECHT et al., 2021).

Os tumores, de maneira geral, costuma acometer diversos aspectos do metabolismo celular, do qual podem gerar consequências ainda pouco conhecidas. O zinco é um oligoelemento essencial presente em proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, sendo o segundo mais abundante no corpo humano. Aproximadamente 98% de sua forma está localizado no compartimento intracelular, tendo sua maior parte ligado a metaloproteínas, metalotioneínas ou metaloenzimas, mas também é encontrado compartimentado em organelas e

vesículas para armazenamento e suprimento de proteínas, garantindo a homeostase dentro de suas três funções biológicas principais: catalítica, estrutural e reguladora (BALTACI; YUCE, 2017; HARA et al., 2022).

O corpo humano possui cerca de 2 gramas de zinco, do qual 99,9% encontra-se nas células, e mesmo uma pequena variação da concentração intracelular deste oligoelemento pode ser suficiente para acarretar efeitos no organismo celular. Se por um lado, estudos demonstram que a deficiência de zinco pode contribuir para o surgimento e progressão do câncer, uma vez que o zinco está intimamente correlacionado a resposta imunológica, por outro lado, a suplementação de zinco em pacientes oncológicos pode atribuir efeito protetor contra o câncer (BAFARO et al., 2017).

Estudos em pacientes com os mais diversos tipos de neoplasias vêm demonstrando que a concentração de zinco no plasma costuma se manter abaixo dos valores considerados normais. Por outro lado, estudos com a suplementação de zinco foi capaz de induzir rapidamente a apoptose das células epiteliais, o que diminuiu substancialmente o desenvolvimento do câncer (BOBROWSKA-KORCZAK et al., 2020; HOSUI et al., 2018; Liu et al., 2021). Já os estudos desenvolvidos por PRASAD et al (2004), mostraram que a suplementação de zinco diminuiu o nível de peroxidação lipídica. Com as demonstrações de tantos estudos em literatura que conectam a baixa dosagem de zinco aos mais diversos tipos de tumores, as hipóteses seriam de que este oligoelemento pode ser de muita importância no papel protetor contra o câncer, já que o zinco está envolvido na replicação de DNA, na imunidade e como antioxidante, e por isso o zinco teria utilidade clínica como método de parâmetro diagnóstico e prognóstico de tumores. Por estas razões, estudos mais detalhados entre o papel de zinco e tumores são necessários (MAFRA, 2005).

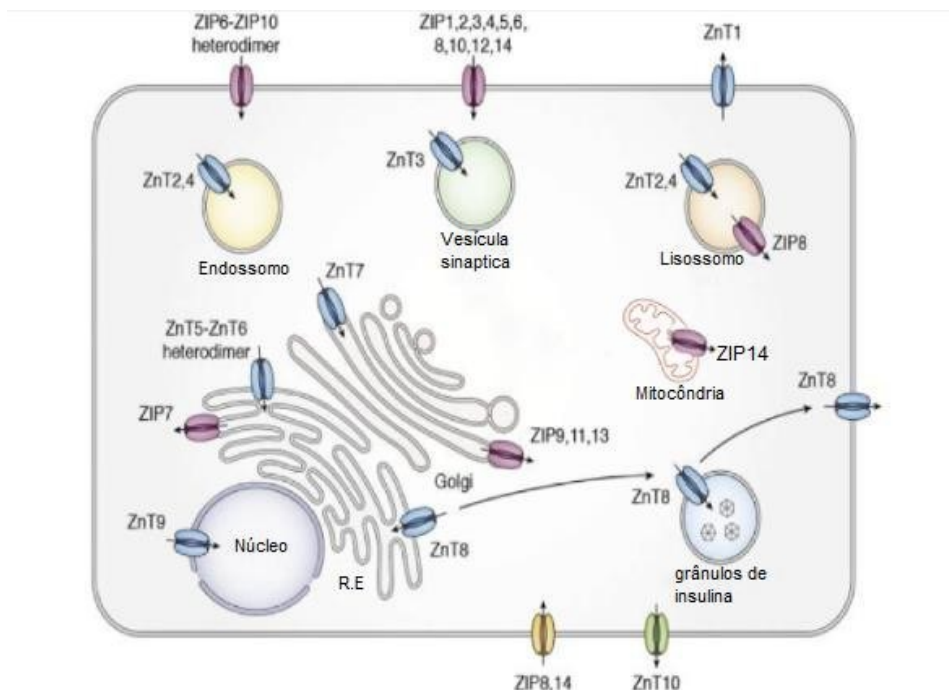
Os transportadores de zinco são principalmente divididos em proteínas ZnT, grupo de transportadores de soluto designados em humanos como SLC30, e a família ZIP, proteínas semelhantes a Zrt e Irt, designadas em humanos como SLC39 (BALTACI; YUCE, 2017; KIMURA; KAMBE, 2016; LIU L et al, 2013).

ZNTs e ZIPs possuem diferentes papéis na homeostase celular. Quando o Zn celular aumenta, é função do ZNT exportá-lo do citoplasma para o espaço

extracelular ou isolar o zinco citoplasmático em organelas para garantir a homeostase. Enquanto isso, ZIP possui a função de importar o zinco para o citoplasma enquanto estiver abaixo do ideal (ABDO, A et al, 2021).

O rim possui diversos destes canais, e a maneira que o tumor pode acometer a expressão destes transportadores é pouco estudada em CCR. A localização celular de cada transportador é importante para compreender como o tumor age nestes canais em diferentes compartimentos intracelulares, e pode ser uma importante chave para compreender o mecanismo de defesa tumoral.

**Figura 4** - Representação dos transportadores de zinco no meio intracelular e suas possíveis localizações. Dentre os diversos transportadores conhecidos, os presentes no CCRcc e objeto de análise são: ZnT1, ZnT2, ZnT4, ZnT9, ZIP1, ZIP4, ZIP10, ZIP11 e ZIP14



**Fonte:** Adaptado de KAMBE, T et al, 2021.

ZnTs são um grupo de proteínas de estrutura complexa, composto basicamente por um domínio N terminal citoplasmático responsável por regular a atividade e as interações do transportador com outras proteínas e moléculas, o domínio transmembrana responsável pelo transporte de íons de zinco, e domínio C-

terminal citoplasmático que desempenha um papel importante na regulação da expressão do gene (WANG et al., 2020).

ZnT1 foi a primeira proteína descoberta em mamíferos em 1995, é capaz de proteger as células da citotoxicidade do zinco, exportando do citosol para o meio extracelular, e no adenocarcinoma renal, é a única conhecida até o momento que desempenha esta função. Sua regulação irá depender de diversos fatores como a disponibilidade de zinco, atividade dos outros transportadores, a presença de outros íons, moléculas e expressão gênica que poderá aumentar ou inibir sua função. ZnT9 está presente no retículo endoplasmático em células renais e tem como função exportar o zinco do citosol para o retículo endoplasmático, sua atividade no adenocarcinoma renal ainda não é bem descrita (MAFRA; COZZOLINO, 2004).

A estrutura dos transportadores ZIP é composta por oito hélices transmembranares, cada hélice transmembrana contém uma sequência conservada de aminoácidos que forma um domínio transmembranar hidrofóbico, responsável por transportar o zinco através da membrana celular, estes formam homodímeros que são importantes para a estabilidade e a função da proteína. O transporte de íons de zinco é mediado por troca iônica de zinco por outros íons positivos como  $H^+$  e  $Na^+$ , contra o gradiente de concentração, para garantir a homeostase dentro das células (WANG et al., 2020).

ZIP1 está presente na membrana plasmática das células renais, com a função de importar o zinco extracelular para dentro da célula. A baixa expressão deste canal foi observada em alguns tumores, como no câncer de próstata, sendo relacionada como o transportador responsável pela perda do acúmulo de zinco intracelular. ZIP 11 está localizado no complexo de golgi e membrana plasmática, também com a função de importar para o citoplasma, em estudo de WANG, L (2015), sete variantes foram associadas com risco de CCR. ZIP14 é presente na membrana citoplasmática, mitocôndria, endossomo e lisossomo, relatos em outros cânceres como o de próstata mostram uma diminuição de sua expressão, assim como também é bem esclarecido a funcionalidade deste canal para passagem de outros íons como ferro e manganês (AYDEMIR; COUSINS, 2018; WANG et al., 2020).

Sabe-se que o zinco possui um papel importante na homeostase celular, sendo um objeto de estudo que o sugere como protetor do câncer e um possível fator de prognóstico. Diversos estudos foram capazes de correlacionar a diminuição da concentração de zinco no plasma a ocorrência de tumor, assim como a suplementação de zinco foi demonstrada como benéfica para vários tipos de câncer. As hipóteses que relacionam o zinco ao câncer seria de que este oligoelemento seria de muita importância no papel protetor, já que o zinco está envolvido na replicação de DNA, na imunidade e como antioxidante, e por isto o zinco teria utilidade clínica como método de parâmetro diagnóstico e prognóstico de tumores. A hipóxia por outro lado, é amplamente reconhecida na literatura como uma importante característica do CCR. Entretanto, o efeito da hipóxia na expressão e função dos transportadores de zinco dentro deste tipo de tumor ainda não é clara, portanto, compreender como estes dois mecanismos agem juntos poderá abrir novas hipóteses em relação à progressão de CCRcc (LIU, L et al, 2013; PRASAD et al 2004; MAFRA, 2005).



## **2 OBJETIVOS**

Avaliar o perfil da expressão dos transportadores de zinco em linhagem celular de adenocarcinoma renal humano de células claras. Realizar perfil comparativo da expressão dos transportadores de zinco de células em normóxia e hipóxia.

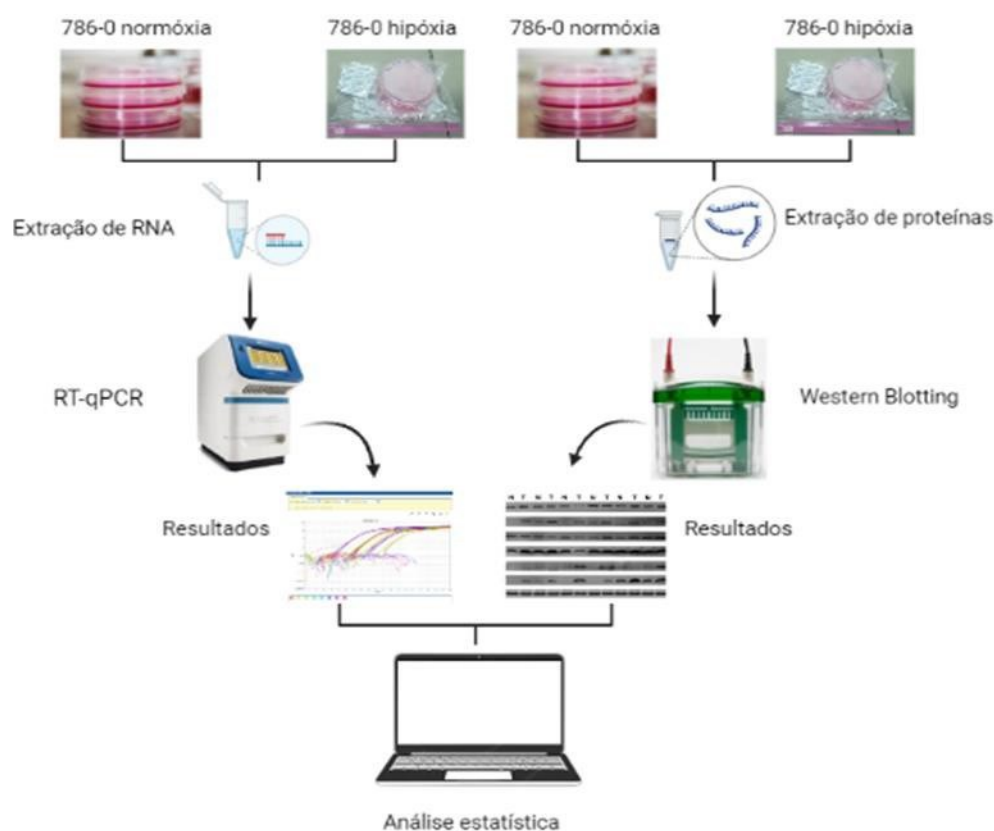
### **2.1 Objetivos específicos**

- Avaliar o perfil de expressão gênica dos transportadores de Zn em células neoplásicas do túbulo proximal renal.
- Avaliar a eficiência da técnica de indução de hipóxia por agente desoxidante
- Realizar perfil comparativo da expressão gênica dos transportadores de Zn em células em normóxia e hipóxia.
- Realizar perfil comparativo da expressão proteica dos transportadores de Zn em células em normóxia e hipóxia.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Delineamento experimental

**Figura 5** - Esquemática da metodologia proposta



**Fonte:** Elaboração própria.

#### 3.2 Cultura celular

A linhagem celular 786-0 (adenocarcinoma renal humano de células claras com mutação do gene VHL), adquirida da ATCC (ATCC®CRL-1932), foi cultivada em meio RPMI 1640 e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 300 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A linhagem celular HK-2 (epitelial do túbulo proximal renal) foi adquirida da ATCC (ATCC® CRL- 2190). As células foram cultivadas em meio DEMEM + F12 em proporção 3/1 respectivamente, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 300 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL

de penicilina (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Ambas foram cultivadas em placas de petri de 100 mm e armazenadas em estufa a 37°C com 18.6% O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de N<sub>2</sub> e umidade relativa de 95% a 37°C, proporcionando um ambiente de normalidade. Para todas as técnicas, foram utilizadas triplicatas das linhagens.

### **3.3 Indução de hipóxia**

Quando as linhagens celulares atingiram uma confluência de aproximadamente 80%, foram colocadas em um recipiente plástico com dimensões de 20cm x 14,9cm x 4,7 cm, com três absorvedores de oxigênio de 6g (QuimicSul Joinville, SC, Brasil), e vedadas através de uma seladora manual, as mantendo em uma atmosfera abaixo de 1% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de N<sub>2</sub>, em estufa a 37°C durante os tempos de 4, 6 e 8 horas para posterior análise por técnicas de RT-qPCR e western blot para selecionar o melhor tempo para os próximos ensaios. Este ensaio tem como referência o trabalho de Nascimento, F (2019) e Mas et al. (2020). O tempo zero foi estabelecido a partir do momento em que os sacos foram selados.

### **3.4 Extração de RNA**

Para a extração de RNA, as células foram tripsinizadas e mantidas em gelo nos tubos de 15mL para que em seguida fosse realizada a extração utilizando o RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, NW, ALE), seguindo as instruções do fabricante. Ao final, o RNA foi diluído em água RNase-free, seguido da determinação da concentração do RNA (ng/μL) e pureza (OD260/280), por espectrometria no Nanodrop® ND-100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O RNA foi considerado puro se o OD260:OD280 estivesse entre 1.8 e 2.1.

### **3.5 Ensaio de viabilidade celular**

Para avaliar a viabilidade celular, durante a cultura de células, três amostras das linhagens 786-0 e HK-2 em ambiente de normóxia e hip óxia de 8 horas foram coradas com o reagente Trypan Blue Solution, 0.4% (GIBCO, Waltham, MA, EUA), e

então realizada a contagem das células vivas e mortas com auxílio da câmara de Neubauer. Para este método, o meio de cultura em contato com as células foi armazenado para ser utilizado na tripsinização. A seguinte fórmula matemática foi utilizada para calcular a porcentagem da viabilidade celular:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \frac{(\text{células vivas})}{(\text{células vivas} + \text{células mortas})} \times 100$$

### 3.6 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 2 µg de RNA obtido através da extração, utilizando o kit QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen, Hilden, NW, ALE). Foi preparado um mix contendo o RNA, o tampão para eliminação do DNA genômico e H<sub>2</sub>O, esse mix foi incubado a 42°C por 2 minutos e conservado em gelo. A esse primeiro mix, foram adicionados o tampão da transcriptase reversa, a enzima e o RT primer e então foi incubado a 42°C por 15 minutos e 95°C por 3 minutos. Após o processo, a amostra de cDNA foi armazenada a -20oC até que as reações de RT-qPCR fossem realizadas.

### 3.7 RT-qPCR

A técnica de RT-qPCR foi utilizada para comparar o perfil da expressão dos canais de zinco na linhagem 786-0 em ambiente de normóxia e hipóxia. Todas as reações de qPCR foram realizadas utilizando SYBR Green® (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA). O volume final da reação foi de 10 µL (5 µL de SYBR Green e os 5 µL restantes continham o cDNA, os primers e a H<sub>2</sub>O). A reação de amplificação foi realizada pelo sistema de PCR – tempo real StepOnePlus® (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) seguindo: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para a determinação dos níveis de expressão dos genes alvo, foi realizada a quantificação relativa =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Para cada amostra foi detectado o valor de Ct (tempo de ciclagem), tanto para os genes alvo como para o normalizador.

Para realizar essa técnica, os seguintes primers foram desenhados:

**Tabela 1** - Sequência de primers utilizados para realizar RT-qPCR

Símbolo da proteína	Símbolo do gene	Número de acesso	Fita senso	Fita antissenso
ZnT1	SLC30A1	NM_021194.3	GCCTTGGGTTTCAGTGATTGTAGT	CCCCTTCAGAACAACCTTTCC
ZnT2	SLC30A2	NG_042808.1	CGTCCGAGCTGCCTTCA	GACACCCATGCTCTGCATAAAG
ZnT4	SLC30A4	NM_001321036	TCCAGGAGGTTGAGGCTACAGT	GCTCCATCACCCAGGCTAGAG
ZnT9	SLC30A9	NM_006345.4	CACTTGCATGGGCCTTACTTC	GCCCACACCCAAAGAACCTA
ZIP1	SLC39A1	NM_001271957.2	TGCTGTGGAACGGGTATGG	TGAAATGGGCTAGGACCAACA
ZIP4	SLC39A4	NG_012234.2	GCCTGTTCTCTACGTAGCACTCT	GCGGGTCCCCTACTTTCA
ZIP10	SLC39A10	XM_017004522.2	GCCCAAGGCCTCAGCAA	GCGTGGAGCGCCCTTTA
ZIP11	SLC39A11	NM_001352691.2	CCTTGAGCGGCTTTTGTG	CTTCTGCTGCACCCAAGTGA
ZIP14	SLC39A14	NM_001351656.2	CACTACCAATGCCTGAGCTTTTC	CAAACGGATGCTGCTTGTG
HIF1- $\alpha$	HIF1- $\alpha$	NC_000014.9	TTTACCATGCCCCAGATTCAG	GGTGAACCTTTGTCTAGTGCTTCCA
TFRC	TFRC	Receptor transferrina	GGAGGACGCGCTAGTGTCT	TGCTGATCTAGCTTGATCCATCA

A escolha do gene de referência TFRC está baseada no estudo de Teixeira (2022), desenvolvido em nosso laboratório, especificamente para a linhagem tumoral 786-0, em microambiente hipóxico.

### 3.8 Extração de proteínas

A extração das proteínas foi realizada utilizando o reagente de lise CellLytic™ M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) seguindo as especificações do fabricante. A dosagem da concentração protéica foi realizada através da espectrometria no NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

### 3.9 Western Blot

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 12% e gel de empilhamento a 3%. Para a análise de proteínas totais foram utilizados 50 µg por amostra. Foi adicionado o tampão de amostra: Tris 50 mM, pH 6,8, DTT 25 mM, glicerol 10%, SDS 10%, azul de bromofenol 8 µg/mL e β-mercaptoetanol 1%. O padrão de peso molecular utilizado foi o marcador Prec Plus STD Kaleidoscope (Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, EUA). Os géis foram submetidos a uma corrente de 200V por, aproximadamente uma hora, até a saída do corante de bromofenol do gel. Após a eletroforese foi realizada a transferência semi seca para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) Hybond-ECL, (Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, EUA) utilizando o sistema Power Blotter System (Life Technologies Biotechnology, Carlsbad, CA, EUA) por 15 minutos a 2,5 Ampere. Após o tempo decorrido a membrana foi lavada três vezes com TBS 1X e mantida em agitação por 1 hora em leite desnatado 5% a fim de efetuar o bloqueio de reações inespecíficas. Após lavagens, a membrana foi incubada com os seguintes anticorpos primários CD71/TFRC (sc-65882 monoclonal, camundongo), anti HIF1-α (sc-13515 monoclonal, camundongo), Anti-ZnT1 (MBS9606086 policlonal, coelho), anti-ZnT4 (MBS630155 policlonal, coelho), anti-ZnT9 (sc-271956 monoclonal, monoclonal, camundongo), anti-ZIP1 (sc-393345, monoclonal, camundongo), anti-ZIP11 (MBS9005379 policlonal, coelho) e anti-ZIP 14 (MBS6003515, policlonal, coelho). Todos ficaram overnight (12-16 horas) a 4°C com agitação, diluídos em leite desnatado a 5%. Após a incubação com anticorpo primário a membrana foi lavada três vezes com TBS 1X e incubados com anticorpo secundário goat anti-rabbit (sc2004), ou goat anti-mouse (62-6420, Invitrogen, CA, EUA) ambos conjugados com HRP, em processo semelhante ao realizado com o primário diluído em leite desnatado a 5% em 1:1000, incubando por 2 horas em temperatura ambiente sob leve agitação. A revelação foi realizada utilizando o kit SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, MA, EUA). A fotodocumentação foi realizada utilizando o equipamento Alliance 4,7 Uvitec Cambridge.

Considerando a eficiência e disponibilidade dos anticorpos para realização do western blot, em tabela 2 está descrito as diluições utilizadas e quais marcas obtiveram eficiência na marcação.

**Tabela 2** - Anticorpos utilizados para análise de western blot

Anticorpo	Marca	Código	Diluição	Situação
ZnT1	Mybiosource	MBS9606086	1:500	Apresentou marcação
ZnT2	Mybiosource	MBS8248091	1:200	Não apresentou marcação
ZnT4	Mybiosource	MBS8308142	1:500	Apresentou marcação
ZnT9	Santa Cruz Biotechnology	sc-271956	1:500	Apresentou marcação
ZIP1	Mybiosource	MBS9414957	1:200	Não apresentou marcação
ZIP1	Santa Cruz Biotechnology	sc-393345	1:200	Apresentou marcação
ZIP4	Mybiosource	MBS8308152	1:200	Não apresentou marcação
ZIP10	Mybiosource	MBS151019	1:200	Não apresentou marcação
ZIP11	Mybiosource	MBS9005379	1:2000	Apresentou marcação
ZIP14	Mybiosource	MBS6003515	1:500	Apresentou marcação
HIF1- $\alpha$	Santa Cruz Biotechnology	sc-13515	1:500	Apresentou marcação
TFRC	Santa Cruz Biotechnology	sc-65882	1:500	Apresentou marcação

### 3.10 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Os resultados do presente estudo foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças significativas estatisticamente entre os grupos foram obtidas através da análise de Teste T para comparações entre normais e hipóxia 8 horas, e de variância One-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni para os diferentes horários de hipóxia. O critério para significância estatística foi fixado em \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Determinação do tempo de exposição á hipóxia

#### 4.1.1 Determinação quantitativa e qualitativa do RNA proveniente da linhagem celular 786-0 em normóxia e hipóxia

As amostras de RNA foram obtidas em condição de normóxia e submetidas à hipóxia por 4, 6 e 8 horas. A análise da variação dos níveis de expressão do gene HIF1- $\alpha$  foi empregada para seleção do melhor momento experimental.

Na tabela 3 estão compilados os rendimentos e a pureza do RNA total proveniente da linhagem 786-0 mantida em normóxia e em hipóxia. O rendimento nas células em normóxia variou de 1622,9 a 1328,9 ng/ $\mu$ L com um valor médio de 1470,06  $\mu$ L $\pm$ 147,34. Já o rendimento em hipóxia 4 horas variou em 1868,7 a 1763,5 com valor médio de 1817,8 $\pm$ 52,68. Em hipóxia 6 horas o rendimento variou entre 1539,6 e 1427,5 com valor médio de 1486,36 $\pm$ 56,26. Em hipóxia 8 horas, obteve-se um rendimento entre 1250,8 e 915,7 ng/ $\mu$ L e com um valor médio de 1060,8 $\pm$ 172. A pureza (A260/A280) das extrações variou entre 2,03 e 2,09.



**Tabela 3** - Rendimento e pureza(A260/280) da extração de RNA da linhagem 786-0 em condições de normóxia e hipóxia

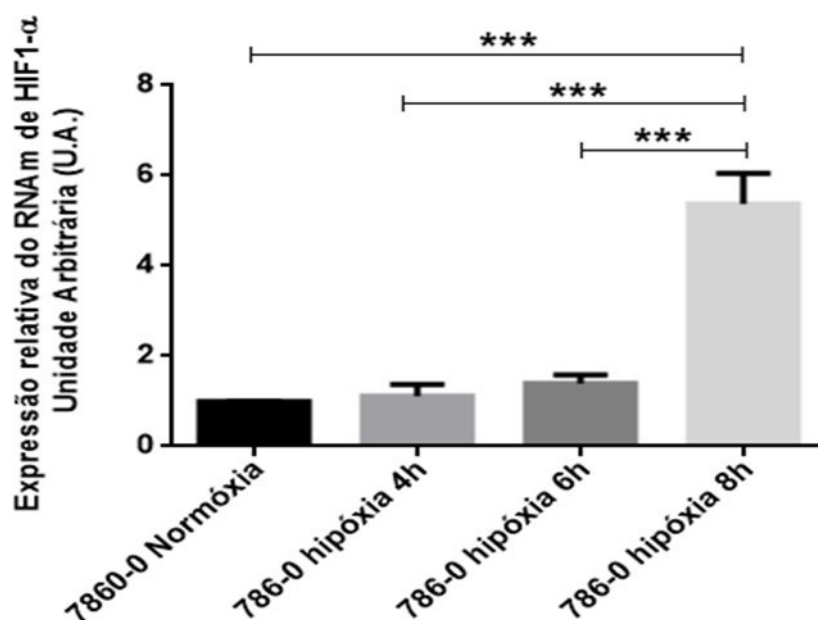
Tempo de exposição á hipóxia	Rendimento/Pureza					
786-0 Normóxia	1622,9	2,07	1458,4	2,08	1328,9	2,08
786-0 Hipóxia 4 horas	1868,7	2,03	1763,5	2,08	1821,2	2,08
786-0 Hipóxia 6 horas	1492,0	2,07	1427,5	2,08	1539,6	2,08
786-0 Hipóxia 8 horas	1250,8	2,09	1015,9	2,08	915,7	2,08

Uma vez que todas as amostras de RNA foram consideradas de bom rendimento e puras, seguiu-se para análise de expressão gênica empregando-se a técnica por RT-qPCR, e análise do nível proteico por western blot.

#### 4.1.2 Determinação do tempo de exposição á hipóxia experimental da linhagem 786-0 por RT- qPCR

O gene HIF1- $\alpha$  é reconhecido como responsivo à hipóxia, sendo assim, ele é, sem dúvidas, um dos principais marcadores da ocorrência deste tipo de estresse na linhagem 786-0. Portanto, o aumento de sua expressão indica a correta indução das células em hipóxia. A figura 6 apresenta a análise estatística realizada a partir dos resultados obtidos da técnica de RT-qPCR em linhagem 786-0 com o gene HIF1- $\alpha$  em diferentes tempos em que as células ficaram expostas à hipóxia.

**Figura 6** - Análise comparativa por RT-qPCR da expressão de HIF1- $\alpha$  na linhagem 786-0 em ambiente de normóxia e após 4, 6 e 8 horas de hipóxia



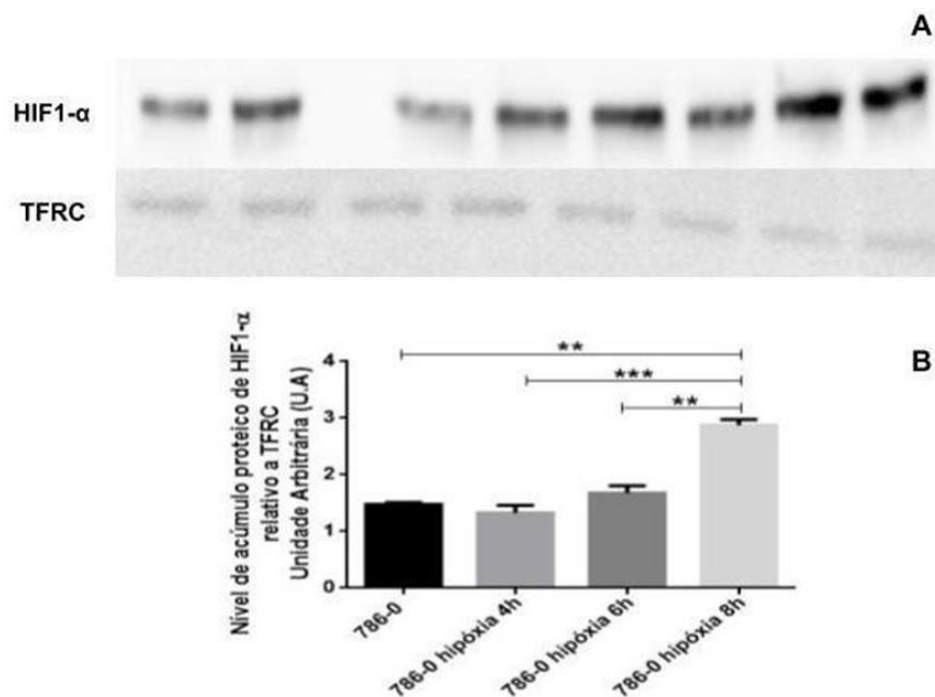
Os resultados não mostram a modulação positiva do gene HIF1- $\alpha$  nas células 786-0 submetidas a 4 horas de hipóxia vs 786-0 normóxia ( $P < 0,6990$ ) e a 6 horas de hipóxia vs 786-0 normóxia ( $P < 0,1665$ ). Também não houve diferença significativa entre 786-0 hipóxia 6 horas vs 786-0 hipóxia 4 horas ( $P < 0,4247$ ). Entretanto, é nítido o aumento da expressão relativa do gene HIF1- $\alpha$  nas células 786-0 hipóxia 8 horas vs 786-0 normóxia de  $437,95 \pm 67,43\%$  ( $P < 0,001$ ). O mesmo ocorreu na comparação entre células 786-0 hipóxia 8 horas vs 786-0 hipóxia 4 horas de  $382,85 \pm 92,88\%$  ( $P < 0,001$ ), e de 786-0 hipóxia 8 horas vs 786-0 hipóxia 6 horas de  $285,31 \pm 86,01\%$  ( $P < 0,001$ ).

#### 4.1.3 Comprovação por western blot dos resultados obtidos na análise por RT-qPCR dos tempos de hipóxia experimental

A análise da expressão proteica validou os dados encontrados no RT-qPCR. A quantificação das áreas das bandas, apresentadas no western blot, comprovou a

não modulação do gene HIF1- $\alpha$  em 786-0 nos tempos de hipóxia 4 a 6 horas (6 horas vs 786-0 normóxia;  $P < 0,2591$ ); (6 horas vs 786-0 hipóxia 4 horas;  $P < 0,1179$ ). Entretanto, após 8 horas de hipóxia a expressão do gene HIF1- $\alpha$  foi significativamente superior à todas as outras condições experimentais: 786-0 hipóxia 8 horas vs 786-0 normóxia de  $94,5 \pm 13,84\%$  ( $P < 0,01$ ), de 786-0 hipóxia 8 horas vs 786-0 hipóxia 4 horas de  $116,9 \pm 23,97\%$  ( $P < 0,001$ ) e de 786-0 hipóxia 8 horas vs 786-0 hipóxia 6 horas de  $71,33 \pm 23,49\%$  ( $P < 0,001$ ). Figura 7.

**Figura 7-** Análise dos níveis proteicos de HIF1- $\alpha$  em normóxia e hipóxia nos tempos de 4, 6 e 8 horas. Imagem representativa das bandas em duplicatas (A), na ordem normóxia, hipóxia 4 horas, 6 horas e 8 horas, com análise estatística (B)



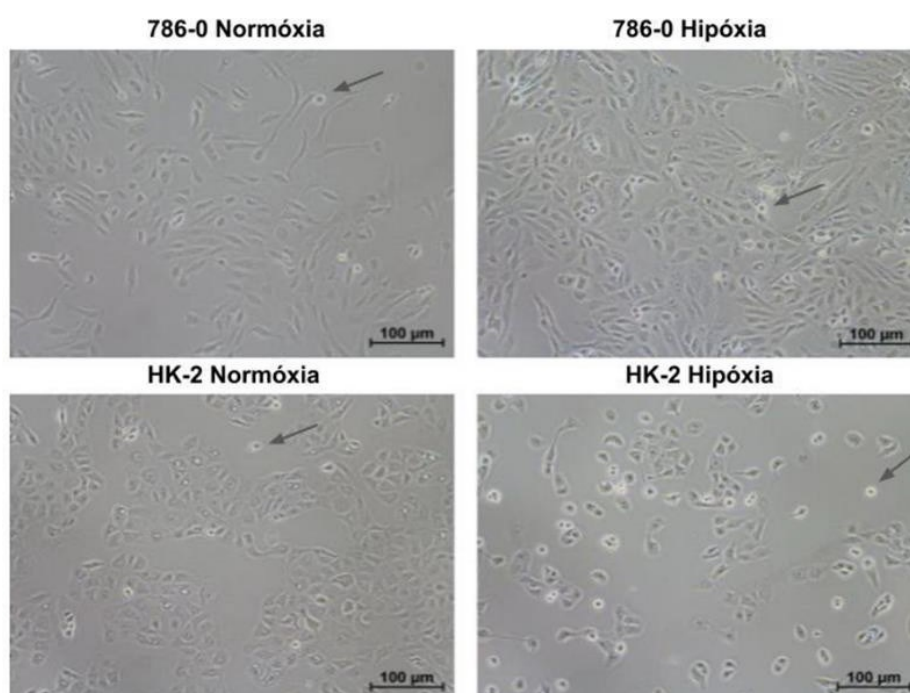
Com base nas análises anteriores, em todos os experimentos a seguir, utilizou-se 8 horas de hipóxia como padrão.

#### 4.1.4 Avaliação morfológica e análise de viabilidade celular das linhagens 786-0 e HK-2 em normóxia e hipóxia 8 horas

Entende-se que a linhagem tumoral 786-0 possui como característica uma maior resistência ao microambiente tumoral em comparação a linhagem tubular normal HK-2. Para efeito de comparação, ambas as linhagens foram submetidas ao período de 8 horas de hipóxia para a avaliação da mortalidade. Para isso, foram mantidas em cultura celular até atingirem cerca 80% de confluência e então, foram submetidas ao período de 8 horas de hipóxia. Após esse período, ambas foram analisadas por microscópio óptico.

Nas linhagens em normóxia, não foi possível observar diferenças morfológicas significativas, entretanto, é possível observar a redução do número de células HK-2 aderidas (viáveis), ou seja, aumento de células em suspensão (mortas), quando expostas ao ambiente hipóxico, diferente da linhagem tumoral, que mesmo após 8 horas de hipóxia, conseguiu se manter com boa viabilidade.

**Figura 8** - Imagem representativa das linhagens celulares 786-0 e HK-2 em ambiente de normóxia e após o período de 8 horas de hipóxia (imagens obtidas no microscópio invertido Nikon Eclipse TS100, ampliado em 10x). As setas indicam células mortas

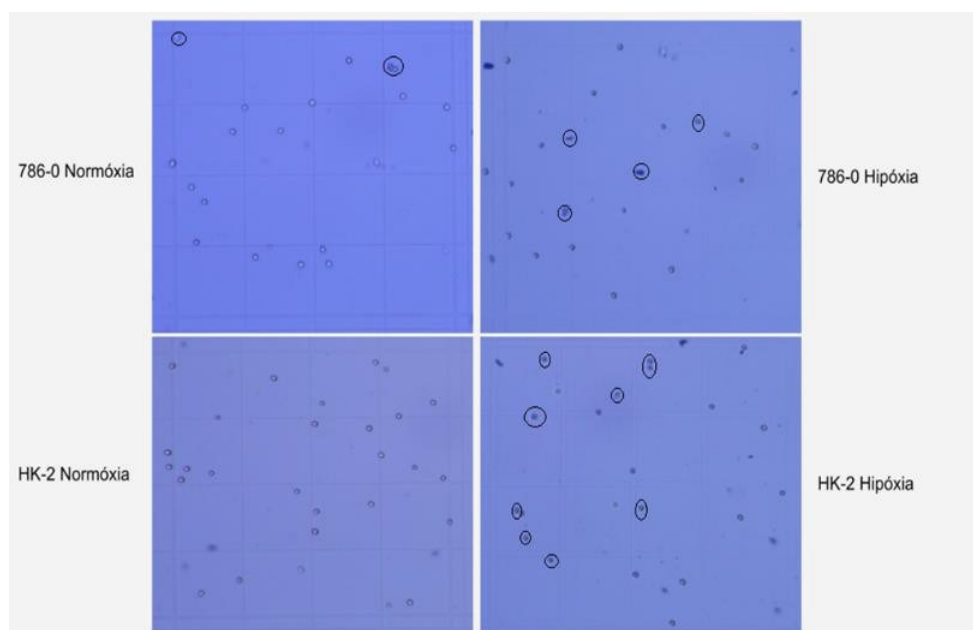


Para quantificar a morte celular observada na comparação entre as imagens da figura 8, foi realizado o ensaio de viabilidade celular através do corante trypan blue em câmara de Neubauer, com resultados apresentados em tabela 4.

**Tabela 4** - Resultado em porcentagem do cálculo de viabilidade celular para as linhagens expostas ao ambiente de normóxia e hipóxia no período de 8 horas.

786-0 Normóxia	90,20 %
HK-2 Normóxia	90,42 %
786-0 Hipóxia	76,19 %
HK-2 Hipóxia	61,9 %

**Figura 9** - Imagem representativa da câmara de Neubauer nas situações quantificadas em tabela. Círculos representando células mortas



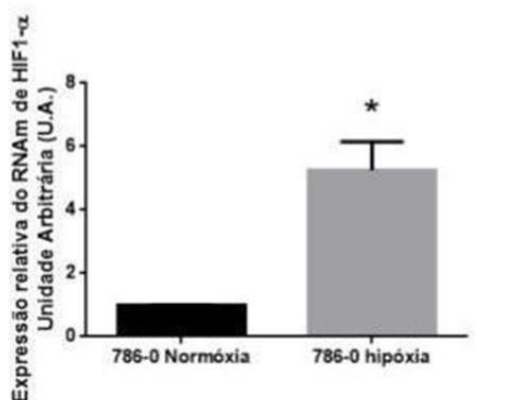
Os resultados da viabilidade celular da tabela 4 são corroborados pelos apresentados nas imagens das figuras 8 e 9, ou seja, uma boa confluência e pouca mortalidade em ambas linhagens cultivadas em normóxia. Por outro lado, quando expostas a hipóxia, a linhagem tubular normal HK-2 sofre uma mortalidade mais acentuada em relação à linhagem tumoral 786-0. Tais dados evidenciam que a linhagem tumoral é resistente à hipóxia devido aos seus mecanismos de adaptação

ao ambiente tumoral, enquanto a linhagem normal não foi eficientemente capaz de se adaptar, resultando em exacerbada mortalidade celular.

#### 4.1.5 Modulação gênica e proteica de HIF1- $\alpha$ na comparação da linhagem 786-0 normóxia e hipóxia 8 horas.

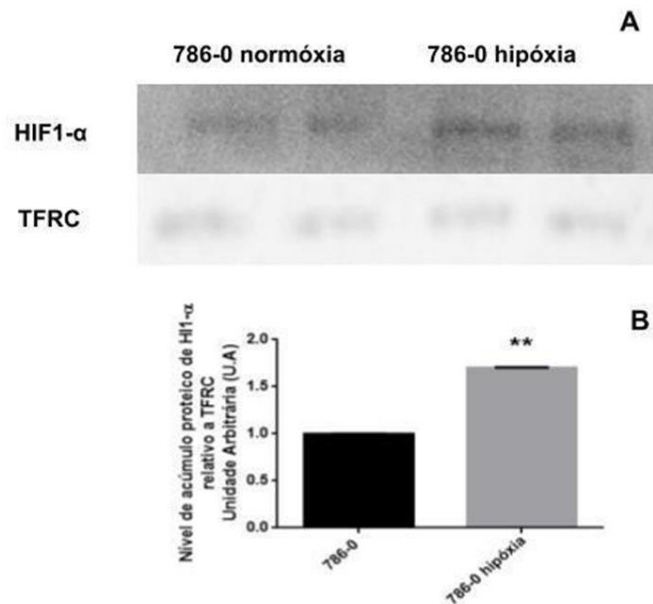
A análise gênica e proteica dos diferentes tempos em que as células foram induzidas em hipóxia mostrou que o horário de 8 horas foi o qual apresentou modulação em HIF1- $\alpha$  com grande significância. Então, a análise direta por RT- qPCR de HIF1- $\alpha$  em 786-0 normóxia vs 786-0 hipóxia 8 horas apresentou um aumento de  $425,7 \pm 89,48\%$  ( $P < 0,0144$ ) (Figura 10).

**Figura 10** - Análise comparativa por RT-qPCR da expressão de HIF1- $\alpha$  na linhagem 786-0 em ambiente de normóxia e após 8 horas de hipóxia



A análise de nível proteico de HIF1- $\alpha$  (figura 11) apresentou um aumento de  $70,1 \pm 0,73\%$  ( $P < 0,0047$ ), validando os resultados de RT-qPCR.

**Figura 11** - Análise dos níveis proteicos de HIF1- $\alpha$  em normóxia e hipóxia 8 horas

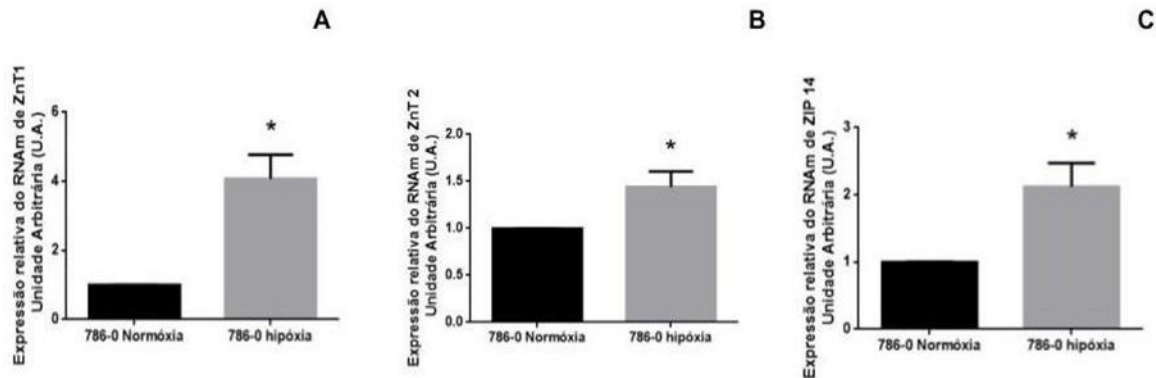


A análise comparativa da linhagem em normóxia e hipóxia 8 horas confirmou a modulação positiva HIF1- $\alpha$ , possibilitando o prosseguimento das análises em transportadores de Zn.

#### 4.2 Avaliação da modulação da expressão dos genes dos transportadores de zinco na linhagem 786-0 por RT-qPCR

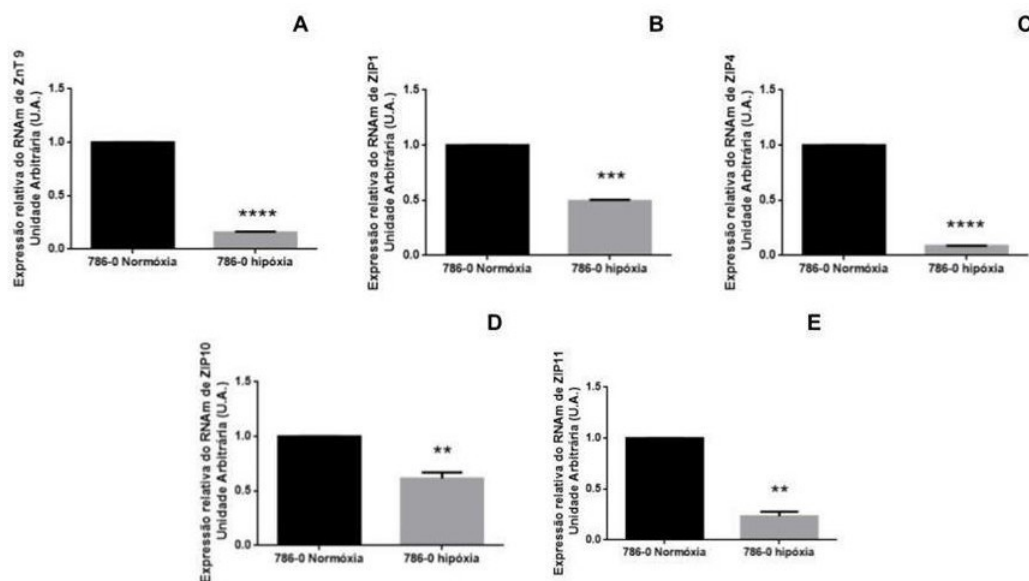
A análise por RT-qPCR dos canais de zinco na linhagem 786-0 em normóxia e hipóxia 8 horas, identificou um aumento da expressão relativa dos canais ZnT1 de  $307,7 \pm 69,37\%$  ( $P < 0,0165$ ), ZnT2 de  $14,41 \pm 16,55\%$  ( $P < 0,0439$ ) e ZIP14 de  $112,2 \pm 34,97\%$  ( $P < 0,0309$ ). (Figura 12 A, B e C)

**Figura 12** - Variação da expressão dos canais ZnT1, ZnT2 e ZIP14 em normóxia e hipóxia por RT-qPCR



Entretanto, grande parte dos canais analisados apresentou uma diminuição da expressão relativa nas células em hipóxia, são eles: ZnT9 de  $84,38 \pm 0,67\%$  ( $P < 0,0001$ ), ZIP1 de  $50,62 \pm 1,17\%$  ( $P < 0,0002$ ), ZIP4 de  $91,28 \pm 0,80\%$  ( $P < 0,0001$ ), ZIP10 de  $38,69 \pm 5,63\%$  ( $P < 0,0070$ ), e ZIP11 de  $76,73 \pm 4,57\%$  ( $P < 0,0012$ ) (Figura 13 A, B, C, D e E).

**Figura 13** - Variação da expressão de dos canais ZnT 9, ZIP1, ZIP4, ZIP 10 e ZIP11 em normóxia e hipóxia por RT-qPCR



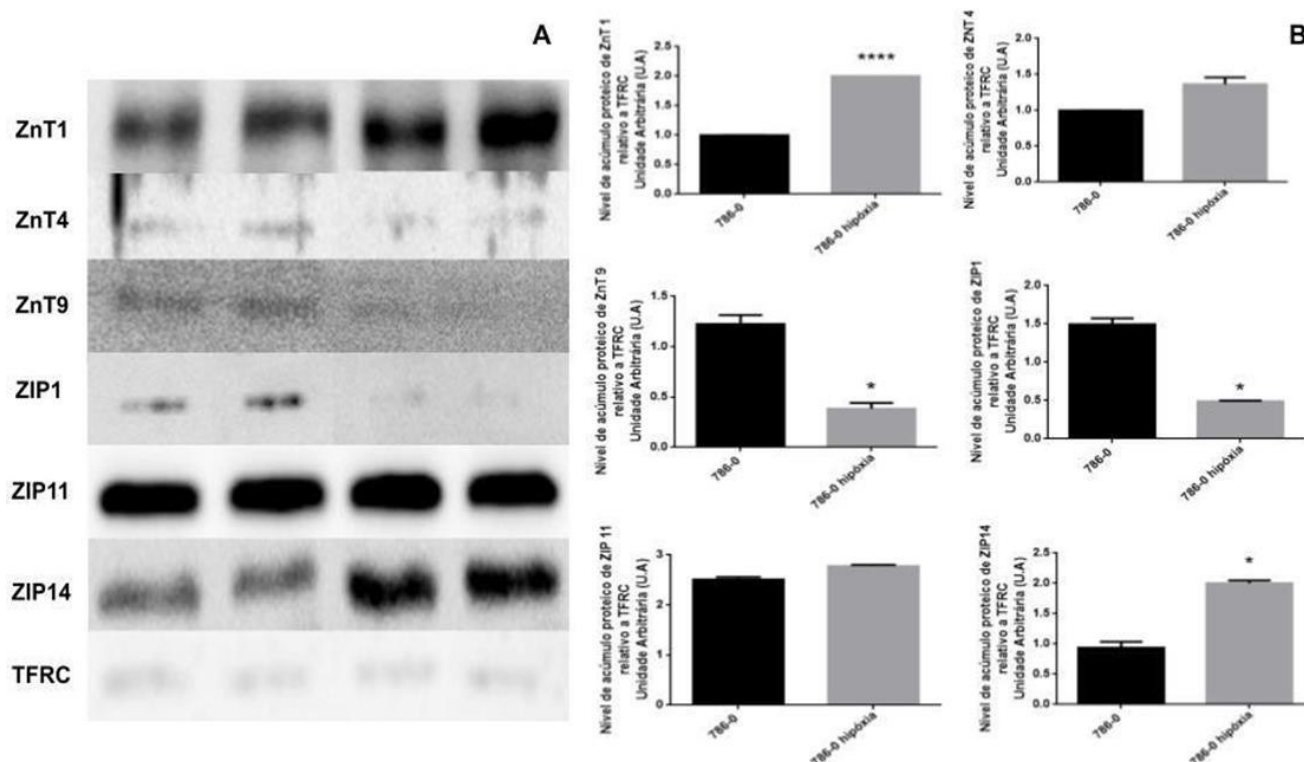


Tais dados estatísticos, evidenciam que a hipóxia foi capaz de modular muitos dos canais selecionados, sendo o ZnT4, o único que não apresentou qualquer modulação.

#### 4.2.1 Validação dos dados obtidos no RT-qPCR por western blot

A técnica de western blot foi empregada para a validação dos dados obtidos RT-qPCR. Na figura 14 estão apresentadas as bandas (A) e as respectivas quantificações (B) dos canais detectados pela técnica.

**Figura 14** - Análise dos níveis proteicos dos canais ZnT1, ZnT4, ZnT9, ZIP1, ZIP11 e ZIP14, normalizados por TFRC na técnica de western blot



Em relação aos transportadores de zinco, dentre os anticorpos disponíveis e que obtiveram eficiência na marcação, ZnT1 apresentou um aumento de  $99,9 \pm 0,15\%$  ( $P < 0,0007$ ). Tal resultado é compatível com o resultado de RT-qPCR, reafirmando um aumento significativo da expressão deste transportador quando exposto à hipóxia.

Não houve diferença significativa na expressão proteica do ZnT4, corroborando os dados obtidos no RT-qPCR.

O transportador localizado no retículo endoplasmático e mitocôndria ZnT9, apresentou uma diminuição de  $61,65 \pm 5,69\%$  ( $P < 0,0142$ ), também em acordo com os resultados obtidos na técnica de RT-qPCR.

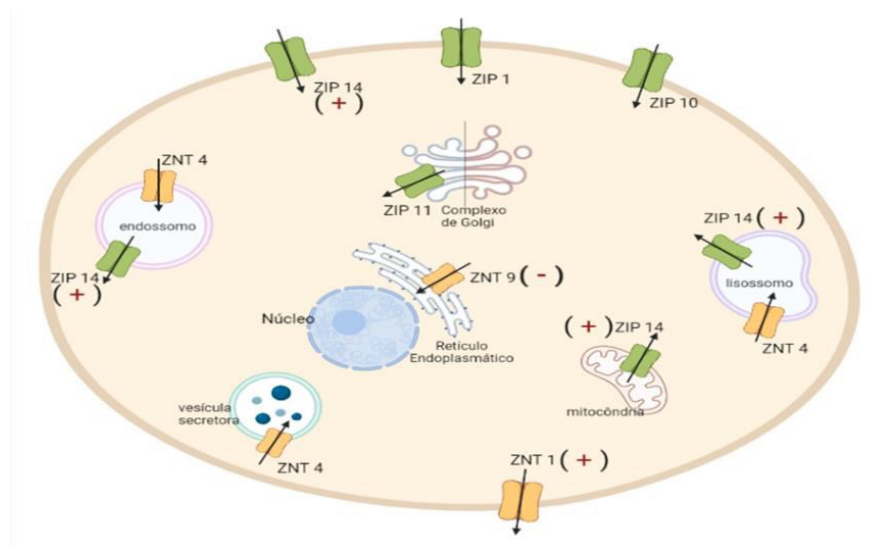
O transportador de membrana citoplasmática ZIP1 apresentou uma diminuição em  $51,24 \pm 1,10\%$  ( $P < 0,0312$ ), reafirmando os resultados obtidos através da técnica anterior.

Na análise da expressão proteica do ZIP11, não se observou diferença significativa na expressão proteica, do qual não apresenta concordância com a diminuição da expressão desse gene observado no RT-qPCR .

Houve aumento significativo na expressão proteica do ZIP14 de  $63,7 \pm 4,46\%$  ( $P < 0,05$ ). Este dado assemelha-se ao encontrado em RT-qPCR.

Por fim, na figura 15, está representada a localização dos transportadores efetivamente marcados e a modulação apresentada na técnica de western blot.

**Figura 15** - Representação da localização dos transportadores de zinco marcados pela técnica de western blot. O símbolo ( + ) indica os transportadores do qual foi avaliado um aumento no nível proteico, e o símbolo ( - ) indica aqueles que foram avaliados com diminuição



**Fonte:** Elaboração própria.

## 5 DISCUSSÃO

Desde 2019, a quantidade de artigos publicados no PubMed sobre o CCRcc aumentou expressivamente, trazendo novas perspectivas da doença para estudos observacionais e clínicos. A adaptação à hipóxia é uma característica marcante desse tumor, assim como a mutação do gene VHL, que é presente em grande parte dos CCRs. O zinco, por sua vez, trata-se de um oligoelemento essencial, do qual perturbações na concentração deste elemento, pode acarretar no desequilíbrio do zinco celular. No adenocarcinoma renal, as consequências dessas variações são pouco conhecidas. Os transportadores de zinco são essenciais para garantir a homeostase deste oligoelemento, portanto, verificar uma possível modulação destes transportadores em ambiente hipóxico é fundamental para entender como o adenocarcinoma renal pode interferir nestes processos (GARFIELD, K; A LAGRANGE, C, 2020; CHOUEIRI, T; KAELIN, W, 2020; KAMBE, T et al, 2021).

Todas as amostras utilizadas para a técnica de RT-qPCR foram analisadas em relação ao seu rendimento e pureza, a fim de garantir a boa qualidade das amostras (FLEIGE; PFAFFL, 2006). O método de quantificação por Nanodrop é um método reconhecido pela comunidade científica, do qual também possui a capacidade de verificar a qualidade do RNA. A tabela 3 apresenta os valores obtidos. É possível observar que não houve diferença significativa no rendimento das amostras em normóxia, quando comparado aos diferentes horários de hipóxia. Tal fato é substanciado com a figura 8 e a tabela 4, em que é possível verificar que a morte celular não foi considerável na linhagem 786-0 em hipóxia, quando comparada à normóxia. Tal rendimento pode também trazer indícios de que o crescimento celular não foi prejudicado quando exposto em hipóxia.

O microambiente tumoral hipóxico é comumente encontrado em tumores sólidos, fazendo com que a demanda por oxigênio seja maior que sua disponibilidade. Nesse ambiente, HIF $\alpha$  é presente por se tratar de uma proteína envolvida na regulação da resposta celular à hipóxia, portanto, é maior expressa nesse ambiente. Mas, quando se trata do CCRcc, é importante considerar a mutação do gene VHL, que impede a degradação das subunidades de HIF $\alpha$ , o que proporciona um aumento da transcrição desse gene, tornando o CCRcc mais agressivo, uma vez que HIF1- $\alpha$  é capaz de ativar a transcrição de genes favoráveis à progressão tumoral (CHOUEIRI, T; KAELIN, W, 2020).

Portanto, somando a mutação do gene VHL, ao microambiente tumoral hipóxico, espera-se que a linhagem submetida a indução da hipóxia em cultura celular, expresse um aumento significativo da transcrição de HIF1- $\alpha$ , quando comparado a linhagem que se manteve em cultura no ambiente de normóxia (ZHANG; CHEN, 2018).

Para induzir as células em hipóxia, é preciso considerar duas alternativas: indução química através do cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ), ou a indução através de um sistema de câmara de hipóxia. O  $\text{CoCl}_2$  é amplamente utilizado para mimetizar a hipóxia, estabilizando quimicamente o HIF-1 $\alpha$ . Ainda não são conhecidos os efeitos deste reagente em transportadores de zinco, portanto, a opção escolhida para este trabalho, foi a indução por câmara de hipóxia (RINDERKNECHT et al., 2021).

Há diversos modelos de câmaras de hipóxia no mercado, das mais complexas, às portáteis. Possuem a capacidade de injetar uma mistura específica de gás nitrogênio ( $\text{N}_2$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e oxigênio ( $\text{O}_2$ ). Entretanto, a grande dificuldade deste tipo de câmara é garantir o controle dos gases durante o tempo de exposição á hipóxia. O custo de um equipamento de alta qualidade pode ser um grande obstáculo para a realização dessa técnica (MATTIA et al., 2021).

Uma outra técnica que ao invés de injetar gases, utiliza um agente desoxidante em sachê em um recipiente fechado foi demonstrado por Itoi et al. (2012), depois em Ito et al. (2015), e mais recentemente por Mas et al. (2020), trazendo uma base sólida para esta técnica, do qual o presente trabalho similariza a técnica com o objetivo final mimetizar de maneira mais eficiente a hipóxia, com maior garantia de controle de gases, e sem intervir quimicamente nas células, garantindo a real modulação dos genes analisados.

A técnica de RT-qPCR (figura 6) foi utilizada para verificar o aumento da expressão do gene HIF1- $\alpha$ . Diferentes horários foram selecionados para verificar o aumento da expressão relativa, e selecionar o melhor tempo para indução nesta metodologia. Apenas a partir do horário de 8 horas foi possível verificar um aumento significativo da expressão de HIF1- $\alpha$ . A linhagem tumoral 786-0 é resistente à hipóxia e possui um nível basal elevado de HIF1- $\alpha$  devido à mutação do gene VHL, por isso, o aumento de HIF1- $\alpha$  pode se apresentar apenas ao longo de uma hipóxia mais prolongada. A análise por western blot (figura 7) comprovou os resultados

obtidos por RT-qPCR, garantindo a escolha do tempo de 8 horas para análise dos transportadores de zinco.

Com o intuito de demonstrar o efeito da hipóxia em uma linhagem tubular renal em comparação ao efeito em uma linhagem tumoral resistente à hipóxia, a figura 8 foi apresentada. Uma linhagem não tumoral está habituada a se desenvolver em um ambiente rico e com homogeneidade de nutrientes necessários, por essa razão, expô-las a ambiente de estresse faz com sejam mais suscetíveis aos danos que o ambiente pode ocasionar. Já uma linhagem tumoral apresenta capacidade adaptativa ao ambiente hipóxico que o tumor ocasiona. A ativação de fatores de crescimento e angiogênese como VEGF- $\alpha$  e EPO faz com que a linhagem tumoral tenha acesso a nutrientes necessários para continuar em desenvolvimento (HUANG; LIN; TANIGUCHI, 2017). Sendo assim, ao contrário da linhagem tubular normal, as células tumorais sofrem menos apoptose e continuam crescendo ao longo do período de hipóxia. Tais características foram reforçadas através da tabela 4, do qual apresenta a viabilidade celular de ambas a linhagens em ambiente de normóxia e hipóxia, demonstrando que a linhagem tubular normal foi muito mais suscetível ao efeito da hipóxia, causando morte celular e impedindo seu crescimento, sem mudanças na morfologia em ambas linhagens. Entretanto, a comparação entre essas duas linhagens deve se manter apenas no âmbito de comparação morfológica, uma vez que células normais expostas à hipóxia não se tornarão tumorais (ISHIUCHI et al., 2020; SHIVA et al., 2020).

Não foram encontrados dados na literatura que verifique a morfologia deste tipo celular através deste método escolhido para indução de hipóxia. Zhang e Chen (2018) utilizou  $\text{CoCl}_2$  por 24 horas como método de hipóxia em linhagem 786-0, e utilizando a concentração de 150  $\mu\text{mol/L}$ , não foi verificada mudanças significativas na morfologia, exceto por alguns vacúolos no citoplasma. Essa concentração foi a que apresentou maior expressão de HIF1- $\alpha$  por western blot. Outras concentrações como de 500  $\mu\text{mol/L}$  ou maior apresentaram células gradualmente mais alongadas, entretanto, apresentaram uma menor expressão de HIF1- $\alpha$ .

Então, a avaliação da expressão relativa do gene de HIF1- $\alpha$  por RT-qPCR foi mais uma vez realizada como método de comprovação direta dos dados. Diferente das figuras 6 e 7, onde a análise por One Way Anova foi aplicada, a

comparação direta por Test T entre duas populações confirmou o aumento significativo da expressão de HIF1- $\alpha$  por RT-qPCR (figura 10) e western blot (figura 11).

O transportador ZnT1 é presente de maneira ubíqua em diversas linhagens celulares, e é o único exportador de zinco presente na membrana plasmática das células de adenocarcinoma renal (HUANG; TEPAAMORNDECH, 2013). Em buscas na base de dados do PubMed durante o período de 2013 a 2023, a palavra-chave “ZnT1 and tumor” encontrou 27 resultados. Não foram encontrados resultados que demonstrem a expressão deste transportador no adenocarcinoma renal de células claras, ou mesmo sua expressão em hipóxia. Lehy et al. (2019), constatou uma diminuição da expressão deste transportador em linhagem de adenocarcinoma renal do tipo cromóforo, e que pacientes com uma superexpressão de ZnT1 tendem a uma diminuição significativa na sobrevida. Bodiga et al. (2017) demonstra que em cardiomiócitos, a expressão de ZnT1 aumentou rapidamente durante o período de hipóxia de 6 horas. Apesar de se tratar de linhagens distintas, neste trabalho, este transportador apresentou o mesmo comportamento.

Com o mesmo padrão de busca, a palavra chave “ZnT4 and tumor” encontrou 6 resultados, enquanto a palavra-chave “ZnT4 and renal adenocarcinoma” encontrou nenhum resultado. Em 2003, Henshall et al., se intitulou como o primeiro estudo a demonstrar a expressão de ZnT4 na próstata humana, o qual demonstrou uma modulação na correlação entre próstata normal e progressão tumoral. No CCRcc a análise por RT-qPCR e western blot não apresentou uma modulação neste canal com a presença de hipóxia neste trabalho.

ZnT9 é um transportador de expressão mais alta no rim, cérebro, músculo e tireóide (GARTMANN et al., 2018). A busca por palavra-chave “ZnT9 and tumor” encontrou 6 resultados, entretanto, a busca por “ZnT9 and renal adenocarcinoma” encontrou zero resultados. Após um período de hipóxia de 6 horas, Bodiga et al. (2017) não encontrou uma alteração significativa na análise por western blot de ZnT9. Neste presente estudo, este transportador apresentou uma significativa diminuição de sua expressão em hipóxia.

ZIP1 é um transportador localizado na membrana plasmática, do qual possui a função de importar o zinco extracelular para o meio intracelular, a palavra-chave

“ZIP1 and tumor” encontrou 15 resultados. Franklin e Costello (2007), considerou este transportador como um agente supressor de tumor no câncer de próstata, uma vez constatado que as células prostáticas malignas exibem um silenciamento da expressão de ZIP1 acompanhado da diminuição da concentração do zinco celular, enquanto as células não tumorais, utilizam este transportador para captar o zinco extracelular, e importar para o citosol. Em linhagem de adenocarcinoma renal, Liu et al. (2021), utilizou a base de dados da UALCAN para avaliar a expressão dos transportadores em tecidos normais e com CCRcc, foi constatado que ZIP1 é significativamente mais expresso no tecido tumoral. Ainda em RCCcc, Dong et al. (2014) relata que ZIP1 diminuiu com o aumento do estágio clínico. O estudo de Bodiga et al. (2017), realizou a análise proteica de ZIP1, do qual em hipóxia, apresentou um aumento significativo em cardiomiócitos. Neste presente estudo, ZIP1 apresentou uma diminuição significativa de sua expressão em hipóxia.

ZIP11 está presente no complexo de Golgi e no núcleo. A palavra-chave “ZIP11 and tumor” encontrou apenas 4 resultados. Destes resultados, Wu et al. (2015) encontrou sete variantes genéticas deste transportador associadas com risco de CCR. Liu et al. (2021), em sua avaliação sobre a expressão dos transportadores em tecidos normais e com CCRcc, apresentou que ZIP11 não demonstrou diferença significativa entre tecido normal e tumoral. Bodiga et al. (2017) demonstrou um aumento da expressão de ZIP11 após a hipóxia em cardiomiócitos. Em linhagem de adenocarcinoma renal deste trabalho, a análise por RT-qPCR apresentou uma diminuição significativa da expressão relativa deste canal em hipóxia, enquanto a análise de nível proteico não demonstrou uma modulação.

ZIP14 é um importador presente em endossomo e membrana plasmática. Na busca por palavras-chave no PubMed, “ZIP14 and tumor” encontrou 19 resultados. Liu et al. (2021) utilizou a base de dados do UALCAN identificou um aumento expressão de ZIP14 em tecidos de CCRcc, em comparação com tecido normal. Bodiga et al. (2017) mostrou por western blot, um aumento significativo do nível proteico de ZIP14 em cardiomiócitos após hipóxia. Hatano et al. (2021) descreveu que durante a inflamação em células HEK, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  regulam positivamente a expressão de ZIP14 via sinalização NF- $\kappa$ B e HIF1- $\alpha$ . Zhao et al. (2017) também utilizou a linhagem HEK para demonstrar que a proteína ZIP14 foi regulada por p53, aumentando seus níveis com a falta da p53, e diminuído quando

aumentada a expressão de p53, e ainda foi constatado que essa regulação não dependeu totalmente das mudanças na expressão do mRNA de ZIP14. Neste presente estudo em CCRcc, foi constatado um aumento da expressão de ZIP 14 em hipóxia.

Elucidar os mecanismos de homeostase do zinco através dos transportadores de zinco no adenocarcinoma renal é importante na busca por novos alvos terapêuticos. Não foram encontrados dados na literatura recente que apresenta um transportador específico como alvo terapêutico no adenocarcinoma renal. Entretanto, a suplementação de zinco em pacientes oncológicos se mostrou eficiente em diversos tipos de câncer, inibindo a progressão do tumor e promovendo maior longevidade (BOBROWSKA-KORCZAK et al., 2020; HOSUI et al., 2018).

Muito além da suplementação oral, outras alternativas foram desenvolvidas e estão em alta para suplementação de zinco. Alguns estudos já foram realizados utilizando nanopartículas de zinco em testes in vitro. Em células MCF7 os resultados demonstraram uma supressão do tumor e atividade anticancerígena, sendo seletivamente tóxicas apenas para as células cancerígenas sem prejudicar as células normais (MOGHADDAM et al., 2017; GELBARD, 2022). Já in vivo, o tratamento de ratos com carcinoma hepatocelular com nanopartículas de ZnO também demonstrou atividade anticancerígena (E.Bashandy. et al., 2021; GELBARD, 2022).

O uso do zinco como um fotossensibilizador em terapia fotodinâmica foi testado, trazendo resultados positivos. O uso de nanofolhas de óxido de zinco também demonstrou atividade anticâncer contra a viabilidade celular do câncer de pele, colorretal e de fígado (OGBODU et al., 2020; GELBARD, 2022) . Dados como estes, demonstram que o zinco é um oligoelemento promissor na busca por novos alvos terapêuticos, trazendo luz a importância de estudos sobre o efeito da suplementação de zinco em seus transportadores em tumores.



## 6 CONCLUSÃO

A linhagem tumoral de adenocarcinoma renal 786-0 apresentou um aumento da expressão de HIF1- $\alpha$  no RNAm e na proteína, quando foi induzida em hipóxia por 8 horas em câmara de hipóxia induzida por agente desoxidante, desta forma, comprovando a eficiência da metodologia.

Os transportadores ZnT1 e ZIP14 apresentaram um aumento de sua expressão relativa, enquanto os transportadores ZnT9 e ZIP1 foram avaliados com uma diminuição na expressão relativa. Já o transportador ZnT4 não apresentou modulação na comparação entre as duas condições, e ZIP11 apresentou uma diminuição na avaliação por RT-qPCR, enquanto não modulou na técnica de western blot.

Estes resultados indicam que até o presente momento, a hipóxia é capaz de modular a expressão gênica e proteica de alguns dos transportadores de zinco, abrindo caminho para estudos sobre a função do zinco na fisiopatologia desta doença.

## 7 BIBLIOGRAFIA

Abdo, A et al. Zinc Homeostasis Alters Zinc Transporter Protein Expression in Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells. **Biological Trace Element Research**. 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12011-020-02328-z>. Acesso em out.22.

AYDEMIR, Tolunay B; COUSINS, Robert J. The Multiple Faces of the Metal Transporter ZIP14 (SLC39A14). *J Nutr*, p. 174-184, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6251594/>. Acesso em: abr. 2023.

BAFARO, Elizabeth et al. The emerging role of zinc transporters in cellular homeostasis and cancer. **Signal Transduction And Targeted Therapy**, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/sigtrans201729>. Acesso em: abr. 2023.

BALTACI, A; YUCE, K. Zinc Transporter Proteins. **Neurochemical Research**, p. 517-530, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11064-017-2454-y#citeas>. Acesso em: out. 2022.

BOBROWSKA-KORCZAK, Barbara *et al.* Effect of Zinc Supplementation on the Serum Metabolites Profile at the Early Stage of Breast Cancer in Rats. **Nutrients**, n. 11, p. 3457-1437, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7696632/>. Acesso em: mai. 2023.

BODIGA, Vijaya Lakshmi *et al.* Zinc Dyshomeostasis in Cardiomyocytes after Acute Hypoxia/Reoxygenation. **Biological Trace Element Research**, p. 117-129, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12011-017-0957-7>. Acesso em: mai. 2023.

Choueiri, T; Kaelin, W. Targeting the HIF2–VEGF axis in renal cell carcinoma. **Nature Medicine**, n. 26, p.1519-1530, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-1093-z#citeas>. Acesso em: out.2022.

DONG, Xiao *et al.* HZIP1 that is down-regulated in clear cell renal cell carcinoma is negatively associated with the malignant potential of the tumor. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, p. 885-892, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1078143914000854>. Acesso em: mai. 2023.

E., Bashandy Samir A. *et al.* Efficacy of zinc oxide nanoparticles on hepatocellular carcinoma-induced biochemical and trace element alterations in rats. **Journal Of Applied Pharmaceutical Science**, 2021. Disponível em: [https://japsonline.com/abstract.php?article\\_id=3372&sts=2](https://japsonline.com/abstract.php?article_id=3372&sts=2). Acesso em: mai. 2023.

FLEIGE, Simone; PFAFFL, Michael W.. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects Of Medicine**, p. 126-139, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098299705000944#bib27>. Acesso em: mai. 2023.

FRANKLIN, Renty B.; COSTELLO, Leslie C.. Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, p. 211-217, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1991338/>. Acesso em: mai. 2023.

GARFIELD, K; A LAGRANGE, C. **Renal Cell Cancer**. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470336/>. Acesso em: dez. 2022.

GARTMANN, Laura *et al.* Expression of zinc transporters ZIP4, ZIP14 and ZnT9 in hepatic carcinogenesis—An immunohistochemical study. **Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology**, p. 35-42, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0946672X17308295?via%3DiHub>. Acesso em: mai. 2023.

GELBARD, Amos. Zinc in Cancer Therapy Revisited. **Israel Medical Association Journal**, 2022. Disponível em: <https://www.ima.org.il/Medicine/MAJ/viewarticle.aspx?year=2022&month=04&page=258>. Acesso em: mai. 2023.

Global Cancer Observatory. Cancer tomorrow, 2023. Disponível em <https://gco.iarc.fr/tomorrow/>. Acesso em: abr. 2023.

HARA, Takafumi *et al.* Zinc transporters as potential therapeutic targets: An updated review. **Journal Of Pharmacological Sciences**, p. 221-228, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1347861321001146#:~:text=Zinc%20transporters%20localize%20on%20cell,tissues%20through%20the%20circulating%20blood>. Acesso em: abr. 2023.

HATANO, Noriyuki *et al.* HIF-1 $\alpha$  Dependent Upregulation of ZIP8, ZIP14, and TRPA1 Modify Intracellular Zn<sup>2+</sup> Accumulation in Inflammatory Synoviocytes. **International Journal Of Molecular Sciences**, p. 6349, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8231863/>. Acesso em: abr. 2023.

HENSHALL, Susan M *et al.* Expression of the zinc transporter ZnT4 is decreased in the progression from early prostate disease to invasive prostate cancer. **Oncogene**, p. 6005-6012, 2003. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1206797#citeas>. Acesso em: mai. 2023.

HOSUI, Atsushi *et al.* Long-Term Zinc Supplementation Improves Liver Function and Decreases the Risk of Developing Hepatocellular Carcinoma. **Nutrients**, n. 12, p. 13-15, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6316561/>. Acesso em: mai. 2023.

HUANG, Liping; TEPAAMORNDECH, Surapun. The SLC30 family of zinc transporters – A review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. **Molecular Aspects Of Medicine**, p. 548-560, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.008>. Acesso em: mai.2023.

HUANG, Yanqing; LIN, Daniel; TANIGUCHI, Cullen M.. Hypoxia inducible factor (HIF) in the tumor microenvironment: friend or foe?. **Science China Life Sciences**, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6131113/>. Acesso em: mai. 2023.

ISHIUCHI, Naoki et al. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells prevent renal fibrosis and inflammation in ischemia-reperfusion rats. **Stem Cell Research & Therapy**, p. 3-4, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32197638/>. Acesso em: mai. 2023.

ITO, Akira *et al.* The effects of short-term hypoxia on human mesenchymal stem cell proliferation, viability and p16INK4A mRNA expression: investigation using a simple hypoxic culture system with a deoxidizing agent. **Journal Of Stem Cells And Regenerative Medicine**, p. 25-31, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4498321/>. Acesso em: mai. 2023.

ITOI, Fumiaki *et al.* Offspring from Mouse Embryos Developed Using a Simple Incubator-Free Culture System with a Deoxidizing Agent. **Plos One**, 2012. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0047512>. Acesso em: mai. 2023

Kambe, T et al. Zinc transporters and their functional integration in mammalian cells. **J Biol Chem**, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7949119/>. Acesso em: out.2022.

Kim, H et al. Loss of Von Hippel–Lindau (VHL) Tumor Suppressor Gene Function: VHL–HIF Pathway and Advances in Treatments for Metastatic Renal Cell Carcinoma (RCC). **Int J Mol Sci**, n.18, p.9795, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8470481/>. Acesso em: out.2022.

KIMURA, T; KAMBE, T. The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: an overview and perspective. **Int J Mol Sci**, n. 17, p. 336-364, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4813198/>. Acesso em: set.2022.

LEHVY, Adrian Israel *et al.* Alterations in ZnT1 expression and function lead to impaired intracellular zinc homeostasis in cancer. **Cell Death Discovery**, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6851190/>. Acesso em: abr. 2023.

LI, Yue et al. Hypoxia and the Tumor Microenvironment. **Technol Cancer Res Treat**, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8358492/>. Acesso em: abr. 2023.

Liu, L et al. Functional significance of erythropoietin in renal cell carcinoma. **BMC Cancer**, v.13. n.14, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3554558/>. Acesso em: set.2022.

LIU, Lilong *et al.* SLC39A8/Zinc Suppresses the Progression of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. **Frontiers In Oncology**, v. 11, p. 1-2, 25, 2021. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.651921/full>. Acesso em: mai. 2023.

MAFRA, Denise; COZZOLINO, Sílvia Maria Franciscato. Importância do zinco na nutrição humana. Scielo, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rn/a/CCfqTxXzvTGzsdYQh7hCMzy/?lang=pt>. Acesso em: abr. 2023.

MAS, Bezerra *et al.* Effectiveness of Hypoxia-Induced Accumulation of Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Medicine Journal**, p. 13-23, 2020. Disponível em: <https://www.tridhascholars.org/pdfs/effectiveness-of-hypoxia-induced-accumulation-of-cancer-stem-cells-in-head-and-neck-squamous-cell-carcinoma-CMJ-S1-1003.pdf>. Acesso em: mai. 2023.

MASOUD, G; LI, W. HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*, v. 5, n. 5, p. 378-389, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4629436/>. Acesso em: 26 out. 2020.

MATTIA, Miriam di *et al.* Insight into Hypoxia Stemness Control. **Cells**, p. 21-56, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8394199/>. Acesso em: mai. 2023.

MOGHADDAM, Amin Boroumand *et al.* Eco-Friendly Formulated Zinc Oxide Nanoparticles: induction of cell cycle arrest and apoptosis in the mcf-7 cancer cell line. **Genes**, p. 281, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5664131/>. Acesso em: mai. 2023

Morais, C et al. Functional significance of erythropoietin in renal cell carcinoma. **BMC Cancer**, n.13, p.14, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3554558>. Acesso em: out.2022.

MUÑOZ-SÁNCHEZ, Jorge; CHÁNEZ-CÁRDENAS, María E.. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. **Journal Of Applied Toxicology**, 2018. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jat.3749>. Acesso em: abr. 2023.

NASCIMENTO FILHO, Carlos Henrique Viési do. **Efeito da hipóxia sobre o acúmulo de células-tronco tumorais em câncer de cabeça e pescoço**. 2018. 69 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2018. Disponível em: [https://bdtd.famerp.br/bitstream/tede/421/2/CarlosHenriqueVi%C3%A9sidoNascimentoFilho\\_tese.pdf](https://bdtd.famerp.br/bitstream/tede/421/2/CarlosHenriqueVi%C3%A9sidoNascimentoFilho_tese.pdf). Acesso em: out. 2022.

NASCIMENTO-FILHO, Carlos H. V. et al. Hypoxic niches are endowed with a protumorigenic mechanism that supersedes the protective function of PTEN. *The Faseb*, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6894060/>. Acesso em: jun. 2023.

Observatório de Oncologia. Indicadores da oncologia, óbitos, 2023. Disponível em <https://observatoriodeoncologia.com.br/indicadores-da-oncologia/> . Acesso em: abr. 2023.

OGBODU, Racheal O. *et al.* Photodynamic therapy of hepatocellular carcinoma using tetra-triethyleneoxysulfonyl zinc phthalocyanine as photosensitizer. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B**, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134420303651?via%3Dihub>. Acesso em: mai. 2023.

PANDEY, J; SYED, W. **Renal Cancer**. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558975/>. Acesso em: set.2023.

Prasad AS; Bao B; Beck FW; Kucuk O; Sarkar FH. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic Biol Med*, n. 37, p. 1182-90. 2004. Acesso em: jun.2023.

RINDERKNECHT, Helen *et al.* The Art of Inducing Hypoxia. **Oxygen**, p. 46-61, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-9801/1/1/6>. Acesso em: mai. 2023.

SHIVA, Niharika *et al.* Renal ischemia/reperfusion injury: an insight on in vitro and in vivo models. **Life Sciences**, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32534037/>. Acesso em: mai. 2023.

Teixeira, S *et al.* Identification of appropriate housekeeping genes for gene expression studies in human renal cell carcinoma under hypoxic conditions. **Mol Biol Rep**, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35277789/>. Acesso em: out.2022.

WANG, Jie *et al.* Zinc dysregulation in cancers and its potential as a therapeutic target. **Cancer Biology & Medicine**, p. 612-625, 2020. Disponível em: <https://www.cancerbiomed.org/content/17/3/612>. Acesso em: abr. 2023.

WU, Lang *et al.* Zinc transporter genes and urological cancers: Integrated analysis suggests a role for ZIP11 in bladder cancer. **Tumour Biol**, p. 1431-1437, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4607554/>. Acesso em: abr. 2023.

ZHAO, Ningning *et al.* The Tumor Suppressor, P53, Decreases the Metal Transporter, ZIP14. **Nutrients**, p. 1335, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5748785/>. Acesso em: mai. 2023.

ZHANG, Xiaoyi; CHEN, Ling. Effects of CoCl<sub>2</sub>-simulated hypoxia on the expression levels of matrix metalloproteinases in renal adenocarcinoma cells and renal tubular epithelial cells. *Experimental And Therapeutic Medicine*, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6090308/>. Acesso em: mai. 2023.

---

---

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000  
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908  
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil  
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.**

---

---