COMPARAÇÃO DE PERFIS FENOTÍPICOS GERADOS POR INIBIDORES DE VIAS DE SINALIZAÇÃO E POR NANOPLÁSTICOS DE POLIESTIRENO EM HUH7

Palavras-Chave: nanoplásticos de poliestireno, perfil fenotípico, vias de sinalização

Autores(as):
Keila Lívian Pereira Coelho - IB, UNICAMP
André Lopes - IB, UNICAMP
Thaís de Moraes Lacerda - IB, UNICAMP
Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus - IB, UNICAMP

1. INTRODUÇÃO

A crescente produção e descarte de plásticos ao longo das últimas décadas têm elevado a presença de micro e nanoplásticos (MNPs) no ambiente,sendo o poliestireno (PS) um dos mais comuns (OECD, 2022; Yang, 2023). Além disso, diversos estudos detectaram a presença dessas partículas no corpo humano e mostraram que estão associadas a efeitos adversos como estresse oxidativo, inflamação e danos celulares (Zhao, 2020; Pan, 2021). No entanto, os mecanismos celulares subjacentes aos efeitos desses materiais ainda são pouco compreendidos. Diante disso, este trabalho tem como objetivo comparar os efeitos fenotípicos induzidos por nanoplásticos de poliestireno (NP-PS) em células Huh7 com aqueles provocados por inibidores de vias de sinalização celular específicas, buscando inferir vias possivelmente moduladas pelo plástico com base em similaridades fenotípicas.

2. METODOLOGIA

2.1. Caracterização Físico-química dos Nanoplásticos de Poliestireno (NP-PS)

Para caracterizar o índice de polidispersão e o diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas de poliestireno (Spherotech, 0.7-0.9µm, 5,0% w/v, PP-008-10), utilizamos a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). Para isso utilizamos o instrumento ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern, Reino Unido). A solução estoque das nanopartículas de plástico (1g/L) foi diluída na proporção 1:10 em água ultrapura ou em DMEM suplementado (10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina), na presença de 0,0025% de Tween 20, nas condições de incubação em estufa de atmosfera umidificada, a 5% de CO_2 e 37ºC, nos tempos 0, 24h, 48h e 7 dias. A análise dos dados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.0.1, La Jolla, Califórnia, EUA).

2.2. Cultura celular e plaqueamento

As células da linhagem Huh7 (hepatocarcinoma humano), foram cultivadas utilizando meio DMEM *low glucose* (Gibco, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich, Brasil) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Pen/Strep) (Gibco, Alemanha). As células foram incubadas em estufa, a 5% de CO_2 e 37ºC, em atmosfera umidificada, e a passagem foi realizada a cada 48 horas. A cada descongelamento de células realizou-se um teste de micoplasma, no qual as células ficam três dias em meio DMEM suplementado sem antibióticos e utiliza-se o Hoechst 33342 para coloração direta de DNA, que é verificado por microscopia de fluorescência no equipamento Cytation 5, BioTek Instruments, Inc., visando garantir a integridade e a ausência de contaminações na cultura celular utilizada nos experimentos. Para os ensaios, as células foram plaqueadas na densidade de $1x10^5$ células/mL em placas de 96 poços (Corning Incorporated, 3599 Costar, USA) e incubadas por 24 horas.

2.3. Exposição das células aos nanoplásticos de poliestireno

Após 24 horas, as células foram expostas a diferentes concentrações de NP-PS 70nm (Spherotech Inc., Libertyville, IL, código: PP-008-10) num intervalo entre 1ng/L a 500mg/L, que inclui concentrações ambientalmente relevantes: 1ng/L, 1µg/L e 1mg/L (Senathirajah et al., 2021), bem como concentrações mais altas (10mg/L, 100mg/L e 500mg/L). Para estabilização das nanopartículas no meio de cultura suplementado, adicionou-se também 0,0025% de Tween 20, que foi utilizado como controle de veículo. As células plaqueadas foram incubadas nas mesmas condições apresentadas no item 2 por 24 horas.

2.4. Exposição das células aos inibidores de vias de sinalização

24 horas após o plaqueamento, as células foram expostas a três concentrações distintas de cada inibidor: LY-2109761 (5 µM, 10 µM e 20 µM), SIS3 (1 µM, 2 µM e 4 µM), KU-0063794 (1 µM, 3 µM e 6 µM), Q-VD-OPh (5 µM, 10 µM e 20 µM) e Bafilomycin A1 (100 nM, 500 nM e 1 µM) – por um período de 24 horas de incubação. Para o tratamento das células, os inibidores foram diluídos no momento de uso em meio de cultura DMEM suplementado, de forma a atingir as concentrações desejadas. As células plaqueadas foram incubadas nas mesmas condições apresentadas no item 2.1 por 24 horas.

2.5. Ensaio de redução do MTT

Para realizar o ensaio de redução do MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (VWR Life Science), após 24h adiciona-se 10µL de solução-estoque de MTT (5mg/ml) e as células são incubadas por 2 horas. Após o período de incubação, a solução de MTT foi retirada e, em cada poço, os cristais de Formazan foram solubilizados com 100µL de DMSO (LabSynth, Brasil), sob agitação por 10 minutos a 150 rpm. Então, a absorbância de cada poço foi medida no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) em λ=570 nm (Ghasemi, 2021; Mosmann, 1983). A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o software GraphPad Prism (versão 8.0.1, La Jolla, Califórnia, EUA) e os valores foram expressos em porcentagem relativa ao controle negativo.

2.6. Ensaio *Live Cell Painting*

Após o período de exposição das células às diferentes concentrações de NP-PS e aos compostos moduladores de via após 24h nas seguintes concentrações: LY-2109761 (20 µM), SIS3 (4 µM), KU-0063794 (1 µM), Q-VD-OPh (20 µM) e Bafilomycin A1 (1 µM) –, as células foram marcadas com 50 µL/poço de Laranja de Acridina (Acridine Orange, AO; Sigma-Aldrich, USA) diluído em FluoroBrite na concentração de 20 µM. As células então foram incubadas por 10 minutos a 37°C e 5% de CO_2. Após este tempo, a solução de Laranja de Acridina foi substituída por 50 µL de FluoroBrite. As imagens foram adquiridas pelo Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA), utilizando os filtros GFP (EX 469/35 nm, EM 525/39 nm, espelho dicróico 497 nm, LED 465 nm) e PI (EX 531/40 nm, EM 647/57 nm, espelho dicróico 605 nm, LED 523 nm).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. As NP-PS apresentaram maior estabilidade coloidal em água que em meio suplementado

NP-PS	PDI ± SD	Zeta Potential ± SD
Água (0h)	0,05 ± 0,02	-53,26 ± 2,28
Água (7 dias)	0,03 ± 0,02	-29,17 ± 0,51
Meio + Tween + FBS (0h)	0,53 ± 0,10	-8,82 ± 1,68
Meio + Tween + FBS (7 dias)	0,72 ± 0,07	-18,93 ± 1,66

Tabela 1. Valores de PDI e Potencial Zeta obtidos a partir da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).

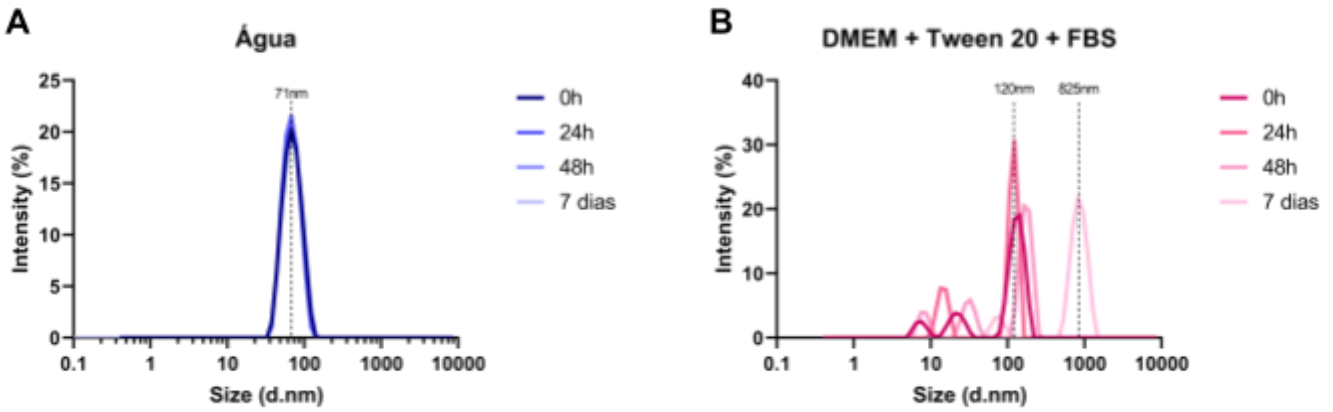

Fig 1. Caracterização das nanopartículas de plástico (NPP). As nanopartículas de plástico foram diluídas na proporção de 1:10 a partir da solução estoque 1mg/mL em água ultrapura e em meio DMEM suplementado com 0,0025% de Tween 20. Nessas soluções, foram analisados o índice de polidispersão, o diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta. As medições foram realizadas em quatro momentos: 0h, 24h, 48h e 7 dias. Cada valor representa a média de três leituras independentes (n = 3) obtidas no ZetaSizer Nano ZS90. Os gráficos mostram o tamanho hidrodinâmico das NPP em água (A) e no meio suplementado (B). O nível de significância utilizado foi de * = $P \leq 0.03$ e *** = $P \leq 0.0001$, de acordo com o teste T.

As nanopartículas de plástico (NP-PS) demonstraram maior estabilidade, mantendo o diâmetro hidrodinâmico constante de 71 nm (Fig 1A). Já quando expostas a meio DMEM suplementado com 10% de FBS, o tamanho médio das NP-PS variam, apresentando uma agregação progressiva que aumenta de 120 nm para 825 nm após 7 dias de exposição (Fig. 1B). Além disso, análises do potencial zeta e do índice de polidispersão das partículas também corroboram esses achados, em água os valores do PDI são menores que 0,05 e o potencial zeta entre -53,26 e 29,17 mV, já em DMEM suplementado, o potencial zeta apresenta valores entre -8,82 e -18,93mV e o PDI fica acima de 0,5 (Tabela 1), apontando assim uma maior instabilidade das nanopartículas quando inseridas no meio.

3.2. Células Huh7 tratadas com NP-PS apresentam alterações fenotípicas apesar de não haver redução na viabilidade celular

Estudos anteriores do grupo já mostraram que a exposição de células Huh7 a diferentes concentrações de plástico não leva à morte células Huh7, mas causa alterações sutis e subletais nestas células (da Silva, 2025). Este achado foi corroborado no presente trabalho pelos resultados do ensaio de redução do MTT (Fig 2A), que não apresentaram redução significativa da viabilidade celular na presença das nanopartículas de poliestireno. No entanto, é possível perceber uma clara alteração no perfil vesicular das células tratadas com a maior concentração de NP-PS (500mg/L; Fig. 2B), sugerindo um possível impacto em processos de tráfego intracelular. Alterações morfológicas também foram perceptíveis na menor concentração testada (1ng/L), indicando que mesmo exposições ambientalmente compatíveis podem induzir respostas celulares detectáveis, ainda que subletais. Esses achados reforçam a importância de comparar os perfis fenotípicos induzidos pelas NP-PS com aqueles gerados por inibidores de vias específicas, a fim de inferir quais mecanismos celulares podem estar sendo alterados pela exposição ao plástico.

3.3. Apesar de não reduzirem significativamente a viabilidade celular, os inibidores de vias de sinalização induzem alterações no perfil fenotípico das células Huh-7

Os resultados do ensaio de redução do MTT indicam diferença estatística (nível de significância $P \leq 0.05$ apenas para o composto KU-0063794, na maior concentração testada (6μM), em relação ao controle não-tratado (Fig. 3C). Para as concentrações que mantiveram ~80% de viabilidade, o ensaio Live Cell Painting revelou importantes mudanças no padrão fenotípico das células quando comparado com o controle (Fig. 2F), especialmente no padrão vesicular dos inibidores da via do TGF-Beta, LY-2109761 e SIS3, e na morfologia nuclear e citoplasmática do inibidor de autofagia e atividade

lisossomal, Bafilomicina-A1. Esses resultados demonstram que os inibidores induzem efeitos fenotípicos distintos e funcionais, que servirão como referência para a comparação com células tratadas com NP-PS, visando inferir possíveis vias de sinalização afetadas pelo plástico.

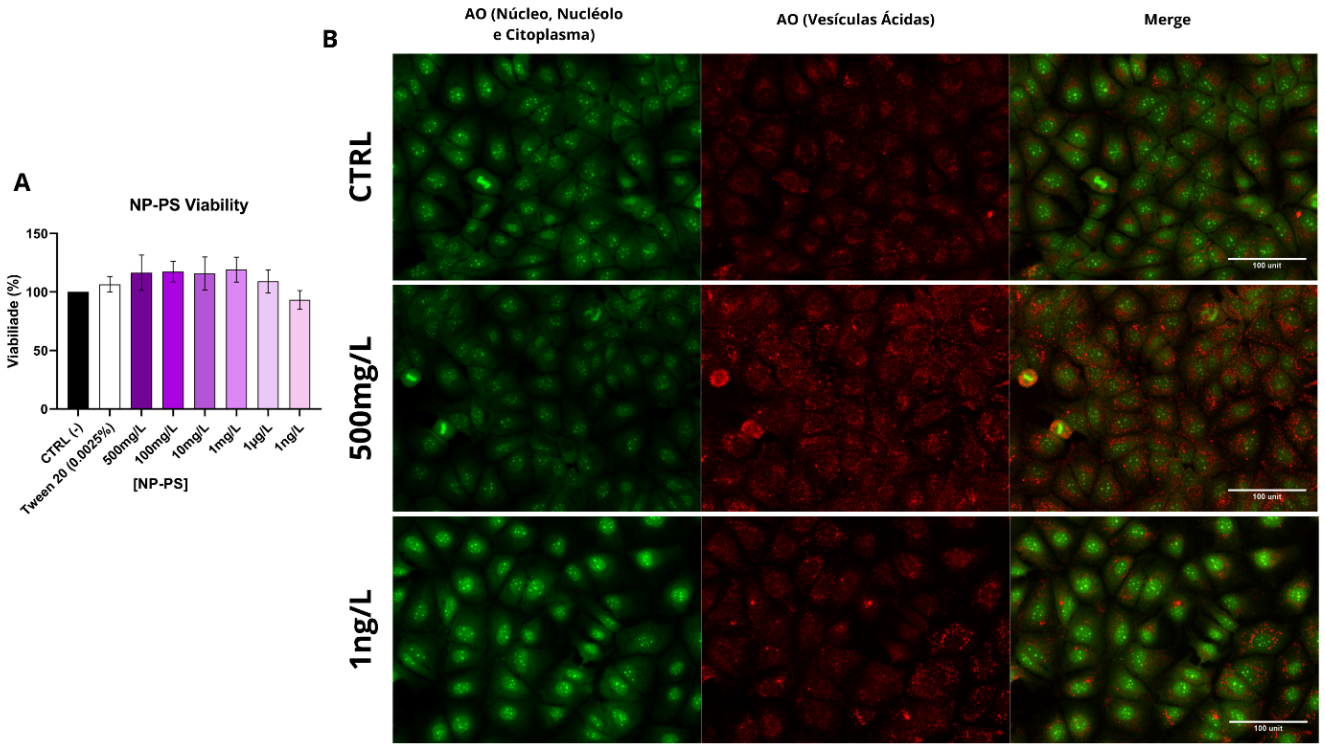

Fig. 2. Viabilidade celular e *Live Cell Painting* de células Huh7 expostas à NP-PS. As células foram plaqueadas a $1x10^5$ células/mL em placas de 96 poços e expostas diferentes concentrações de NP-PS e incubadas por 24 horas. Para o ensaio de redução do MTT (A), após o período de incubação, foi adicionado 10µL de MTT (a 5mg/mL) e as células foram incubadas por 2 horas. Após este período, os cristais de Formazan foram solubilizados em 100µL de DMSO. A absorbância foi medida em 570nm no Cytation 5. O nível de significância utilizado foi de * = $P \leq 0.05$, de acordo com o teste Ordinary one-way ANOVA Multiple Comparisons. Para o ensaio *Live Cell Painting* (F), após o período de incubação, as células foram marcadas com 50µL/poço de Laranja de Acridina na concentração de 20µM. As células então foram incubadas por 10 minutos. Após este tempo a solução de Laranja de Acridina foi substituída por 50µL de FluoroBrite. As imagens foram adquiridas pelo Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que o comportamento das nanopartículas de poliestireno (NP-PS) varia significativamente com o meio em que estão inseridas, apresentando maior estabilidade em água do que em meio suplementado, apontando para a formação de agregados. Por outro lado, as NP-PS promovem alterações fenotípicas sutis, especialmente no padrão vesicular das células Huh7, mesmo que em concentrações mais baixas, embora não causem redução significativa na viabilidade das células Huh7. Além disso, os inibidores específicos de vias de sinalização também são capazes de induzir mudanças fenotípicas distintas em concentrações subletais (~80% da viabilidade), com destaque para alterações vesiculares e morfológicas associadas a vias do TGF-β e autofagia. Sendo assim, estes resultados possibilitam a aplicação de uma abordagem fenotípica comparativa, potencialmente capaz de revelar os mecanismos celulares acionados pela exposição a nanoplásticos.

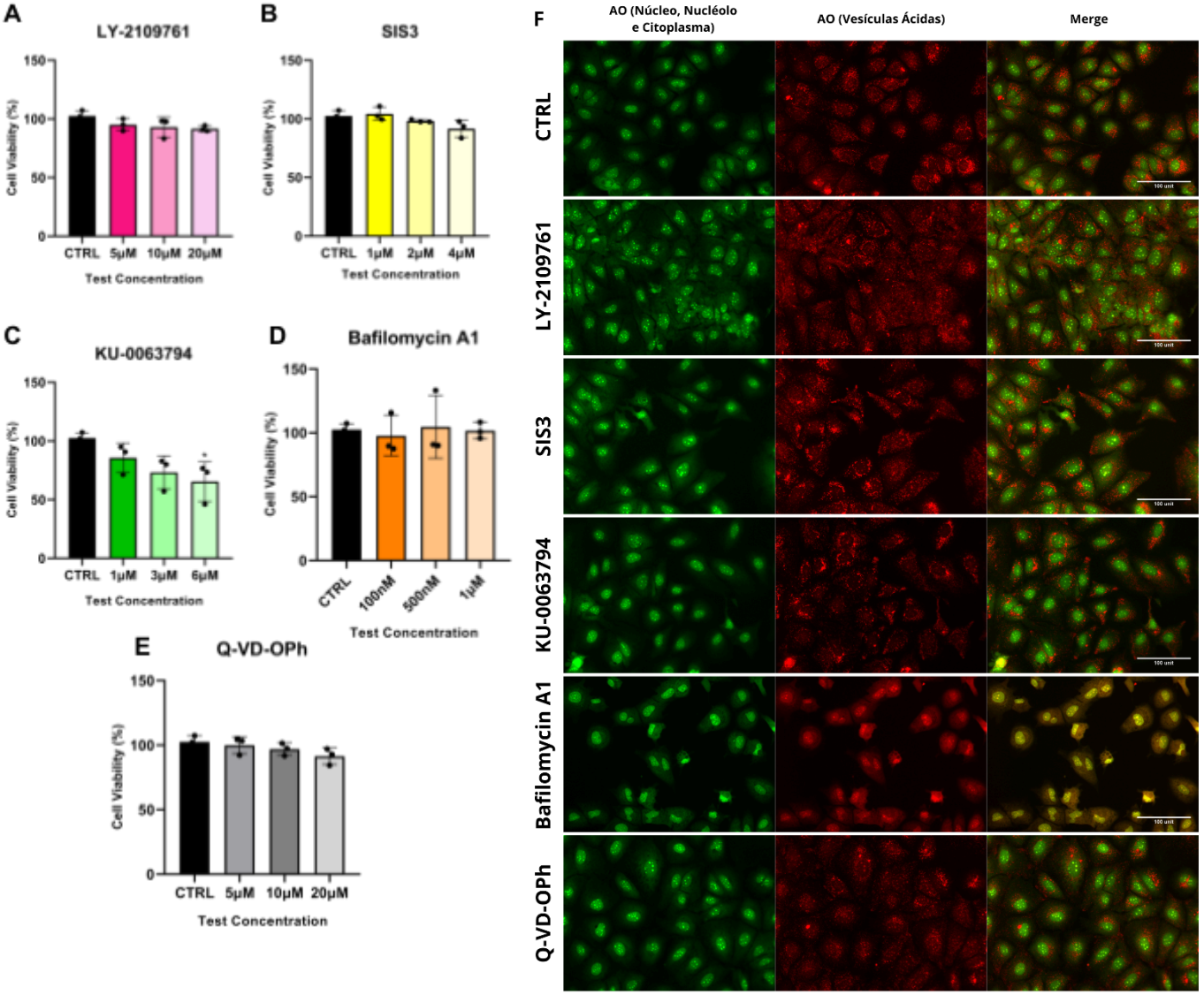

Fig. 3. Viabilidade celular e *Live Cell Painting* de células Huh7 expostas a inibidores de via de sinalização. As células foram plaqueadas a $1x10^5$ células/mL em placas de 96 poços e expostas a três concentrações distintas de cada inibidor e incubadas por 24 horas. Para o ensaio de redução do MTT (A-E), após o período de incubação, foi adicionado 10µL de MTT (a 5mg/mL) e as células foram novamente incubadas por 2 horas. Após este período, a solução de MTT foi retirada e, em cada poço, os cristais de Formazan foram solubilizados em 100µL de DMSO. A absorbância foi medida em 570nm no Cytation 5. O nível de significância utilizado foi de * = $P \leq 0.05$, de acordo com o teste Ordinary one-way ANOVA Multiple Comparisons. Para o ensaio *Live Cell Painting* (F), após o período de incubação, as células foram marcadas com 50µL/poço de Laranja de Acridina na concentração de 20µM. As células então foram incubadas por 10 minutos. Após este tempo a solução de Laranja de Acridina foi substituída por 50µL de FluoroBrite. As imagens foram adquiridas pelo Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

5. BIBLIOGRAFIA

da Silva, Mariana Rodrigues. **Determination of microplastic-induced sublethal phenotypic changes in two human hepatocyte models using high-content analysis**. 2025. 1 recurso online (174 p.) *Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)*, Instituto de Biologia, Campinas, SP. Disponível em: 20.500.12733/31598. Acesso em: 15 jul. 2025.

Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. **The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis**. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 26;22(23):12827. doi: 10.3390/ijms222312827. PMID: 34884632; PMCID: PMC8657538.

Mosmann T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. PMID: 6606682.

OECD. Global Plastics Outlook: Economic Drivers, Environmental Impacts and Policy Options. OECD Publishing. Paris. 2022. https://doi.org/10.1787/de747aef-en.

Pan, L., Yu, D., Zhang, Y., Zhu, C., Yin Q., Hu, Y., Zhang, X., Yue, R., Xiong, X. Polystyrene microplastics-triggered mitophagy and oxidative burst via activation of PERK pathway. Sci Total Environ. 2021 Aug 10. 781:146753. ISSN 0048-9697. doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146753.

Yang, Z., DeLoid, G. M., Zarbl, H., Baw, J., Demokritou, P. Micro- and nanoplastics (MNPs) and their potential toxicological outcomes: State of science, knowledge gaps and research needs. NanoImpact. Volume 32. 2023. 100481. ISSN 2452-0748. https://doi.org/10.1016/j.impact.2023.100481.

Zhao Y, Bao Z, Wan Z, Fu Z, Jin Y. Polystyrene microplastic exposure disturbs hepatic glycolipid metabolism at the physiological, biochemical, and transcriptomic levels in adult zebrafish. Sci Total Environ. 2020 Mar. 25;710:136279. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.136279. Epub 2019 Dec 27. PMID: 31918190.