

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NANOPLÁSTICOS EM LINHAGENS CELULARES DE MAMA E SUAS IMPLICAÇÕES PARA A TERAPIA CELULAR ANTITUMORAL

Gabriela Ramiro Pinheiro¹, Larissa de Oliveira Araújo², Luan Mauro Gonçalves Ferreira², Maria Clara Pontine de Oliveira³, Eldamaria de Vargas Wolfgramm dos Santos^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal do Espírito Santo, ² Graduação em Ciências Biológicas – Universidade Federal do Espírito Santo, ³ Graduação em Biomedicina – Faculdade Multivix

RESUMO

O Brasil é considerado o quarto maior produtor de lixo plástico do mundo e aproximadamente 3% dessa produção é despejada inadequadamente no meio ambiente. Uma vez exposto às condições ambientais, esse material pode se fragmentar em pequenas partículas, conhecidas como microplásticos e nanoplásticos, que podem contaminar água, solo, ar e alimentos. Devido a sua onipresença no ambiente, os seres humanos estão constantemente expostos a essas partículas, que em razão do seu tamanho reduzido, são capazes de adentrar no corpo humano e percorrer a circulação sistêmica, sendo distribuído para uma variedade de órgãos, inclusive o tecido mamário. A depender do tamanho da partícula, esta pode internalizar na célula da mama e causar citotoxicidade, estresse oxidativo e instabilidade genômica, o que é especialmente alarmante no caso de uma célula tumoral. O objetivo do presente estudo é avaliar a citotoxicidade induzida pelos nanoplásticos nas linhagens de células de mama MCF-10A e MCF-7 por meio do ensaio de viabilidade celular MTT. Assim, as linhagens foram cultivadas e expostas ao nanoplástico de tamanho 500 nanômetros, sob seis diferentes concentrações, e nos tempos de exposição de 24h e 72h, e posteriormente foi realizado o teste de MTT. Verificou-se uma variação na viabilidade celular, com o aumento em algumas concentrações e a redução em outras, o que sugere a ocorrência do efeito hormese. Conclui-se que os nanoplásticos são capazes de afetar a viabilidade celular de células cancerígenas por meio de vias específicas ainda não esclarecidas, reforçando a necessidade de mais investigações na área. **Palavras-chave:** Nanoplástico; Câncer de Mama; Viabilidade Celular; Terapia Celular

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o quarto maior produtor de lixo plástico do mundo, com aproximadamente 11,3 milhões de toneladas, em que 3,44 milhões de toneladas tendem a serem descartadas de forma inadequada no meio ambiente. (Banco Mundial (2019); ONU (2022)). Uma vez exposto aos fatores ambientais, esses materiais plásticos podem ser fragmentados em microplásticos (tamanho menor ou igual a 5 mm) e nanoplásticos (inferiores a 1 µm) (Domenech, 2021).

Os micro e nanoplásticos podem entrar em contato com o organismo humano através de vias como ingestão, inalação e contato dérmico, por meio de água e alimentos contaminados, micropartículas suspensas no ar e componentes de produtos de uso diário (como cosméticos e maquiagens), respectivamente (Prata e colaboradores, 2020). Um estudo realizado por Senathirajah *et al.* (2021) demonstrou que uma pessoa tende a ingerir aproximadamente 0,1 a 5g de microplástico por semana, e uma vez ingeridos, podem atravessar a barreira do intestino e atingir a circulação sistêmica (Walczak *et al.*, 2015), tendo sua toxicidade dependente

principalmente do tamanho da partícula, em que quanto menor, maior a capacidade de internalização nas células. (Hwang, 2019)

Uma vez que as micropartículas plásticas são biodisponíveis para absorção na corrente sanguínea humana (Cruz, 2023), estas podem ser distribuídas em diferentes órgãos, como relata o estudo de Ragussa (2022), em que foi encontrado microplásticos no leite materno, o que indica a presença dessas partículas no tecido mamário. Ao entrar em contato com a célula, podem induzir estresse oxidativo, potencialmente resultando em dano celular (Banerjee, 2021), e uma vez que são internalizados por células tumorais, podem aumentar a instabilidade genômica e ter envolvimento na promoção de metástase, com possível piora do prognóstico da doença. (Hanahan, 2022)

Estudo realizado por Park *et al.*, 2023 demonstrou que a exposição de linhagens de célula da mama a microplásticos de diferentes tamanhos resulta em alterações no ciclo celular de linhagens cancerígenas, impulsionando a progressão do câncer, principalmente devido a secreção de citocinas inflamatórias. Além disso, foi relatado que essas partículas só podem afetar células de câncer de mama, não afetando a linhagem celular mamária normal.

Outra pesquisa exercida por Schnee e colaboradores (2024) confirmou que os microplásticos estão associados a progressão do câncer de mama, porém que seu efeito é dependente da quantidade, do tamanho das partículas e do tipo de linhagem celular utilizada. Foi verificado que a linhagem celular cancerígena MCF-7 (receptora de estrogênio positiva) é afetada pelos microplásticos potencialmente devido à polimerização incompleta desse material, que podem abrigar dímeros e trímeros de estireno, que potencialmente têm atividade estrogênica.

Uma vez que os nanoplásticos são onipresentes no ambiente e os seres humanos estão constantemente expostos a essas partículas, é de extrema importância que sejam realizados estudos aprofundados acerca dos potenciais riscos desse material para a saúde. Um estudo avaliando o comportamento de linhagens mamárias exposta a nanoplásticos é de extrema relevância para avaliar como a célula se comporta perante a exposição e analisar se os nanoplásticos oferecem um maior risco de piora do prognóstico para o câncer de mama, e possivelmente dificultar um processo de terapia celular.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo consiste em verificar a viabilidade celular da linhagem de célula de mama cancerígena receptora de estrogênio positiva MCF-7 e da linhagem de célula de mama normal MCF-10A ao serem expostas partículas plásticas baseadas em poliestireno de 500 nanômetros, possibilitando avaliar a citotoxicidade dessas partículas e quais suas implicações no câncer de mama e na terapia celular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O nanoplástico foi adquiridos comercialmente da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda, com as seguintes propriedades: micropartículas baseadas em poliestireno (PS) ou microesferas de látex de poliestireno (PS), de tamanho 500nm.

A linhagem MCF-7 de células de câncer de mama receptor de estrogênio positivo (ER+), modelo de adenocarcinoma mamário, e a linhagem MCF-10A de células de tecido mamário não tumoral foram adquiridas em parceria com o Instituto Nacional de Câncer (INCA). Para o cultivo celular, foi utilizado o meio de cultura “Dulbecco's Modified Eagle

Medium” (DMEM High Glicose, Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco) – para a MCF-7 e “Dulbecco's Modified Eagle Medium” (DMEM High Glicose, Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco), 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco), 0,0025% de insulina (Gibco), 0,0002% de EGF humano (Gibco) e 0,01% de hidrocortisona (Gibco) – para a MCF-10A, em uma incubadora a 37°C e 5% de CO₂. A passagem celular foi realizada de 2 a 3 dias, tendo como base de 80% a 90% de confluência das células. Para isso, foram lavadas com “Phosphate-buffered saline” (PBS, Gibco) e descoladas com Trypsin-EDTA (Gibco) a 0,25%.

Para a realização do ensaio de viabilidade celular, conhecido como MTT, as amostras de PS-500nm foram diluídas em meio de cultura completo nas concentrações de 10µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 250µg/ml, 500µg/ml e 1000µg/ml. Posteriormente, as células foram semeadas em placas de 96 poços, com 5 x 10 células em 100 µL de meio completo em cada poço. Após, foram incubadas por 24h para aderência e estabilização das células. Passado esse período, foram expostas às soluções das diferentes concentrações de PS-500nm. No controle do veículo de diluição foi feita a exposição a DMSO a 0,01% e no controle negativo as células foram expostas apenas a meio de cultura completo. Cada tratamento foi realizado em 5 replicatas e ficaram expostos às células por 24h e 72h.

Após o tempo de exposição (24h e 72h), os compostos foram removidos da placa e foi aplicado em cada poço 100 µL de solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) [0,5mg/ml] diluído em meio de cultura completo e foram incubadas por 4h. Após, a solução de MTT foi removida e foi adicionado 100 µL de DMSO em cada poço, que é o agente solubilizante dos cristais de formazan formados pelo MTT, e foram incubadas por mais 1h. Dado o período, as placas foram lidas na leitora de microplacas Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 570 nm e referência 620 nm.

A análise estatística foi feita utilizando o software Grad Pad Prism 8, a análise de normalidade foi feita utilizando o teste de Shapiro-Wilk e as diferenças observadas entre os tratamentos e o controle negativo dos experimentos foram testadas quanto à significância com o teste one-way ANOVA, seguido de post hoc de Dunnet. Os dados foram plotados em um gráfico de colunas a fim de facilitar a observação visual dos resultados obtidos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de 24 horas para a exposição da célula MCF-7 ao microplástico de 500 nanômetros é registrada na Figura 1.

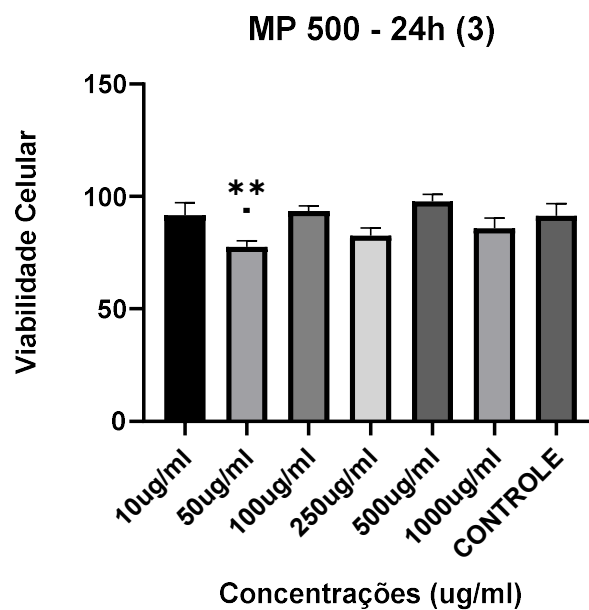


Figura 1: Viabilidade celular de células MCF-7 expostas ao microplástico de 500 nanômetros após 24h

A Figura 2 relata a viabilidade celular da linhagem MCF-7 perante a exposição ao microplástico de 500 nanômetros após 72 horas de incubação.

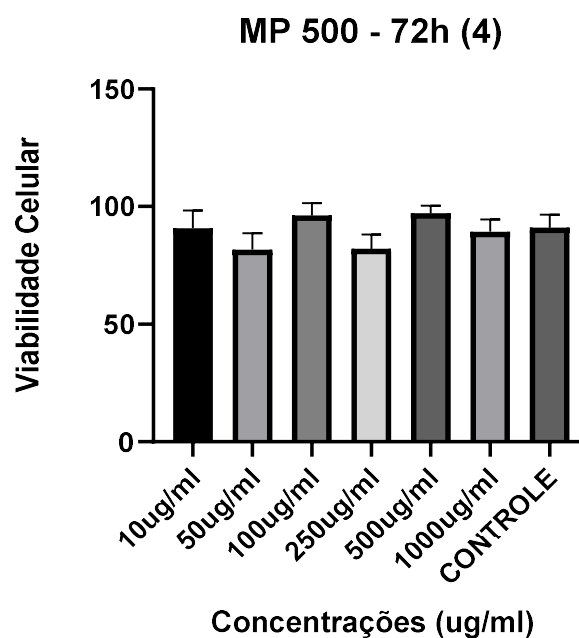


Figura 2: Viabilidade celular de células MCF-7 expostas ao microplástico de 500 nanômetros após 72h

A análise de 24 horas para a exposição da célula MCF-10A ao microplástico de 500 nanômetros é registrada na Figura 3.

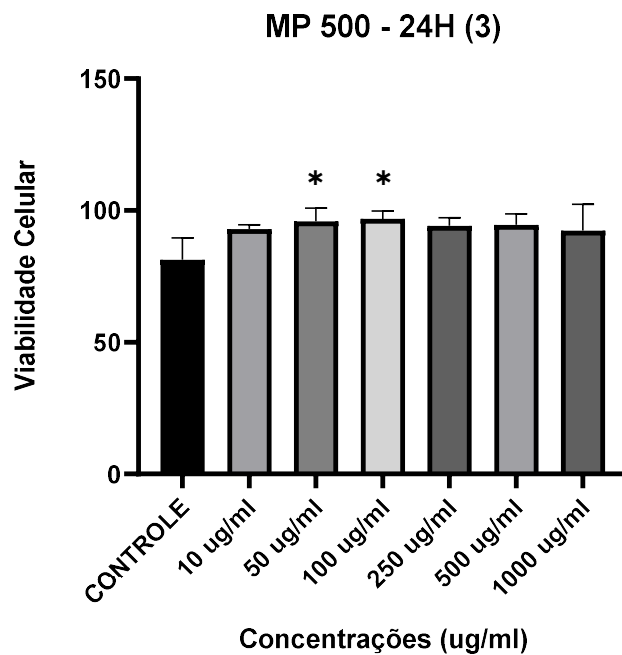


Figura 3: Viabilidade celular de células MCF-10A expostas ao microplástico de 500 nanômetros após 24h

A Figura 4 relata a viabilidade celular da linhagem MCF-10A perante a exposição ao microplástico de 500 nanômetros após 72 horas de incubação.

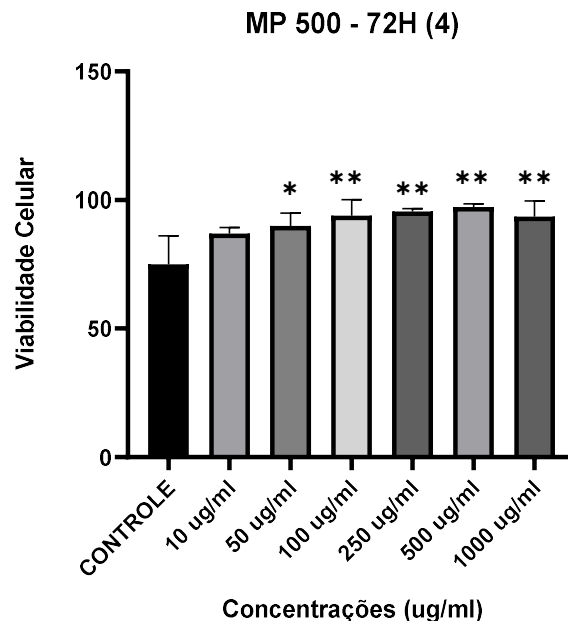


Figura 2: Viabilidade celular de células MCF-10A expostas ao microplástico de 500 nanômetros após 72h

O perfil dos gráficos, tanto nos tempos de 24h quanto 72h, mostram uma oscilação entre a redução e o aumento da viabilidade celular nas diferentes concentrações de maneira alternada. Isso pode ser explicado pelo efeito hormese, relatado inicialmente por Sagan em 1991, em que diferentes concentrações de determinada substância provocam diferentes estresses e reações nas células em razão de respostas adaptativas celulares (Silva, 2012), em

especial uma célula cancerígena, que tende a ter maior capacidade de adaptação a diferentes ambientes e estímulos.

Ao aumentar ou manter a viabilidade celular, entende-se que o microplástico provoca um estresse moderado que ativa os mecanismos de defesa e sobrevivência da célula cancerígena. Já a redução na viabilidade celular nas mais altas concentrações pode ser explicada devido a toxicidade da substância em grandes quantidades, o que compromete o funcionamento celular normal.

5 CONCLUSÃO

A relação exata entre os nanoplásticos e seus efeitos na saúde humana, especialmente no câncer de mama ainda são pouco conhecidos e objetivamente definidos, perante a isso, mostra-se necessária a realização de mais estudos neste assunto, a fim de estabelecer maiores conhecimentos do impacto dos nanoplásticos no tumor de mama e sua associação com o comprometimento de uma terapia celular eficaz, especialmente estudos relacionados ao entendimento das vias moleculares que estão envolvidas na resposta das células cancerígenas ao microplástico, além da análise de estresse oxidativo, dos processos inflamatórios associados e da expressão gênica relacionada.

REFERÊNCIAS

BANCO MUNDIAL (2019) Brasil é o 4º maior produtor de lixo plástico do mundo e recicla apenas 1%. Disponível em: <https://www.gov.br/fundaj/pt-br/destaques/observa-fundaj-itens/observa-fundaj/revitalizacao-de-bacias/brasil-e-o-4o-maior-produtor-de-lixo-plastico-do-mundo-e-recicla-apenas-1>

BANERJEE, A.; BILLEY, L. O.; SHELVER, W. L. Uptake and toxicity of polystyrene micro/nanoplastics in gastric cells: Effects of particle size and surface functionalization. **PLoS One**, 2021 Dec 31;16(12):e0260803.

BUGATTI, C.; ALMEIDA, K. C.; GUIMARÃES, M. S. A.; AMÂNCIO, N. F. G. Microplásticos e Nanoplásticos e sua relevância na saúde humana: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 1, e6712139302, 2023.

CRUZ, E. M. T.; ALMEIDA, F. R. Exposição a nano e microplásticos e seus impactos na saúde humana: uma revisão da literatura. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação-REASE**. São Paulo, v.9.n.06. jun. 2023.

DOMENECH, J.; BRITTO, M. de; VELÁZQUEZ, A.; PASTOR, S.; HERNÁNDEZ, A.; CORTÉS, C. M. R. Long-Term Effects of Polystyrene Nanoplastics in Human Intestinal Caco-2 Cells. **Biomolecules**. 2021 Oct 1;11(10):1442. doi: 10.3390/biom11101442

GLOBOCAN, International Agency for Research on Cancer; Organização Mundial da Saúde. Cancer Today. Absolute numbers, Incidence and Mortality, Both sexes, In 2022, 2022, disponível em Acesso em 20 de fevereiro de 2025.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer Discov.**, 12 (2022), pp. 31-46, 10.1158/2159-8290.CD-21-1059

HWANG, J., CHOI, D., HAN, S., CHOI, J; HONG, J. An assessment of the toxicity of polypropylene microplastics in human derived cells. **Sci. Total Environ.** 684, 657–669, 2019.

PARK, J. H. *et al.* Polypropylene microplastics promote metastatic features in human breast cancer. **Scientific Reports** volume 13, Article number: 6252, 2023.

PRATA, J. C., *et al.* Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. **Science of the total environment**, 702, 134455, 2020.

RAGUSA, A. *et al.* Raman Microspectroscopy Detection and Characterisation of Microplastics in Human Breastmilk. **Polymers (Basel)**, 2022 Jun 30;14(13):2700.

SENATHIRAJAH, K., *et al.* Estimation of the mass of microplastics ingested – A pivotal first step towards human health risk assessment. **Journal of Hazardous Materials**. Volume 404, Part B, 15 February 2021, 124004.

SILVA, J. C da; ARF, O.; GERLACH, G. A. X.; KURYIAMA, C. S.; RODRIGUES, R. A. F. Efeito hormese de glyphosate em feijoeiro. **Pesqui Agropecu Trop [Internet]**. 2012 Jul;42(3):295–302.

ONU (2022). 1/3 do plástico produzido no Brasil pode chegar aos oceanos, mostra estudo. Exame. <https://exame.com/esg/1-3-do-plastico-produzido-no-brasil-pode-chegar-aos-oceanos-mostra-estudo/>

WALCZAK, A. P., *et al.* Translocation of differently sized and charged polystyrene nanoparticles in *in vitro* intestinal cell models of increasing complexity. **Nanotoxicology**, 9(4), 453-461, 2015.