

A DIETA DO MANGANÊS: ESTUDANDO A BIODISPONIBILIDADE DO MANGANÊS NA PROGRESSÃO DO CÂNCER EM MODELO CELULAR

Autoras : Júlia Tavares Moreira (aluna), Déborah A. de A. Carneiro, Isabella C. A. dos Santos (coorientadoras), Mariana P. Stelling (orientadora)
Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia do Rio de Janeiro, *Campus* Rio de Janeiro, Rio de Janeiro
julia.tavares.etm2022.2@gmail.com

INTRODUÇÃO

Os metais divalentes como o manganês (Mn) promovem a ativação das integrinas, moléculas de superfície responsáveis pela sobrevivência, adesão e migração celular, levando a maior taxa de invasividade tumoral. Em estudos anteriores, foi demonstrado que animais portadores de tumor apresentam uma distribuição diferenciada do elemento manganês no organismo, o que pode indicar uma possível modulação do manganês pelo tumor. Nesses estudos realizados, camundongos foram

foram alimentados com a dieta reduzida ou suplementada em manganês, de acordo com os limites inferior e superior recomendados. Os animais alimentados com a ração suplementada em manganês apresentaram crescimento tumoral compatível com o grupo controle, enquanto os animais alimentados com a dieta reduzida em manganês apresentaram volume tumoral significativamente menor do que o grupo alimentado com a ração suplementada.

Hipótese

Nossa hipótese é a de que tumores humanos, se privados de manganês através de dietas específicas, teriam uma evolução mais lenta, assim melhorando as chances de tratamento e sobrevivência dos pacientes.

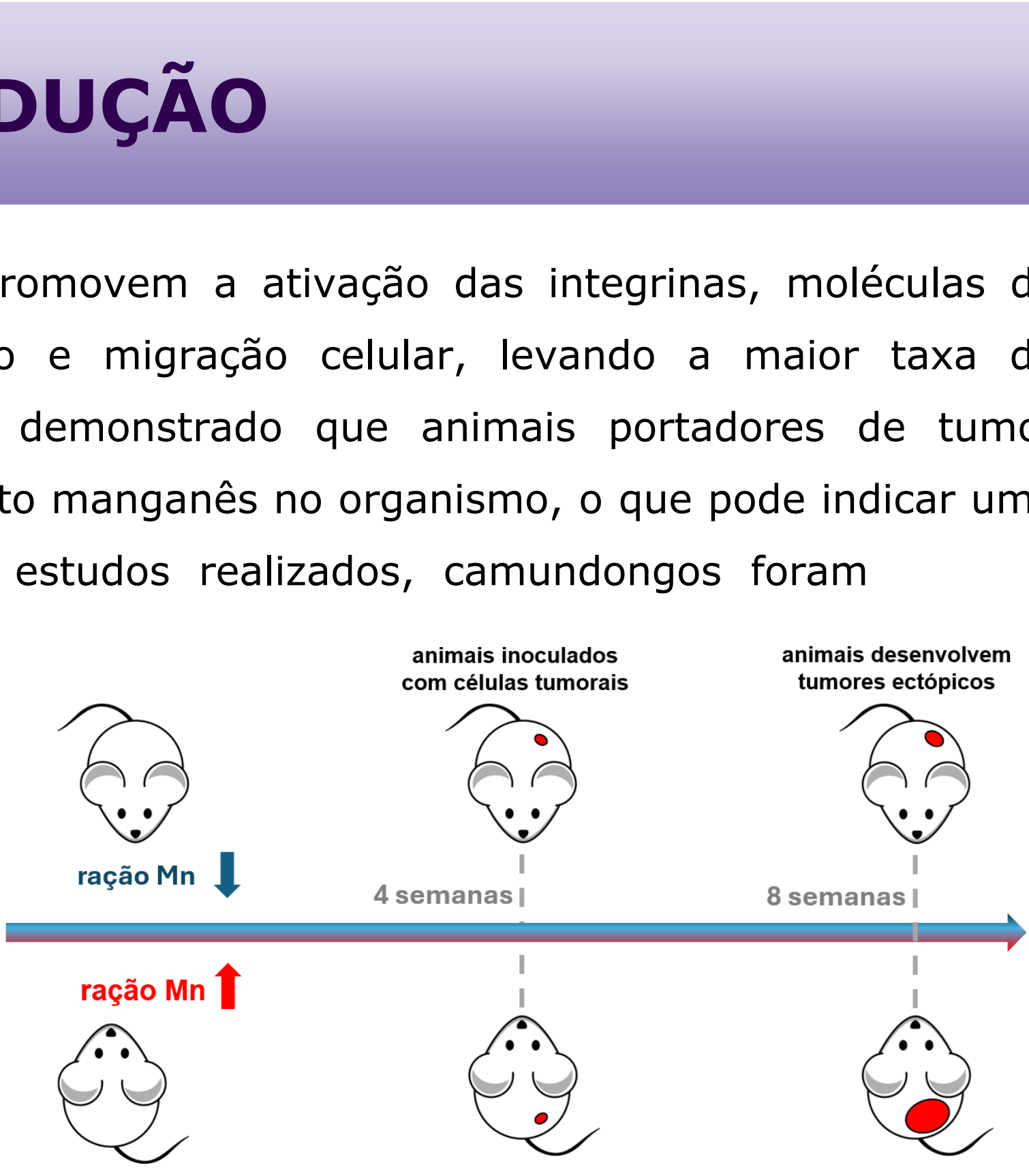


Figura 1. Modelo animal de progressão tumoral em que camundongos receberam dietas com conteúdo manipulado de manganês. Fonte: Mariana Stelling, adaptado por Júlia Moreira.

Objetivo

O principal objetivo deste projeto é modelar *in vitro* a evolução de tumores humanos em modelo 2D e 3D de cultivo de linhagens celulares tumorais humanas para avaliar se condições de privação de manganês podem frear essa evolução.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de células

As células utilizadas neste projeto até o momento são as linhagens tumorais LLC (carcinoma pulmonar de Lewis murino), HeLa (carcinoma cervical humano), T98G (glioblastoma humano) e Vero (epitélio renal de primata). As células são cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, incubadas a 37°C em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ para tamponamento de pH (sistema bicarbonato). As células são passadas com tripsina ou por raspagem, conforme o procedimento a ser realizado. As células são mantidas em cultivo durante os experimentos e criopreservadas em tanque de nitrogênio (a -196°C) para armazenamento. Figura: Estudante executando procedimentos na cabine de segurança biológica. Fonte: Déborah Carneiro.

Preparo dos meios de cultura modificados

Os meios de cultura modificados foram preparados a partir de meio basal DMEM alta glicose suplementado com soro fetal bovino parcialmente depletado ou suplementado com manganês – **o soro fetal bovino é a fonte de manganês da formulação final de meios de cultura**. Os soros modificados foram preparados conforme Stelling et al, 2021, a partir de soro de mesmo lote, e todos passaram pelo tratamento com resina catiônica ativada 50Wx4 para remoção de cátions. Então, cada soro foi reconstituído com todos os cátions removidos, com exceção do manganês, que foi readicionado em níveis padrão no soro controle, reduzido a 30% do controle no soro reduzido e elevado a 300% no soro suplementado. Os sais utilizados na reconstituição dos soros foram CaCl₂, FeCl₂, KCl, NaCl e ZnCl₂. Então, os soros foram filtrados com a utilização de filtros 0,22µm para garantir sua esterilidade. Figura: Esquema de funcionamento da resina catiônica. Fonte: autoria própria.

Formação de esferoides tumorais por hanging drop

As células tumorais foram dissociadas com tripsina, ressuspensas em meio de cultura padrão e quantificadas. Então, a concentração de células foi ajustada para 5x10⁴ células/mL e, então, gotas de 50 µL foram aplicadas sobre a tampa de placas de cultivo de 100 mm em condições estéreis. Após 48 horas na condição de gotas suspensas, os agregados formados foram transferidos para placas de cultivo de ultra baixa adesão. O crescimento dos esferoides foi acompanhado por 5 dias, registrado por fotografia. Os esferoides foram medidos e a área das esferas foi utilizado como parâmetro de proliferação celular em cultivo 3D. Figura: Imagens do procedimento de formação dos esferoides por *hanging drop*. Fonte: Mariana Stelling.

Espectroscopia de emissão ótica por plasma acoplado induzido (ICP-OES)

O meio de cultivo foi analisado na Central Analítica Pe. Leopoldo Heinberger (CAPLH) na Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio). Lá, as amostras de meio de cultivo foram diluídas 4x em água Milli-Q. Essa estratégia foi adotada para reduzir a concentração de sódio na amostra em análise, que poderia interferir ao saturar o detector. A quantificação multi-elementar foi realizada por ICP-OES (Perkin Elmer Optima 7300 DV) através de uma curva-padrão dos mesmos elementos. Figura: Equipamento de ICP-OES utilizado no estudo. Fonte: autoria própria.

Ensaios de viabilidade celular por MTT

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (2*10⁴ células/poço) e cultivadas por 24 horas em seus respectivos meios experimentais. Após a adesão, foi adicionado às células o MTT (ácido tetrazólio) em concentração adequada para cada tipo celular e as células foram incubadas por 45 minutos a 1 hora (o tempo também será adequado para cada tipo celular). Em seguida, o meio de cultura foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em 100µL de DMSO (dimetilsulfóxido). A placa foi, então, levada para leitura no leitor de microplaca no comprimento de onda de 570 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em porcentagem da viabilidade celular utilizando-se o controle como 100% de viabilidade.

Ensaios de expansão clonal

As células foram plaqueadas em ultrabaixa densidade (5,0x10² células/poço em placas de 35 mm) e cultivadas nas diferentes condições experimentais: em meio controle, reduzido ou suplementado com manganês. Então, as células foram mantidas em cultura por sete a quatorze dias contados a partir do inoculo. Ao fim do ensaio, as células foram fixadas em etanol absoluto e coradas em solução 1:15 cristal violeta (Merck 111885/1) em etanol absoluto. As placas foram fotografadas com auxílio de uma mesa iluminadora e as colônias contadas com auxílio do software *ImageJ*. O percentual de sobrevivência celular foi calculado como o percentual do número de colônias das condições experimentais em comparação com o número de colônias do controle. Figura: Registro de uma placa de expansão clonal após coloração com cristal violeta para quantificação das colônias. Fonte: autoria própria.

Ensaios de cicatrização

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços (2,5*10⁵ células/poço) e cultivadas por 48h a 72h até que alcançassem entre 80% e 90% de confluência. Então, uma abertura em formato de cruz foi raspada em cada poço de forma a simular a "cicatriz". Então, os meios de cultura e o *debris* celular resultante da raspagem de cada poço foram removidos, e aos poços foram adicionados os meios manipulados. Então, o centro de cada poço (onde se observa o centro da cruz) foi fotografado em microscópio e as placas foram incubadas por 18h. Ao final do período o centro da cruz de cada poço foi registrado novamente. As imagens foram analisadas no *software ImageJ* onde fez-se a medição das distâncias em 0h e 18h. Então, os valores adquiridos foram utilizados para a quantificação do percentual da distância migrada. As análises são feitas de forma pareada para evitar que variações nas dimensões da área raspada entre poços interfiram na análise final.

REFERÊNCIAS

LYMBURNER, S. et al. Zinc inhibits magnesium-dependent migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells on fibronectin. **The Journal of nutritional biochemistry**, 28 set. 2012.

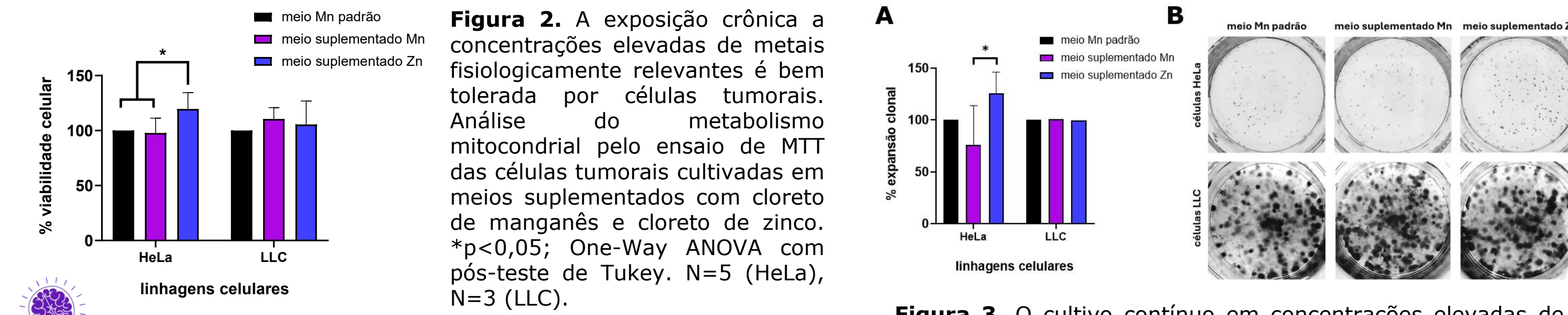
STELLING, Mariana Paranhos et al. Manganese systemic distribution is modulated in vivo during tumor progression and affects tumor cell migration and invasion in vitro. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 15833, 4 ago. 2021.

Salles S, Salles R, Pavão MSG, Cardoso SC, Stelling MP. Elemental profiles in distant tissues during tumor progression. *BMC Cancer*. 2023 Apr 6;23(1):322. doi: 10.1186/s12885-023-10782-w. PMID: 37024796; PMCID: PMC10080929.

Preprint: Santos ICA, Silva CAP, Carneiro DAA, Rocha AM, Pérez CA, Cardoso SC, Stelling MP. Modelling the tumor metallome in vitro reveals manganese as a unique tumor-promoting element. *Biorxiv*. 2025 Sep 18. doi: https://doi.org/10.1101/2025.09.15.676369

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Células tumorais cultivadas continuamente em meio de cultura suplementado com manganês não apresentam sinais de sofrimento ou morte celular



O cultivo em concentrações elevadas de Mn não parece afetar profundamente as células tumorais. Trabalhos anteriores do grupo levam à hipótese de que mecanismos de adaptação, tais como a regulação gênica de transportadores de metais e seleção natural de células mais aptas ao ambiente de Mn elevado levem a esse cenário.

A privação ou suplementação de manganês parece apresentar efeitos distintos sobre as linhagens de células tumorais e sadias em modelos 2D (monocamada celular) e 3D (esferoides celulares)

Tabela 1. Quantificação dos elementos presentes no soro fetal bovino por ICP-OES

Soro fetal bovino	Elementos analisados no soro fetal bovino*						
	S (mM)	P (mM)	Na (mM)	Mn (µM)	K (mM)	Fe (µM)	Cu (µM)
Controle	19,7 ± 0,3	3,9 ± 0,1	148,3 ± 3,7	0,6 ± 0,02	12,2 ± 0,3	47,3 ± 1,3	2,4 ± 0,05
Pós-resina	19,6 ± 0,3	3,7 ± 0,1	110,5 ± 4,4	0,1 ± 0,004	7,8 ± 0,3	48,6 ± 1,7	7,7 ± 0,3
Reconstituído Mn reduzido	19,8 ± 0,1	13,4 ± 0,5	143,8 ± 6,6	0,1 ± 0,02	17,4 ± 0,8	48,7 ± 1,7	7,7 ± 0,3
Reconstituído Mn padrão	20,3 ± 0,7	13,7 ± 0,6	146,5 ± 7,5	0,5 ± 0,01	17,8 ± 0,8	49,7 ± 2,8	7,8 ± 0,4
Reconstituído Mn elevado	21,2 ± 0,7	14,1 ± 0,6	150,2 ± 7,7	7,0 ± 0,01	18,2 ± 0,9	51,5 ± 2,1	8,0 ± 0,3

*Análise realizada em triplicata técnica. Valores representados como: média ± desvio padrão.

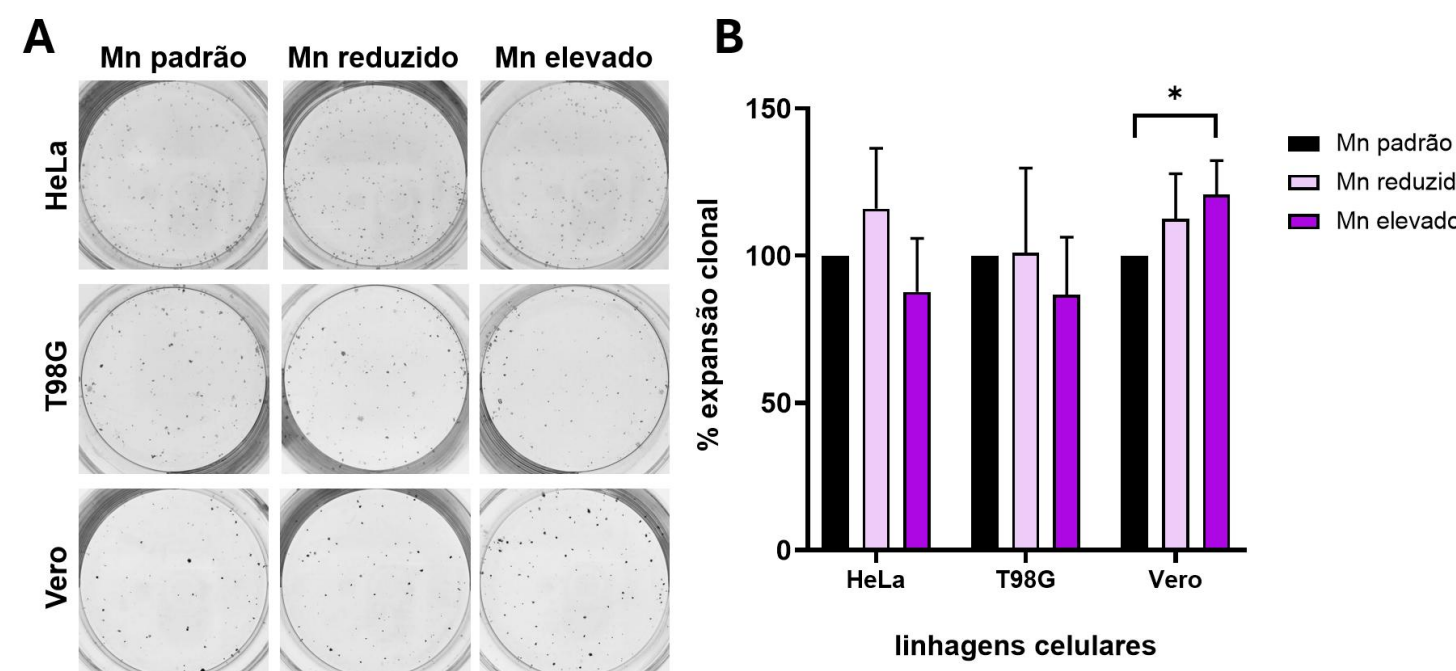


Figura 5. Ensaio de expansão clonal das linhagens celulares nos meios produzidos com soros manipulados. (A) Imagens representativas das colônias de células formadas em cada condição experimental. HeLa (N=3), T98G (N=5) e Vero (N=5). (B) Quantificação das colônias, valores normalizados pelo controle (considerado como 100%).

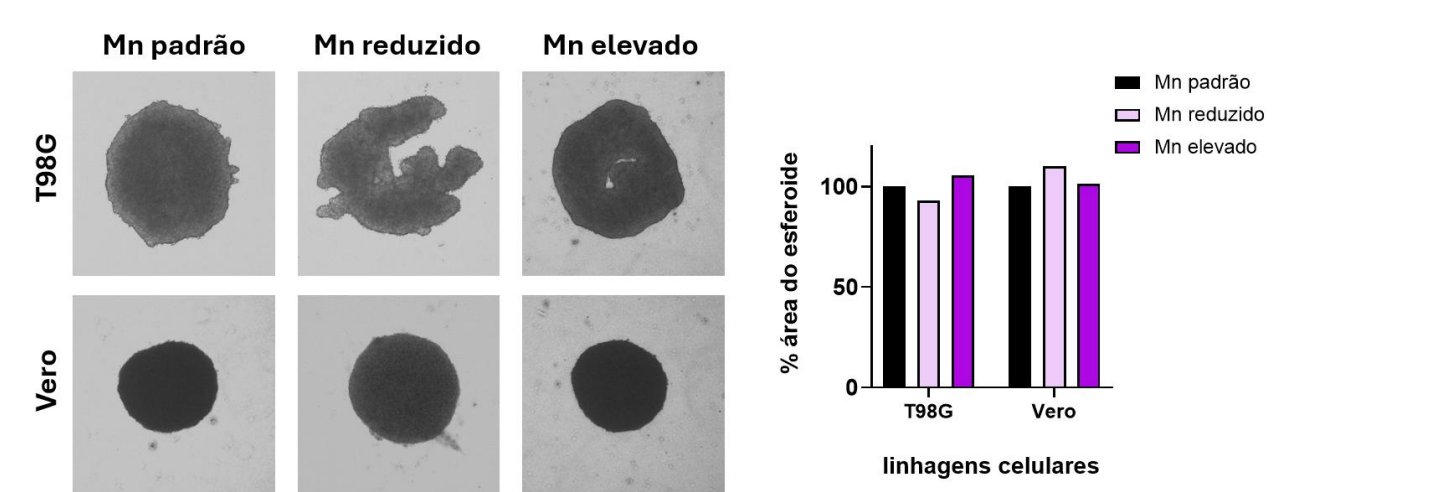


Figura 7. Ensaio de formação de esferoides celulares pelo método do *hanging drop*. As linhagens T98G e Vero formaram esferoides que foram mantidos por 5 dias em cultivo nos meios manipulados. Os esferoides foram fotografados no dia 0 e no dia 5 e a diferenças de área de cada esferoide foi utilizada para acompanhar variações do crescimento. N=1 (réplica realizada com 12 esferoides de cada condição, os valores plotados equivalem à média desses 12 esferoides).

Alimentos de uma mesma categoria, como variações de arroz, podem influenciar fortemente na ingestão diária de manganês de um indivíduo



Figura 8. Diferentes variedades de arroz foram pesadas e cozidas em água ultrapura, maceradas e o sobrenadante analisado por ICP-OES.

	Elementos analisados (em µM)							
	S	Zn	P	Na	Mn	K	Fe	Cu
arroz branco	99,3 ± 4,9	1,7 ± 0,1	118,7 ± 7,1	71,0 ± 48,5	1,3 ± 0,1	1259,0 ± 79,4	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,03
arroz integral	167,8 ± 16,2	1,8 ± 0,2	1965,0 ± 233,4	67,6 ± 12,0	3,3 ± 0,7	3522,8 ± 424,2	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,03
arroz vermelho	221,6 ± 8,1	2,4 ± 0,6	2036,9 ± 270,9	71,0 ± 13,6	5,1 ± 2,1	3341,9 ± 160,6	0,2 ± 0,03	0,4 ± 0,07

*Análise realizada em triplicata técnica. Valores representados como: média ± desvio padrão.

A escolha de alimentos com base em seu conteúdo médio de manganês pode ser uma estratégia promissora para pacientes oncológicos.

Tabela 2. Quantificação dos elementos presentes nas variações de arroz por ICP-OES.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O cultivo de linhagens tumorais em modelo 3D e em meios manipulados com concentrações elevadas e reduzidas dos metais de relevância fisiológica, em especial o manganês, é um modelo viável de estudo que vem mostrando evidências robustas de estar alinhado com as pesquisas em modelo animal.

Perspectivas

- Completar os Ns experimentais ainda em aberto de todas as linhagens em modelo 2D e 3D;
- Analisar a proliferação celular pela quantificação de marcadores por citometria;
- Analisar o manganês intracelular das linhagens cultivadas nos meios manipulados em modelo 2D e 3D;
- Acompanhar o crescimento dos esferoides tumorais por períodos mais longos de tempo.

APOIO E AGRADECIMENTOS

Agradecemos às agências de fomento que forneceram apoio financeiro para a aquisição de insumos e pagamento de bolsas de Iniciação Científica tão relevantes para o avanço do projeto: CAPES, FAPERJ, CNPq, Fundação do Câncer e LNLS. Também agradecemos aos colaboradores que se comprometeram em auxiliar nas futuras fases do projeto: PUC-Rio (LABSpectro) e professora Simone Cardoso (IF, UFRJ). Por fim, agradecemos aos colegas e professores do Laboratório de Genética Molecular pelo suporte, apoio, discussões científicas e compartilhamento de materiais que são fundamentais para o desenvolvimento do projeto.

