

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica



Dissertação de mestrado

**Efeitos da Exposição ao Material Particulado (MP2,5) sobre Co-Cultivo das
Linhagens Hepáticas Humanas HepG2 e LX-2**

Jéssica Marques Obelar Ramos

Porto Alegre, 2022

Jéssica Marques Obelar Ramos

**Efeitos da Exposição ao Material Particulado (MP2,5) sobre Co-Cultivo das
Linhagens Hepáticas Humanas HepG2 e LX-2**

Dissertação de mestrado submetida ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas – Bioquímica da Universidade
Federal do Rio Grande do Su

Orientadora: Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma

Co-orientadora: Izabel Cristina Custódio de Souza

Porto Alegre, 2022

CIP - Catalogação na Publicação

Ramos, Jéssica Marques Obelar
Efeitos da Exposição ao Material Particulado
(MP2,5) sobre Co-Cultivo das Linhagens Hepáticas
Humanas HepG2 e LX-2 / Jéssica Marques Obelar Ramos.
-- 2022.
68 f.
Orientadora: Fátima Theresinha Costa Rodrigues
Guma.

Coorientadora: Izabel Cristina Custódio Souza.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Poluente. 2. MP2,5. 3. Câncer. 4. Carcinoma
Hepatocelular. 5. Co-cultura. I. Guma, Fátima
Theresinha Costa Rodrigues, orient. II. Souza, Izabel
Cristina Custódio, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Resumo

Estudos epidemiológicos têm associado a exposição ao Material Particulado com diâmetro $\leq 2,5 \mu\text{m}$ (MP2,5) à incidência de carcinoma hepatocelular (CHC), tipo mais comum de câncer de fígado. A linhagem celular HepG2, estabelecida a partir de CHC de origem humana, é bastante utilizada como modelo *in vitro* para estudar os efeitos de agentes tóxicos sobre hepatócitos. O co-cultivo de células HepG2 com outras linhagens hepáticas, como a LX2, derivada de células estreladas hepáticas humanas (HSC), tem sido relatado como um modelo interessante para estudo de patologias hepáticas. Ainda que existam trabalhos na literatura que evidenciem os efeitos do MP2,5 em células de ambas as linhagens (HepG2 e LX-2), pouco se sabe do efeito em um modelo de cultura mista de células hepáticas humanas. Com isso, o presente trabalho se propôs a determinar os efeitos do MP2,5 sobre a proliferação e viabilidade em monoculturas e co-cultivos de células das linhagens HepG2 e LX-2. O MP2,5 foi capaz de aumentar a turgidez de células HepG2 e de diminuir a viabilidade de células LX-2, ambas em monocultura. No entanto, em co-cultivo essas células são capazes de minimizar o dano causado pelo poluente e isso provavelmente se deve à comunicação que o modelo de co-cultivo simultâneo proporciona a estas células. Modelos mais dinâmicos, como co-cultivos em esferóides, podem trazer mais informações sobre como células hepáticas humanas reagem frente à exposição ao MP2,5 (0, 20 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 horas).

Palavras-chave: Poluente, MP2,5, Câncer, Carcinoma Hepatocelular, CHC, HSC, HepG2, LX2, co-cultura.

Abstract

Epidemiological studies have associated exposure to particulate matter with diameter $\leq 2.5 \mu\text{m}$ (PM_{2.5}) to the incidence of hepatocellular carcinoma (HCC), the most common type of liver cancer. The HepG2 cell line was established from human HCC, and is widely used as an in vitro model to study the effects of toxic agents on hepatocytes. Co-culture of HepG2 cells with another hepatic cell lines, such as LX2, derived from human hepatic stellate cells (HSCs), has been reported as an interesting model for studying hepatic pathologies. Although there are studies in the literature that show the effects of PM_{2.5} in cells of both cell lines, little is known about the effect in a mixed culture model of human liver cells. Thus, the present work aimed to determine the effects of PM_{2.5} on cell proliferation and viability in monocultures and co-cultures of HepG2 and LX-2 lines. PM_{2.5} was able to increase the swelling of HepG2 cells and to decrease the viability of LX-2 cells, both in monoculture. However, in co-culture these cells can minimize the damage caused by the pollutant and this is probably due to the communication that the simultaneous co-culture model provides for these cells. More dynamic models, such as spheroids co-culture, can provide even more information on how human liver cells react to exposure to PM_{2.5} (0, 20 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 hours).

Key words: PM_{2.5}, Pollutant, Hepatocellular Carcinoma, Cancer. Co-culture, HSC, LX2, HepG2

Lista de abreviaturas

AKT	Proteína cinase B
ANOVA	Análise de variancia
CAT	Catalase
CHC	Carcinoma Hepatocelular
COL-1	Colágeno tipo 1
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	<i>Extracellular matriz</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FSC-H	<i>Forward Scatter</i>
HepG2	Linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano;
HL7702	Célula hepática humana normal
HPA	Hydrocarbonetos Poliaromáticos;
HSC	<i>Hepatic Stelate Cell</i>
ICP-MS	<i>Inductive Copled Plasma – Mass Spectromy</i>
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
LD	Limite de detecção
LDH	Lactato desidrogenase
L-O2	Linhagem de hepatócitos humano
LX-2	Linhagem celular humana de células estreladas hepáticas
MP	Material Particulado
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde

PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PFA	Paraformoldeído
PI	<i>Propidium iodate</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PUC-RJ	Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro
RAW264.7	Linhagem celular de macrófagos
SD	<i>Standard deviation</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Superóxido dismutase
SSC-H	<i>Side scatter</i>
TGF- β 1	Fator de crescimento de transformação beta tipo 1
α -SMA	<i>Alfa smoth muscle actin</i>

Lista de tabelas

Tabela 1 – Quantificação dos elementos encontrados nas soluções-estoque de MP2,5. Valores expressos em mg/kg de amostra seca.	29
---	----

Lista de figuras

Figura 1 – Efeito da densidade de plaqueamento sobre o crescimento celular da linhagens LX-2	31
Figura 2 – Efeito da densidade de plaqueamento sobre o crescimento celular da linhagem HepG2.	32
Figura 3 – Efeito do tempo de cultura sobre o crescimento celular das linhagens LX-2 e HepG2.	33
Figura 4 – Efeito da exposição a diferentes doses de MP2,5 sobre o crescimento das linhagens LX2 2 HepG2.	34
Figura 5 – Efeito do MP2,5 sobre a viabilidade celular por ensaio de MTT.....	35
Figura 6 – Avaliação da citotoxicidade do MP2,5 avaliada pela atividade da enzima LDH extracelular.....	36
Figura 7 – Efeito da exposição ao MP2,5 sobre a proliferação celular avaliada pela contagem dos núcleos corados com DAPI.	38
Figura 8 – Caracterização morfológicas das linhagens LX-2 e HepG2 por citometria de fluxo.	39
Figura 9 – Ensaio de apoptose inicial e por marcação com Annexina/PI em citometria de fluxo.....	41
Figura 10 – Ensaio de apoptose tardia e por marcação com Annexina/PI em citometria de fluxo.....	42
Figura 11 – Ensaio de apoptose total e por marcação com Annexina/PI em citometria de fluxo.....	43

Figura 12 – Ensaio de necrose por marcação com Annexina/PI em citometria de fluxo.	44
Figura 13 – Análise de células vivas por citometria de fluxo.	45
Figura 14 – Imagem de microscopia de fluorescência das células LX-2 e HepG2 em mono e co-cultivo simultâneo.	47
Figura 15 – Microscopia de fluorescência para gotas lipídicas de células LX-2.	48
Figura 16 – Microscopia de fluorescência para gotas lipídicas de células HepG2. ...	49
Figura 17 – Microscopia de fluorescência para gotas lipídicas de células LX-2 e HepG2.....	50
Figura 18 – Microscopia de fluorescência para AdipoRed. Células LX-2, HepG2 em monocultura e em co-cultivo, expostas ao MP2,5 (50 µg/mL) por 24 horas.....	51
Figura 19 – Identificação e quantificação de gotas lipídicas nas células LX-2 em monocultura e em co-cultivo expostas ao MP2,5 por 24h.	52
Figura 20 – Identificação e quantificação de gotas lipídicas nas células HepG2 em monocultura e em co-cultivo expostas ao MP2,5 por 24h.	53
Figura 21 – Efeito do MP2,5 sobre a formação de gotas lipídicas em células LX2, HepG2 em mono e co-cultivo.	54

Sumário

1.	Introdução.....	13
1.1.	Justificativa.....	18
2.	Objetivos.....	19
2.1.	Objetivo geral.....	19
2.2.	Objetivos específicos.....	19
3.	Metodologia.....	20
3.1.	Coleta do Material Particulado (MP2,5).....	20
3.2.	Preparo da solução de MP2,5.....	20
3.3.	Análise por Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma (ICP – MS) das soluções de uso de MP2,5.....	21
3.4.	Definição das densidades celulares e tempo de cultivo.....	21
3.5.	Culturas celulares.....	22
3.6.	Sistema de co-cultura simultânea de HepG2 e LX-2.....	22
3.7.	Tratamentos.....	23
3.8.	Ensaio de viabilidade celular.....	23
3.9.	Determinação do efeito citotóxico do MP2,5.....	24
3.10.	Proliferação celular.....	25
3.11.	Caracterização morfológica das células em mono e co-cultivo.....	25
3.12.	Morte celular por Anexina/PI.....	26
3.13.	Microscopia de fluorescência.....	26
3.14.	Quantificação de gotas lipídicas por AdipoRed.....	27
3.15.	Análise estatística.....	28
4.	Resultados.....	29
4.1.	Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma (ICP/MS).....	29
4.2.	Definição das densidades celulares e tempo de cultivo.....	30
4.3.	MP2,5 aumenta a proliferação de células HepG2.....	33

4.4.	MP2,5 (50 µg/mL) diminui a viabilidade celular de células LX-2.....	34
4.5.	MP2,5 não tem efeito citotóxico nas células LX-2 e HepG2	36
4.6.	Proliferação celular	37
4.7.	Caracterização morfológica das linhagens LX2 e HepG2.....	38
4.8.	Morte celular Annexina/PI.....	40
4.9.	Microscopia de fluorescência.....	46
4.10.	Quantificação de gotas lipídicas por AdipoRed	51
5.	Discussão	55
6.	Conclusão.....	63
7.	Referencias.....	64

1. Introdução

Com o incremento das atividades industriais no século XX, houve um aumento na produção de bens de consumo e na oferta de empregos para a população. Tal feito proporcionou a ascensão de sociedades e o crescimento econômico de um modo geral (QUEIROZ; JACOMINO; MENEZES, 2007). Por um lado, esse crescimento proporcionou desenvolvimento, mas por outro, iniciou uma crescente produção de poluentes atmosféricos. A queima de carvão e de combustível fóssil, utilizados pelas indústrias e no funcionamento de automóveis, libera na atmosfera partículas com composições distintas e que por sua vez tem impacto na natureza e na saúde da população (COLBECK; LAZARIDIS, 2010; KAMPA; CASTANAS, 2008).

Os poluentes lançados diretamente na natureza são chamados de poluentes primários. Aqueles formados por meio de reações químicas entre os poluentes primários e os componentes naturais da composição do ar atmosférico, produzem o que chamamos de poluentes secundários (HUANG et al., 2021; QUEIROZ; JACOMINO; MENEZES, 2007). Um dos componentes dos poluentes primários, de acordo com a legislação ambiental vigente no Brasil, é o Material Particulado (MP) (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018).

O MP é composto por diversos tipos de partículas e sua classificação segue de acordo com o tamanho das mesmas. Desta forma, as partículas de MP são classificadas como ultrafinas (MP_{0,1} que possuem diâmetro $\leq 0,1 \mu\text{m}$), finas (MP_{2,5}, partículas que possuem entre 0,1 e 2,5 μm de diâmetro) e grossas (MP₁₀, partículas entre 2,5 e 10 μm de diâmetro) (DONALDSON; MACNEE, 2014).

O MP com diâmetro $\leq 2,5 \mu\text{m}$ (MP_{2,5}) desperta interesse em estudos na área da saúde, pelo fato de ser composto por partículas com tamanho suficiente para serem

inaláveis (O'DAY et al., 2022). A constituição do MP2,5 compreende partículas que advém de fontes naturais ou artificiais, podendo ser compostas de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA ou na sigla inglesa PAH), nitratos, sais e alguns elementos químicos. São encontradas partículas de elementos como oxigênio (O), magnésio (Mg), alumínio (Al), silício (Si), fósforo (P), enxofre (S), cloro (Cl) e cálcio (Ca) (OKADA et al., 2021). Os tipos e quantidade de agente emissores de MP2,5, bem como a variação do clima, tem efeito sobre sua composição. Por conta disso, essas variações geram grandes contrastes na exposição ao longo do tempo (BRUNEKREEF; HOLGATE, 2002).

Esta fração da poluição já foi descrita como responsável pelo agravamento de doenças devido ao seu diâmetro e facilidade de ser inalável (O'DAY et al., 2022). Estudos têm relatado uma associação da exposição aos componentes do MP2,5 com o aumento da mortalidade e admissão hospitalar devido a doenças respiratórias e cardiovasculares (BRUNEKREEF; HOLGATE, 2002). O aumento no número de hospitalizações relacionadas à exposição ao MP2,5 traz grande preocupação para a área da saúde (SUN; ZHANG; WANG, 2022). Nesse contexto, é importante compreender a composição desse poluente atmosférico e os mecanismos pelos quais ele atua na saúde humana para oferecer subsídios quanto à prevenção e ao tratamento dos danos associados.

Devido ao seu tamanho, essas partículas conseguem alcançar os brônquios e alvéolos através da respiração e rapidamente atingir a circulação sanguínea. Por esse caminho, os componentes do MP2,5 conseguem chegar a diversos órgãos e tecidos, causando diferentes tipos de danos (QIU et al., 2017; ZHANG et al., 2019). Alguns estudos têm relatado a influência do MP2,5 na inflamação das vias aéreas (HE et al., 2010; ICHINOSE et al., 2008a, 2008b). Não obstante, essas partículas inaláveis já

foram relacionadas com processos de neurodegeneração e desordens neurológicas, uma vez que o MP2,5 consegue alterar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, levando a uma neuroinflamação (HEUSINKVELD et al., 2016).

Pelo fato deste poluente ser capaz de atravessar a barreira alvéolo-capilar e atingir o sistema circulatório, o MP2,5 atinge também demais órgãos (COSTA-BEBER; GUMA, 2022). Da mesma forma, os hepatócitos são acometidos pelos efeitos do MP2,5. Um mau funcionamento desse tipo celular pode levar a desordens metabólicas e desencadear reações prejudiciais à homeostasia do tecido. O MP2,5 já foi descrito como capaz de induzir alterações na homeostase da glicose e de promover um fenótipo de esteatose hepática, tendo influência sobre as vias de sinalização da glicose/insulina (ZHENG et al., 2013). Um estudo de coorte demonstrou que uma exposição de longa duração ao MP2,5 aumenta o risco de câncer hepático e a inflamação crônica do fígado pode estar relacionada à patogênese (PAN et al., 2016).

O câncer de fígado é a terceira causa de morte por câncer no mundo. Dentre os tipos de cânceres hepáticos, o carcinoma hepatocelular (CHC) representa aproximadamente 90% dos casos (OMS, 2020). Em um quadro oncológico, o MP2,5 pode levar as células do CHC a um processo metastático. O MP2,5 parece estar envolvido na ativação da via de sinalização PI3K/AKT, a qual é responsável pela degradação da matriz extracelular (ECM, do inglês *extracellular matrix*). O comprometimento da ECM é o que possibilita a migração e a invasão de células de CHC (ZHANG et al., 2017a).

A exposição ao poluente foi capaz de desencadear acúmulo de oncometabólicos (2-hidroxi-glutamato e succinato) em culturas da linhagem celular (HepG2) de CHC. Alterações significativas foram observadas nos níveis de 132 dos 296 metabólitos estudados, o que afetaria 46 vias metabólicas diferentes (YE et al.,

2019). Além disso, o MP2,5 aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células HepG2 e induz a invasão e a migração celular do CHC (ZHANG et al., 2017b). Um aumento nas concentrações de EROs também é capaz de induzir o acúmulo de gotas lipídicas nas células HepG2. Isto desencadeia um metabolismo excessivo de ácidos graxos que leva a formação de mais EROs, liberadas em toda a célula via mitocôndria (JIN et al., 2018). Essas implicações são características de ativação celular.

Hepatócitos ativados apresentam um perfil de acúmulo de gotas lipídicas, de aumento na capacidade proliferativa e de alteração nas taxas de apoptose (GENG et al., 2014). Nos hepatócitos, são as gotas lipídicas que armazenam triglicerídeos que são sintetizadas e decompostas conforme a dinâmica celular e os sinais do ambiente. A sua biogênese é induzida em células expostas a altas concentrações de lipídios, frente ao estresse oxidativo e nutricional, e também quando em desequilíbrios energéticos e redox. Durante o estresse, as gotas lipídicas sequestram lipídios e proteínas potencialmente tóxicos para a célula e preservam a homeostase da membrana (JARC; PETAN, 2019). Um aumento excessivo da presença dessas gotículas pode induzir estresses mecânicos intracelulares. Gotas lipídicas induzem um sinal mecânico que interrompem a capacidade de hepatócitos perceberem a rigidez da matriz subjacente (CHIN et al., 2022). Em estudo realizado com animais, a exposição ao MP2,5 induziu um acúmulo de gotas lipídicas no fígado prejudicando o metabolismo lipídico hepático (DING et al., 2019c)

Células derivadas de CHC (HepG2) expostas ao MP2,5 têm a expressão do fator de crescimento de transformação beta tipo 1 (TGF- β 1) aumentada. Essa citocina ativa as células periféricas, como as células estreladas hepáticas (HSCs do inglês *Hepatic Stelate Cell*) (LEILEI et al., 2021). Por consequência, uma cascata de reações

acontece, principalmente pela liberação de EROs, que desencadeiam processos inflamatórios. O desfecho subsequente é a fibrose e a formação de carcinoma primário de células hepática (GRESSNER; WEISKIRCHEN; GRESSNER, 2007).

HSCs também sofrem diretamente com a ação desse poluente. Quando são expostas a variadas concentrações de MP2,5, essas células passam a expressar níveis elevados de marcadores miofibroblásticos, como actina de músculo liso-alfa (α -SMA) e colágeno tipo 1 (COL-1). Tanto HSCs advindas de cultura primária quanto da linhagem LX-2 apresentam aumento de estresse oxidativo frente a exposição ao MP2,5. Diferentes concentrações de MP2,5 (2,5 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) adicionadas no meio de cultivos dessas células geram o aumento da produção de EROs e da expressão de enzimas antioxidantes. As enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) estão aumentadas nas culturas expostas ao MP2,5 (QIU et al., 2019). Alta taxa de proliferação e de expressão de marcadores miofibroblásticos implica na ativação dessas células e no desenvolvimento de fibrose hepática.

Sabe-se que as HSCs quiescentes são responsáveis por armazenar gotas lipídicas com vitamina A. Durante a ativação, essas células perdem as gotas lipídicas, ganham um fenótipo do tipo fibroblástico e expressam altos níveis de α -SMA (FRIEDMAN, 2008). Um estudo recente revelou que as LX-2 (linhagem de HSC) também aumentam a expressão desses marcadores (α -SMA e COL-1) quando tratadas com meio condicionado de hepatócitos (L-O2) expostos ao MP2,5 (LEILEI et al., 2021). O mesmo acontece quando células LX-2 são expostas ao meio condicionado de outro tipo celular (linhagem RAW264.7 de macrófagos) expostos ao MP2,5 (ZHENG et al., 2015).

Isso demonstra que a ação do poluente tem efeito sobre esses dois tipos celulares (hepatócitos e células estreladas hepáticas) quando cultivados

isoladamente, mas que a comunicação dessas células também influencia na resposta ao dano. No entanto, não são encontrados na literatura trabalhos que revelem o efeito que a exposição ao MP2,5 tem sobre proliferação celular e acúmulo/perda de gotas lipídicas em uma co-cultura de hepatócitos (HepG2) e HSCs (LX-2).

1.1. Justificativa

Ainda que existam trabalhos na literatura que evidenciem os efeitos do MP2,5 em células HepG2 e na linhagem LX-2, não existem pesquisas que utilizam um modelo de interação entre as linhagens e a exposição ao MP2,5. De acordo com o exposto, a presente dissertação se propõe a analisar os efeitos do MP2,5 sobre as linhagens HepG2 e LX2, submetidas a diferentes concentrações e tempos de exposição ao poluente. Esses dados serão usados como base para o estudo da resposta dessas células ao poluente em sistemas de co-cultura de HepG2 e LX2.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Determinar os efeitos de diferentes concentrações de MP2,5 sobre a proliferação e viabilidade celular em culturas isoladas das linhagens humanas HepG2 de CHC e LX-2 de HSCs, bem como, o co-cultivos dessas células.

2.2. Objetivos específicos

- a) Determinar a composição da solução preparada de MP2,5 pela técnica de técnica ICP-MS (*inductive coupled plasma – mass spectromy*).
- b) Estabelecer as culturas das linhagens HepG2 e LX-2 e um protocolo de administração do MP2,5 às células em cultivo;
- c) Avaliar a proliferação celular em função do tempo de cultivo e da densidades celular inicial;
- d) Estabelecer o modelo de co-cultivo simultâneo das HepG2 e LX-2;
- e) Quantificar a presença de gotas lipídicas nas células em monocultura e em co-cultivo;
- f) Determinar os efeitos do MP2,5 sobre os modelos de co-cultivo celular;

3. Metodologia

3.1. Coleta do Material Particulado (MP2,5)

As amostras do MP2,5 foram cedidas pelo Instituto Estadual do Ambiente (INEA), coletadas na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil, durante o inverno (junho a julho) de 2016, quando se verifica a maior ocorrência do MP2,5. O MP2,5 foi coletado utilizando amostradores de grandes volumes (Energética, Brasil) com um fluxo médio de 1,14 m³/min por 24 horas com o auxílio de filtros de microfibras de vidro boro-silicato (Whatman, 254-203 mm, com malha de 0,22 mm).

3.2. Preparo da solução de MP2,5

Os componentes hidrossolúveis do MP2,5 presentes nos filtros foram extraídos com solução fisiológica, utilizando 1 g de filtro com MP2,5 imerso em 250 mL de PBS (pH 7,4). O PBS contendo os filtros foi submetido a sete sessões de ultrassonicação (50 min cada) a uma temperatura de 40° C. (MAI et al., 2017). Após a decantação, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 1000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente coletado (solução contendo o MP2,5 extraído) e então foi seco na SpeedVac. O MP2,5 obtido nesse processo foi ressuspensão em PBS à uma concentração estoque de 10 mg/mL (ZHU et al., 2018). Essa solução foi acondicionada em um tubo Falcon e esterilizada por exposição durante 30 minutos à

luz ultravioleta germicida dentro da capela de fluxo laminar. Para o grupo controle foi utilizada uma membrana limpa, não exposta à poluição (Branco), seguindo a mesma técnica de preparo descrita acima.

3.3. Análise por Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma (ICP – MS) das soluções de uso de MP2,5

A fim de obter uma informação sobre a composição elementar das soluções, foi utilizada a técnica de Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS). Para tanto, amostras das soluções estoque (10mg/mL) foram liofilizadas e enviadas para a Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ), onde foram preparadas para análise por ICP-MS por solubilização em 1% ácido nítrico. A solução obtida a partir deste procedimento foi analisada por ICP-MS (RIBEIRO et al., 2016).

3.4. Definição das densidades celulares e tempo de cultivo

Foram utilizadas linhagens celulares de hepatocarcinoma celular (HepG2) e de células estreladas hepáticas (LX-2). No modelo monocultura, as células foram semeadas em um gradiente de densidade celular em placas de 96 poços para escolha da quantidade de células que seria utilizada por cm². Uma curva densidade celular por tempo foi determinada utilizando os resultados de área de cobertura obtidos em leitor de placas SpectraMAX I3 MiniMax 300 Imaging Cytometer (Molecular Devices,

Sunnyvale, CA, EUA) com o módulo de imagem óptica e configuração de luz transmitida. A tecnologia de detecção de células StainFree™ da Molecular Devices permite a estimativa da confluência celular e da citotoxicidade e é comparável às contagens nucleares e de células inteiras obtidas utilizando corantes fluorescentes (Molecular Devices, 2019). Além disso, as células puderam ser analisadas a qualquer momento sem interromper seu crescimento. Ao longo de 92 horas de cultivo, várias densidades celulares foram analisadas e a área de cobertura das células nos poços foi obtida por imageamento a cada 24 horas.

3.5. Culturas celulares

As duas linhagens, HepG2 e LX-2, foram mantidas com meio de cultivo celular DMEM *low glucose* (1 g de glicose/L) suplementadas com 2% de soro fetal bovino (SFB), penicilina e gentamicina 1% e fungizone (10mg/mL). As células foram mantidas em garrafas de cultivo de 25 cm² em incubadoras a 37° C, com umidade controlada e níveis de CO₂ de 5%. As monoculturas foram estabelecidas a partir de uma densidade inicial de 3 x 10⁴ células/cm² e 1,2 x 10⁴ células/cm² de HepG2 e LX-2, respectivamente.

3.6. Sistema de co-cultura simultânea de HepG2 e LX-2

Foi necessário realizar uma adaptação das densidades escolhidas anteriormente, para trabalharmos com o co-cultivo. No modelo de co-cultivo

simultâneo, as células foram plaqueadas em uma densidade de 3×10^4 células/cm² de HepG2 e, diferentemente do monocultivo, de $0,6 \times 10^4$ de LX-2. Esse modelo de co-cultivo foi estabelecido para manter uma proporção de 5:1 (HepG2:LX-2), simulando o ambiente fisiológico do fígado humano (BARBERO-BECERRA et al., 2015; GIRAUDI et al., 2015).

3.7. Tratamentos

Após 24h do plaqueamento, todo o meio de cultivo era retirado das culturas celulares e era adicionado novo meio ao cultivo contendo Branco, 10, 20, 50 ou 100 µg/mL de MP2,5. No grupo Branco, foi utilizada a concentração de 50 µg/mL da solução produzida com filtro limpo. As soluções-estoque eram homogeneizadas no vórtex pouco antes de serem utilizadas e os meios de cultivo com MP2,5 eram preparados no momento do tratamento.

3.8. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular, tanto em mono quanto em co-cultivo, foi analisada pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma Aldrich, M2128) (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018). Para as monoculturas, as células foram plaqueadas nas densidades de 3×10^4 células/cm² e $1,2 \times 10^4$ células/cm² de HepG2 e LX-2, respectivamente. Os co-cultivos foram estabelecidos com 3×10^4 células/cm² e $0,6 \times 10^4$ de HepG2/LX-2, respectivamente. No dia seguinte,

as culturas eram expostas ao MP2,5. O meio de cultivo era completamente substituído por meio fresco contendo 20 e 50 µg/mL de MP2,5, concentração final. As culturas controle (Branco) recebiam meio contendo 50 µg/mL do material extraído dos filtros limpos (não expostos ao poluente).

3.9. Determinação do efeito citotóxico do MP2,5

A citotoxicidade foi avaliada a partir da quantificação extracelular da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH). Para isso, utilizamos o Kit de quantificação da atividade da LDH (Biotécnica) com ajustes no protocolo indicado pelo fornecedor. As células eram plaqueadas nas proporções descritas acima e, no dia seguinte, o meio de cultivo foi trocado pelo meio de exposição ao MP2,5 (20 e 50 µg/mL). Essas células permaneceram 24 horas expostas ao poluente. Após esse período, o meio de cultivo foi coletado, centrifugado (1000 x g por 10 min) e o sobrenadante armazenado (-20°C) para análise posterior. Para mensuração da atividade da enzima, as amostras foram descongeladas e diluídas na proporção de 1:1 na solução de trabalho (protocolo do fabricante). A atividade de LDH de cada amostra foi avaliada sempre em triplicatas, a uma temperatura de 37°C no espectrofotômetro SpectraMax M3 a 340 nm. Após 60 segundos da adição da solução de trabalho, a absorbância inicial (A0) foi lida. Em seguida, foram realizadas três leituras subsequentes por um minuto cada (A1, A2 e A3 respectivamente). A média da variação da absorbância por minuto ($\Delta A/\text{min}$) foi calculada pela fórmula seguinte:

$$\Delta A/\text{min} = \frac{(A0 - A1) + (A1 - A2) + (A2 - A3)}{3}$$

A atividade catalítica da enzima LDH na amostra foi calculada pela multiplicação do $\Delta A/\text{minuto}$ pelo fator correspondente:

$$\text{LDH (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 8095$$

3.10. Proliferação celular

O efeito do MP2,5 sobre a proliferação celular foi analisado por meio de contagem celular. Primeiramente, as células foram plaqueadas nas densidades descritas anteriormente para mono e co-cultivo, e posteriormente foram expostas as concentrações de 20 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de MP2,5 durante 24 horas. Após, as células foram fixadas e os núcleos corados com DAPI. O número de células foi determinado utilizando o software ImageJ com o plugin para *count*.

3.11. Caracterização morfológica das células em mono e co-cultivo

Os parâmetros tamanho (FSC-H) e granulosidade (SSC-H) foram usados para a determinação das características morfológicas das linhagens HepG2 e LX-2. A partir desses parâmetros foi possível diferenciar as células das linhagens LX-2 e HepG2 dentro de um co-cultivo. As células foram cultivadas nas mesmas condições dos demais experimentos e, após 48h de cultivo, foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em solução salina. Sempre foram coletados 10.000 eventos que foram analisados utilizando o *software* FCS Express 4.

3.12. Morte celular por Anexina/PI

Buscando entender o efeito do MP2,5 sobre as células em monocultivo e em co-cultivo, foi realizado um ensaio para análise de morte celular por meio de um kit Annexina V-FITC / Iodeto de Propídio (PI) (QuatroG, Porto Alegre, RS, Brasil). Assim, as células foram tripsinizadas e lavadas com CMF após cultivo. Em seguida, o pellet celular foi suspenso em 100 μ L de tampão de ligação 1X a uma densidade celular de 1×10^6 células / mL, e incubadas com 2 μ L de Anexina V-FITC juntamente com 2,5 μ L de iodeto de propídio (PI) por 15 min, em temperatura ambiente e protegido da luz. A análise de fluorescência foi realizada por meio de citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ e os dados foram analisados usando o *software* FCS Express 4.

3.13. Microscopia de fluorescência

A identificação morfológica das células foi por meio de microscópio de fluorescência. Para tanto, foi utilizada a técnica de marcação com AdipoRed (Lonza) para fosfolípidios de membrana e triglicerídios em ambas as linhagens estudadas. O componente de coloração do AdipoRed é denominado NileRed, que emite fluorescência vermelha para fosfolípidios de membrana e fluorescência verde para os triglicerídeos presentes nas gotas lipídicas das células. Após 24h de exposição ao MP2,5, as culturas foram pré-fixadas com paraformaldeído (PFA) 2% durante 15 min e posteriormente fixadas com PFA 4% por 15 minutos. Logo, as culturas foram coradas com AdipoRed

Os hepatócitos e as células estreladas hepáticas apresentam um perfil de ativação característico. Em hepatócitos, o acúmulo de triglicerídeos ocorre em gotas lipídicas citoplasmáticas, caracterizando a esteatose hepática; por outro lado, a ativação das HSCs está relacionada à perda das gotas lipídicas. Em resposta a um dano hepático, as LX-2 perdem gotas lipídicas e as HePG2 acumulam gotas lipídicas. Os triglicerídeos presentes nas gotas lipídicas citoplasmáticas e corados com AdipoRed (nileRed) emitem fluorescência verde (585 nm). A superfície celular, isto é, o limite citoplasmático (contorno), foi revelada pela fluorescência vermelha (637 nm) emitida pelo AdipoRed ligado aos fosfolipídios de membrana. O núcleo foi corado com DAPI.

3.14. Quantificação de gotas lipídicas por AdipoRed

Os perfis de ativação das células LX-2 e HepG2, foram analisados após o plaqueamento das células, em mono e em co-cultivo, e a exposição destas ao MP2,5 (20 e 50 µg/mL) por 24h. A determinação do efeito do MP2,5 sobre o acúmulo de lipídios em gotas citoplasmáticas, ocorreu por meio do ensaio de imunofluorescência das gotas lipídicas, coradas com AdipoRed, analisadas e quantificadas pela técnica de citometria de fluxo. A fluorescência verde para a identificação dos triglicerídeos das gotas lipídicas foi captada pelo canal FL1-H. As leituras foram realizadas utilizando um Citômetro de Fluxo FACs Calibur BD. As células foram identificadas nas monoculturas e no co-cultivo utilizando os mesmos parâmetros descritos acima.

3.15. Análise estatística

Os resultados dos ensaios de MTT, LDH e Anexina/PI foram analisados pela ANOVA de uma via, seguida de *post-hoc* de Dunnett. Para os resultados do efeito do MP2,5 sobre área de cobertura celular e a quantificação de gotas lipídicas foi realizada ANOVA de duas vias, seguida de um *post-hoc* de Tukey. Os resultados foram estatisticamente diferentes (*) para o valor de $p \leq 0,05$. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. Os dados foram apresentados com média \pm desvio padrão (ou SD do inglês *Standard Deviation*).

6. Conclusão

Nós estabelecemos um modelo *in vitro* simples, de fácil manuseio e baixo custo, de microambiente hepático que pode ser replicado em laboratórios que já realizem culturas celulares. Essa ferramenta foi capaz de elucidar que o efeito do MP2,5 sobre culturas mistas é minimizado pela interação entre as células. O MP2,5 reduz viabilidade celular de HSCs e aumenta turgidez (*Swelling*) de hepatócitos, ambos em monocultivo, mas não altera tais parâmetros no co-cultivo celular. As perspectivas futuras serão produzir modelo de co-cultivo em esferóide de células hepáticas humanas (HepG2 e LX-2) e observar a dinâmica que a tridimensionalidade promove nas células impactando na resposta à exposição ao MP2,5.

7. Referencias

- BARBERO-BECERRA, V. J. et al. The interplay between hepatic stellate cells and hepatocytes in an in vitro model of NASH. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1753–1758, 2015.
- BRUNEKREEF, B.; HOLGATE, S. T. Air pollution and health. **Lancet**, v. 360, n. 9341, p. 1233–1242, 2002.
- CHIN, L. et al. Lipid droplets disrupt mechanosensing in human hepatocytes. p. 11–22, 2022.
- CHUANG, H. C. et al. Associations of soluble metals and lung and liver toxicity in mice induced by fine particulate matter originating from a petrochemical complex. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 27, p. 34442–34452, 2020.
- COLBECK, I.; LAZARIDIS, M. Aerosols and environmental pollution. **Naturwissenschaften**, v. 97, n. 2, p. 117–131, 2010.
- COSTA-BEBER, L. C.; GUMA, F. T. C. R. The macrophage senescence hypothesis: the role of poor heat shock response in pulmonary inflammation and endothelial dysfunction following chronic exposure to air pollution. **Inflammation Research**, 2022.
- DING, D. et al. MicroRNA-26a-CD36 signaling pathway: Pivotal role in lipid accumulation in hepatocytes induced by PM2.5 liposoluble extracts. **Environmental Pollution**, v. 248, p. 269–278, 2019a.
- DING, D. et al. MicroRNA-26a-CD36 signaling pathway: Pivotal role in lipid accumulation in hepatocytes induced by PM2.5 liposoluble extracts. **Environmental Pollution**, v. 248, p. 269–278, 2019b.
- DING, S. et al. Combined effects of ambient particulate matter exposure and a high-fat diet on oxidative stress and steatohepatitis in mice. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. 1–18, 2019c.
- DONALDSON, K.; MACNEE, W. Mini-Review Potential mechanisms of adverse pulmonary and cardiovascular effects of particulate air pollution (PM 10). **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1590–1602, 2014.
- FRIEDMAN, S. L. Hepatic Stellate Cells : Protean , Multifunctional , and Enigmatic Cells of the Liver. p. 125–172, 2008.
- GE, C. et al. Nrf2 mitigates prolonged PM2.5 exposure-triggered liver inflammation by positively regulating SIK1 activity: Protection by Juglanin. **Redox Biology**, v. 36, p. 101645, 2020.
- GENG, Z. MIN et al. Sorafenib Inhibition of Hepatic Stellate Cell Proliferation in Tumor Microenvironment of Hepatocellular Carcinoma: A Study of the Sorafenib Mechanisms.

Cell Biochemistry and Biophysics, v. 69, n. 3, p. 717–724, 2014.

GIRAUDI, P. J. et al. The importance of the interaction between hepatocyte and hepatic stellate cells in fibrogenesis induced by fatty accumulation. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 98, n. 1, p. 85–92, 2015.

GRESSNER, O. A.; WEISKIRCHEN, R.; GRESSNER, A. M. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. **Comparative Hepatology**, v. 6, p. 1–13, 2007.

GROSSINI, E. et al. Levosimendan Inhibits Peroxidation in Hepatocytes by Modulating Apoptosis / Autophagy Interplay. p. 1–23, 2015.

GUO, C. et al. Resveratrol Ameliorates PM2.5-Induced Detrimental Effects in CHO Cell. **ETP International Journal of Food Engineering**, v. 4, n. 2, p. 161–164, 2018.

HANZALOVA, K.; ROSSNER, P.; SRAM, R. J. Oxidative damage induced by carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and organic extracts from urban air particulate matter. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 696, n. 2, p. 114–121, 2010.

HE, M. et al. Airborne Asian sand dust enhances murine lung eosinophilia. v. 22, n. July, p. 1012–1025, 2010.

HEUSINKVELD, H. J. et al. Neurodegenerative and neurological disorders by small inhaled particles. **NeuroToxicology**, v. 56, p. 94–106, 2016.

HUANG, X. et al. Enhanced secondary pollution offset reduction of primary emissions during COVID-19 lockdown in China. **National Science Review**, v. 8, n. 2, 2021.

ICHINOSE, T. et al. Effects of Asian Sand Dust , Arizona Sand Dust , Amorphous Silica and Aluminum Oxide on Allergic Inflammation in the Murine Lung. p. 685–694, 2008a.

ICHINOSE, T. et al. The Effects of Microbial Materials Adhered to Asian Sand Dust on Allergic Lung Inflammation. p. 348–357, 2008b.

JARC, E.; PETAN, T. Lipid droplets and the management of cellular stress. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 92, n. 3, p. 435–452, 2019.

JIN, Y. et al. Reactive oxygen species induces lipid droplet accumulation in hepg2 cells by increasing perilipin 2 expression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 1–19, 2018.

KAMPA, M.; CASTANAS, E. Human health effects of air pollution. **Environmental Pollution**, v. 151, n. 2, p. 362–367, 2008.

KFOURY, M. et al. Essential oil components decrease pulmonary and hepatic cells inflammation induced by air pollution particulate matter. **Environmental Chemistry Letters**, v. 14, n. 3, p. 345–351, 2016.

KLOVER, P. J.; MOONEY, R. A. Hepatocytes: Critical for glucose homeostasis. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 5, p. 753–758, 2004.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. 469–471, 2018.

LEILEI, L. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications releasing TGF- β 1. v. 569, 2021.

LIAO, Z.; NIE, J.; SUN, P. The impact of particulate matter (PM_{2.5}) on skin barrier revealed by transcriptome analysis : Focusing on cholesterol metabolism. **Toxicology Reports**, v. 7, n. November 2019, p. 1–9, 2020.

LIU, Z. et al. Taurocholic acid is an active promoting factor , not just a biomarker of progression of liver cirrhosis : evidence from a human metabolomic study and in vitro experiments. p. 1–9, 2018.

MAI, A. S. et al. Exercise Training under Exposure to Low Levels of Fine Particulate Matter: Effects on Heart Oxidative Stress and Extra-to-Intracellular HSP70 Ratio. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 491, de 19 de Novembro de 2018. Dispõe sobre padrões de qualidade do ar. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, ed. 223, 21/11/2018. Seção: 1, Página: 155.

NGO, T. H. et al. Cytotoxicity Assessment of PM_{2.5} Collected from Specific Anthropogenic Activities in Taiwan. 2019.

OKADA, T. et al. Nanoscale observation of PM_{2.5} incorporated into mammalian cells using scanning electron-assisted dielectric microscope. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2021.

PAN, W. C. et al. Fine Particle Pollution, Alanine Transaminase, and Liver Cancer: A Taiwanese Prospective Cohort Study (REVEAL-HBV). **Journal of the National Cancer Institute**, v. 108, n. 3, p. 1–7, 2016.

PARK, S. et al. Down-regulation of FoxO-dependent c-FLIP expression mediates TRAIL-induced apoptosis in activated hepatic stellate cells. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 10, p. 1495–1503, 2009.

PINGITORE, P. et al. Human multilineage 3D spheroids as a model of liver steatosis and fibrosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1–16, 2019.

QIU, Y. et al. Inhalation exposure to PM_{2.5} counteracts hepatic steatosis in mice fed high-fat diet by stimulating hepatic autophagy. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

QIU, Y. N. et al. PM_{2.5} induces liver fibrosis via triggering ROS-mediated mitophagy. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 167, n. August 2018, p. 178–187,

2019.

QUEIROZ, P. G. M.; JACOMINO, V. M. F.; MENEZES, M. Â. D. B. C. Composição elementar do material particulado presente no aerossol atmosférico do município de Sete Lagoas, Minas Gerais. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1233–1239, 2007.

RIBEIRO, J. DE P. et al. Toxicological effects of particulate matter (PM_{2.5}) on rats: Bioaccumulation, antioxidant alterations, lipid damage, and ABC transporter activity. **Chemosphere**, v. 163, p. 569–577, 2016.

SASAKI, R. et al. Possible Involvement of Hepatitis B Virus Infection of Hepatocytes in the Attenuation of Apoptosis in Hepatic Stellate Cells. p. 1–17, 2016.

WANG, N. et al. Hydroxytyrosol prevents PM_{2.5}-induced adiposity and insulin resistance by restraining oxidative stress related NF- κ B pathway and modulation of gut microbiota in a murine model. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 141, n. January, p. 393–407, 2019.

WANG, Z. J. et al. PM_{2.5} promotes Drp1-mediated mitophagy to induce hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis via regulating miR-411. **Experimental Cell Research**, v. 407, n. 2, p. 112828, 2021.

WOODROW, K. A. et al. Biodegradable Meshes Printed with Extracellular Matrix Proteins Support Micropatterned Hepatocyte Cultures. v. 15, n. 5, 2009.

WU, Y. C. et al. Transplantation of 3D adipose - derived stem cell / hepatocyte spheroids alleviates chronic hepatic damage in a rat model of thioacetamide - induced liver cirrhosis. **Scientific Reports**, p. 1–10, 2022.

YE, G. et al. Comprehensive metabolic responses of HepG2 cells to fine particulate matter exposure: Insights from an untargeted metabolomics. **Science of the Total Environment**, v. 691, p. 874–884, 2019.

ZHANG, J. et al. Therapeutic effects of stemonine on particulate matter 2.5-induced chronic obstructive pulmonary disease in mice. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 14, n. 5, p. 4453–4459, 2017a.

ZHANG, Q. et al. Atmospheric particulate matter_{2.5} promotes the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. **Oncology Letters**, v. 13, n. 5, p. 3445–3450, 2017b.

ZHANG, Y. et al. Socioeconomic factors of PM_{2.5} concentrations in 152 Chinese cities: Decomposition analysis using LMDI. **Journal of Cleaner Production**, v. 218, p. 96–107, 1 maio 2019.

ZHENG, S.; CHEN, A. Activation of PPAR γ is required for curcumin to induce apoptosis and to inhibit the expression of extracellular matrix genes in hepatic stellate cells in vitro. v. 157, p. 149–157, 2004.

ZHENG, Z. et al. Exposure to ambient particulate matter induces a NASH-like

phenotype and impairs hepatic glucose metabolism in an animal model. **Journal of Hepatology**, v. 58, n. 1, p. 148–154, 2013.

ZHENG, Z. et al. Exposure to Fine Airborne Particulate Matters Induces Hepatic Fibrosis in Murine Models. **JOURNAL OF HEPATOLOGY**, 2015.

ZHU, J. et al. Proteomic analysis of human umbilical vein endothelial cells exposed to PM2.5. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 19, n. 6, p. 458–470, 2018.